

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS DOCTORAL**

**Biomarcadores plasmáticos y alteraciones de la respuesta inmunitaria  
en la telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**María Luisa Ojeda Fernández**

Directora  
Luisa María Botella Cubells

**Madrid, 2016**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**BIOMARCADORES PLASMÁTICOS Y ALTERACIONES DE LA RESPUESTA INMUNITARIA  
EN LA TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA (HHT)**

Memoria presentada por:

**María Luisa Ojeda Fernández**

Para optar al grado de doctor en Ciencias Biológicas

Realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), adscrito al Centro de Investigaciones Biomédicas en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) bajo la dirección de la Dra. Luisa María Botella Cubells



Madrid, 2015

**VºBº director de tesis**

**Dra. Luisa María Botella Cubells**

**VºBº doctorando**

**María Luisa Ojeda Fernández**



**Este trabajo ha sido realizado con cargo a los siguientes proyectos de investigación:**

SAF2005-01090 del Ministerio de Educación y Ciencia. Periodo 2005-2008. *“Bases moleculares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria tipo I y II en España”*. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Investigador principal: Luisa María Botella Cubells.

Ayuda concedida por la Fundación Ramón Areces en el XIV Concurso Nacional para la Adjudicación de Ayudas a la Investigación Científica y Técnica. Convocatoria 2006. Área Biomedicina-Enfermedades Raras. *“Ensayos terapéuticos en células derivadas de pacientes con Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) y terapia célula-génica usando células progenitoras endoteliales en un modelo murino HHT”*. Periodo 2007-2010. Investigador Principal: Luisa María Botella Cubells.

SAF2008-01218 del Ministerio de Educación y Ciencia. Periodo 2009-2011. *“Bases Moleculares de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria y Ensayos de Terapias Farmacológicas Célulo-Génicas”*. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC. Investigador principal: Luisa María Botella Cubells.

MEICA de Genoma España. *“Molecular and cellular mechanisms in chronic inflammatory and autoimmune diseases”*. Periodo: 15 Enero 2009 a 14 Enero 2012. Coordinador Científico: Francisco Sánchez Madrid. Investigador Principal subproyecto: Carmelo Bernabéu Quirante.

Y gracias a ser beneficiaria de contrato predoctoral concedido a la Unidad 707 perteneciente al consorcio de Centros de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII-CB06/07/0038 a Carmelo Bernabéu).





MINISTERIO  
DE ECONOMÍA  
Y COMPETITIVIDAD



CONSEJO SUPERIOR  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS

Dña. LUISA BOTELLA CUBELLS, Investigadora Científica en el Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA

Que María Luisa Ojeda Fernández, Licenciada en Biología y Bioquímica por la Universidad Autónoma de Barcelona, ha realizado bajo mi dirección el proyecto correspondiente a su Tesis que lleva por título: **“Biomarcadores plasmáticos y alteraciones de la respuesta inmunitaria en la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT)”**, y que reúne los requisitos necesarios para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

LA DIRECTORA,

Fdo. Luisa María Botella Cubells

Investigadora Científica, CSIC

**CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS**



## AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar está la Dra. Luisa María Botella Cubells, mi directora de tesis. Ha sido todo un honor poder trabajar a tu lado, compartir experiencias, aprender a investigar y hacerlo en un tema que te acerca a la vida real de muchas personas que lidian con una enfermedad. Nunca podré plasmar en palabras lo tremendamente agradecida que estoy porque me dieras esta oportunidad y, ante todo, que confiaras en mí para llevar a cabo la investigación. Debo, sin duda, aprovechar esta oportunidad para resaltar algunas de tus virtudes que hacen de ti una gran persona además de una gran profesional. Entre ellas está tu tesón en el trabajo, tu capacidad de seguir luchando ante las adversidades como los recortes sufridos en los últimos tiempos y que han perjudicado tanto a la investigación en nuestro país, pero como tu bien dices “trabajando como hormiguitas, poco a poco se cosechan los resultados”. La paciencia que has mostrado conmigo en el día a día, junto a la delicadeza que muestras cuando escuchas a los pacientes e intentas resolver sus dudas, hacen sin duda de ti una persona honorable y un ejemplo a seguir. Si tuviéramos más “Luisas” en el mundo como tú, el mundo sería mejor. Y no puedo finalizar sin decirte que más que una directora de tesis, para mí eres una gran amiga a la que le debo tantas cosas. Un millón de gracias, Luisa.

Carmelo, toda mi aventura empezó gracias a que un día me aceptaste en tu laboratorio como estudiante en prácticas, he ahí mi fortuna. Antes de aquel momento, cuando estaba finalizando mis estudios universitarios, poder trabajar en investigación me sonaba a algo muy lejano y muy difícil de alcanzar. Pero tú me abriste las puertas a este mundo y fíjate si me gustó que luego decidí iniciar una tesis. Gracias por tu confianza, por tus consejos y sugerencias, por todo el tiempo invertido para ayudarme a realizar presentaciones en los congresos, redactar manuscritos y como no, también en la supervisión de esta tesis doctoral y su presentación final. Doy fe de que son muchas horas dedicadas y quiero que sepas que te estoy muy agradecida por todo ello.

Y mi aventura se inició al lado de una tríada maravillosa: Eva-África-Blanco. Qué grandes momentos vividos juntos durante mi estancia en el laboratorio de Carmelo. Con compañeros así, ¡cómo no me iba a enganchar a la ciencia! África, aunque te fuiste pronto a hacer las Américas, dejaste una huella en mí y esos ricitos se echan de menos. Eva, hemos compartido tantas vivencias y confianzas que aunque nos separe la distancia, ten presente que siempre tendrás a una amiga esperándote en Italia. Y en algún momento tenemos que volver a encontrarnos para tomar una copa de vino juntas y contarnos tantas cosas que se han quedado en el tintero. He aquí las palabras para nuestro “cotutor” el Dr. Blanco y, es que en parte has sido mentor de todos los que hemos pasado por el laboratorio de Luisa y Carmelo. Siempre nos has ayudado y también has sido muy paciente con nosotros. He aprendido mucho de ti, gracias por estar ahí y ha sido todo un placer trabajar a tu lado.

Un rincón muy especial en mi corazón lo ocupan Lucía y Virginia. La mayor parte de los años que he estado haciendo la tesis, los he vivido a vuestro lado. Lucy, ¡qué habría hecho yo sin ti tanto a nivel profesional como personal! Gracias por estar dispuesta siempre a ayudarme con los ratones, las muestras de pacientes y por escucharme tan pacientemente. Me parece que te hicieron flaco favor al colocar tu asiento justo detrás del mío, madre mía cuantas horas de charla que ha aguantado “la Lucy” de “la Lu”, te has ganado el cielo. La espera de la maternidad, uno de los momentos que creo más especiales en nuestra vida, lo hemos vivido de forma contemporánea y eso no se olvida nunca. No sabes la cantidad de veces que me acuerdo de ti en el día a día cuando estoy al lado de mi bichito. Virginia es otro ejemplo de bondad y amistad, parece que Luisa tiene un radar especial para detectar a grandes personas de espíritu noble. Hemos compartido muchísimas horas de laboratorio, congresos, estrés por el trabajo y un largo *etc.*, del día a día del laboratorio, que han sido los pilares que han forjado una gran amistad. Virginia, tengo que agradecerte tanto, tanto, tanto, ... por toda la ayuda prestada en la elaboración de la tesis y en todos sus trámites. Poder llegar a presentarla en la facultad y finalmente defenderla, hubiese sido muy difícil sin ti. Chicas, os quiero mucho y os echo mucho de menos.



Y ahora, aunque no menos importantes, están todas las personas con las que he tenido la suerte de encontrarme durante mis años en el CIB. Mikel, eres simplemente genial, me lo he pasado en grande trabajando a tu lado, los días eran mucho más llevaderos si estabas tú, eres la alegría de la huerta. Además, siempre has estado dispuesto a ayudar y colaborar. Eunáte: ¡mira que irte justo antes de que dejara Madrid!... No te lo perdono, pero aún así te deseo todo lo mejor, que sigas cosechando grandes experiencias y que sigas adelante con una carrera investigadora. Ana Cristina, Carmen y Elisa, gracias por vuestra compañía, complicidad y por ayudarnos en el laboratorio. A el señor Arturo Torres debo agradecerle que me enseñara a enseñar y que fuera tan paciente con el mini-proyecto que le propuse para su proyecto fin de carrera, el cual escondía una trampa: un montón de partículas a contar en centenares de fotografías! Otro amigo que me ha brindado mi paso por el CIB es nuestro Paquillo, como diría Luisa. Gracias por tu ayuda en ensayos varios y en la citometría y sobre todo, gracias por ser un amigo y compartir experiencias. Deberías de haberte quedado un poquito más como vecino de *Vallekas* y no alejarte tanto de mi vera. Y el clan del CIB no termina aquí porque son muchos los compañeros y amigos encontrados a lo largo de estos años. Los momentos vividos con todos ellos no solo se caracterizan por las horas de ocio, sino que entre risa y cervecita, o durante una conversación en los pasillos del CIB o en la sala de café, también nos asesoramos y aconsejamos en técnicas de laboratorio y experimentales. Así que no puedo olvidarme de Noe, la dominatrix del Western Blot, Carol y MariPaz que están haciendo las Américas y la pareja “vikinga” más emblemática del CIB: Rodri y Virginia. Y un enorme “gracias” a tantos otros como Angélica, Jelena, Carlos, Asier, Zbynek, Lenka, JuanFran, Sheila, Cristina, Elvira, Irene, Inés, Isabel, Jenny, Laura, Lola, Mateo, Noemi (nuestra rubia), Úrsula, con los que he compartido buenos momentos e intercambiado conocimientos científicos y trucos experimentales. Mención especial tiene todo el personal del Animalario del CIB ya que sin su ayuda no hubiese podido llevar a buen puerto el estudio de nuestro modelo animal. Gracias a Manolo, Pablo, Tomás, “Gester” (mi ojito derecho), Marta, Mariló (Esther), Andrés, Olivia, Paco y a todo el equipo por su ayuda, disponibilidad y paciencia. Formáis un gran equipo y si pudiera os llevaría a todos conmigo para poder seguir trabajando con modelos animales.

Dentro del CIB también he tenido la oportunidad de conocer a Pedro, el mago de la citometría. Gracias por ayudarme a entender esta técnica y saber manejarme en el citómetro y por pasar parte de tu tiempo ayudándome a mí y a tantos otros en los análisis. Y, ¡cómo no por llevarnos de excursión por la sierra de Madrid! Gracias a Mayte y al personal del servicio de confocal por su ayuda en la adquisición de imágenes. Aprovecho la ocasión para agradecer al Dr. Santiago Rodríguez de Córdoba por su colaboración en la recogida de muestras de donantes y por su labor de cotutor del CIBERER, al Dr. José María Rojo por ayudarnos con el cultivo de linfocitos, al Dr. José Alberto García por sus consejos en el uso de anticuerpos para la detección de endoglina en macrófagos, y al Dr. José María Zubeldia del hospital Gregorio Marañón por su asesoramiento en la valoración de Inmunoglobulinas y por su colaboración en la valoración de los procesos alérgicos en nuestro modelo de ratón.

Un capítulo aparte al del CIB y de gran importancia para esta tesis doctoral es la gran familia de “raros” de la Asociación Española de la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria. En primer lugar quiero agradecerle al Dr. Roberto Zarrabeitia toda su ayuda prestada en la obtención de muestras y datos clínicos de pacientes de HHT. Gracias también por ayudarme a comprender e interpretar la jerga médica que me resulta distante desde mi experiencia de bióloga. Mi gratitud también al Dr. Serra del Hospital Italiano de Buenos Aires por su colaboración en el estudio de procesos infecciosos y alérgicos en HHT. El objetivo final de esta tesis es hallar respuestas a cuestiones sin responder vinculadas al síndrome HHT, sin embargo no siempre encontramos las respuestas esperadas. La ciencia es como un pasillo lleno de puertas detrás de las que puedes encontrar las respuestas a las preguntas planteadas, pero habitualmente éstas están cerradas y debes continuar el camino hacia adelante hasta encontrar la llave que te abra la puerta de aquello que estabas buscando. Aún quedan tantas cuestiones por responder sobre el síndrome HHT y, en un camino conjunto con los profesionales clínicos, tantas cosas que podrán ir desarrollándose para mejorar la calidad de vida del paciente. Así que durante esta búsqueda, las palabras de apoyo, la confianza depositada y el calor recibido por los pacientes en nuestros encuentros en el CIB o en las reuniones de la asociación, nos son de gran ayuda para seguir adelante. Me alegro mucho de haber tenido

la oportunidad de conocer a parte de la familia HHT y no puedo pasar por esta sección sin mandar un abrazo y mostrar mi gratitud a Oscar y Joan Josep Caberol, Santiago de la Riva, Patro y Paco Verde, Raquel (Soraya) y Bienve, Luis y Ana, Rebeca Andradadas, Elizabeth Zabalza, José Sánchez, Montse Vives, Manuel Machado, Ángel Relancio (siempre estarás en nuestro recuerdo) y tantos otros que he tenido el placer de conocer.

A mi familia y amigos tengo que agradecerles su apoyo durante estos años. Aunque hemos estado relativamente cerca, el trabajo no me ha permitido veros lo que me hubiese gustado, pero es reconfortante saber que siempre estáis ahí, a mi lado. A mis padres tengo que agradecerles que hayan sido un ejemplo de honradez y de constancia en el trabajo, espero que al llegar el día de la defensa podáis entender un poquito algo de lo que he estado haciendo estos años en Madrid y que podáis sentirnos orgullosos. Stela, eres fuerte y tienes un gran corazón, sigue adelante trabajando duro que todo llegará, te quiero hermanita. Bruno y Vittoria, gracias por vuestras palabras de confianza y por todo el cariño recibido. Ruth, Leo, Vane, no podía haber encontrado unas mejores amigas. Han ido pasando los años y las personas, y ahí estamos “las de toda la vida”. Volver a casa y saber que tengo a mi familia y a vosotras, no tiene precio, me siento afortunada.

Y lo mejor para el final, tengo la suerte de tener dos grandes hombres en mi vida. Vincenzo, gracias por estar a mi lado, la distancia ha sido difícil para ambos y ahora que estamos juntos has sido un gran apoyo durante la elaboración y la redacción de la tesis, periodo en el cual has tenido que tirar de paciencia ante mis nervios y frustraciones. Gracias también por depositar tanta ilusión en un proyecto de vida juntos y por ser el mejor papá del mundo, te quiero. A mi pequeño gran hombre, por lo que a la tesis se refiere tengo que decirle que me lo ha puesto algo complicadito. Pero, ¿sabes una cosa, Matteo? Cualquier esfuerzo está recompensado con una sonrisa tuya y por disfrutar de tu carita de victoriosa felicidad ante nuevos descubrimientos y grandes logros como aprender a caminar o meter un objeto dentro de otro. Tú aún no eres muy consciente, pero algún día sabrás que mamá te quiere mucho más de lo que puedas imaginar.



*A mis padres*



## ABREVIATURAS

---

**aa:** aminoácido

**Ac:** anticuerpo

**ACVRL:** *Activin A receptor type II-like 1*, gen de ALK1 humano

**Acvrl1:** gen de Alk1 murino

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ácido desoxirribonucleico complementario a la hebra de ARN

**Ag:** antígeno

**ALK:** *Activin receptor like kinase*.

**Ang-2:** angiopietina 2

**APC:** *Antigen-Presenting Cell*, célula presentadora de antígeno

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**BMDM:** *Bone Marrow Derived Macrophages*. Macrófagos derivados de médula ósea.

**BMP:** *Bone Morphogenetic Protein*. Proteínas morfogenéticas óseas.

**BSA:** Albúmina sérica bovina

**CD:** *Cluster of Differentiation*, conjunto de diferenciación.

**CD:** célula dendrítica

**CF:** citometría de flujo

**CLP:** *Common lymphoid progenitor*. Progenitor linfoide común.

**CMP:** *Common myeloid progenitor*. Progenitor mieloide común.

**CPA:** Célula presentadora de antígeno

**CT:** tomografía computerizada

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**dNTPs:** Desoxirribonucleótidos trifosfato

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**EGF:** Factor de crecimiento epidérmico (*Epidermal Growth Factor*).

**ENG:** gen de endoglina humano

**eng:** gen de endoglina murino

**eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial (*Endothelial Nitric Oxide Synthase*)

**ELISA:** *Enzyme-linked immunoabsorbent assay*. Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas

**EST:** *Expressed sequence tag*, marcador de secuencia expresada.

**Fab:** *antigen-binding Fragment*, fragmento de unión de la IgG.

**Fc:** fragmento cristalino de la IgG.

**FGF:** *Fibroblast Growth Factor*, factor de crecimiento de fibroblastos.

**FITC:** *Fluorescein isothiocyanate*, isotiocianato de fluoresceína.

**FMO:** *fluorescence minus one*

**FS:** *Forward Scatter*.

**GI:** gastrointestinal.

**GMP:** *Granulocyte-macrophage progenitor*. Progenitor de granulocitos y macrófagos.

**G-CSF:** *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*. Factor estimulador de las colonias de granulocitos.

**GDF2:** *Growth Differentiation Factor 2*. Factor de crecimiento y diferenciación 2.

**GM-CSF:** *Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor*. Factor estimulador de las colonias de granulocitos-macrófagos.

**HHT:** *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*, Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria.

**HSC:** *Hematopoietic Stem Cell*, célula madre hematopoyética.

**ID1:** Inhibidor de la diferenciación 1.

**IFM:** intensidad de fluorescencia media

**IFN- $\gamma$ :** interferon gamma

**Ig:** inmunoglobulina

**IHF:** inmunohistofluorescencia

**IHQ:** inmunohistoquímica

***Inhba*:** *Activina-A* (Gen)

**iNos:** *Inducible Nitric Oxide Synthase*, oxido nítrico sintasa inducible.

**IL-1 $\beta$ :** interleuquina 1 beta

**IL-2:** interleuquina 2

**IL-6:** interleuquina 6

**IL-12:** interleuquina 12

**IL-12p40:** interleuquina 12 subunidad p40

**IP:** inmunodeficiencia primaria

**kDa:** Kilodalton.

**KO:** *Knock-Out mouse*, ratón nulo.

**LPM:** *Large Peritoneal Macrophages*, macrófagos peritoneales de gran tamaño.

**Log:** Logaritmo

**LPS:** Lipopolisacárido

**MAV:** Malformación Arteriovenosa

**M-CSF:** *Macrophage-Colony Stimulating Factor*. Factor estimulador de las colonias de monocitos.

**MEP:** *Megakaryocyte-Erythrocyte Progenitor*. Precursor común de megacariocitos y eritrocitos.

**MHC clase I o II:** *Major Histocompatibility Complex*. Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I o II.

**µg:** microgramos.

**ml:** mililitros.

**MMP:** *Matrix Metalloproteases*, metaloproteasas de matriz.

**MNC:** *Mononuclear cells*. Células mononucleares.

**Mo:** monocito.

**MΦ:** macrófago.

**MOR:** Médula ósea roja.

**NF-κB:** *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B Cells*, Factor nuclear kappa B.

**ng:** nanogramos.

**NK:** *Natural Killer*.

**NO:** *Nitric Oxide*, óxido nítrico.

**Nos2:** véase iNos.

**OD:** *Orphan Domain*, Dominio huérfano.

**PAI-1:** *Plasminogen Activator Inhibitor-1*, Inhibidor del activador del plasminógeno-1.

**Pb:** pares de bases.

**PBS:** *Phosphate Buffered Saline*, tampón fosfato salino.

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa.

**PFA:** paraformaldehído.

**pg:** picogramos.

**PMN:** polimorfonucleares.

**PS:** Péptido Señal.

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear.

**ROS:** *Reactive Oxygen Species*, intermediarios reactivos de oxígeno.

**rpm:** revoluciones por minuto.

**R-Smad:** Smad regulada por receptor.

**RT-PCR:** *Retro Transcription Polymerase Chain Reaction*, reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa.

**sEng:** endoglina soluble.

**S-Endoglina:** isoforma corta de endoglina.

**SFB:** Suero Fetal Bovino.



**SPM:** *Small Peritoneal Macrophages*, macrófagos peritoneales pequeños.

**SRIS:** Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica.

**SS:** *Side scatter*.

**TβRI y TβRII:** Receptores I y II de TGF-β.

**TGF-β:** Factor de crecimiento transformador beta.

**Th:** *T Helper*.

**TIA:** *Transient ischemic attack*, accidente isquémico transitorio.

**TNF-α:** Factor de necrosis tumoral alfa.

**TLR:** *Toll-like receptors*, receptores tipo Toll.

**U937:** Células de linfoma histiocítico agudo.

**VEGF:** *Vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento endotelial.

**VSMC:** *Vascular Smooth Muscle Cells*, Células musculares lisas de la vasculatura.

**ZP:** Zona Pelúcida.

### Biomarcadores plasmáticos y alteraciones de la respuesta inmunitaria en la Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT)

La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT) también conocida como síndrome de Rendu-Osler-Weber es una enfermedad rara caracterizada por la presencia de paredes vasculares débiles que dan lugar a la aparición de malformaciones arteriovenosas (MAVs). Las MAVs pueden presentarse en piel y mucosas dando lugar a la aparición de Telangiectasias, y aquellas presentes en la mucosa nasal dan lugar a epistaxis (sangrados nasales recurrentes). Las MAVs de mayor tamaño pueden presentarse en órganos internos como pulmón, hígado y cerebro y su evolución puede desencadenar hemorragias internas que podrían tener consecuencias fatales para el paciente si no son localizadas precozmente y tratadas. En la actualidad, el diagnóstico de HHT se realiza en base a los Criterios clínicos de Curaçao, basados en la sintomatología clínica clásica HHT y teniendo en cuenta si existe un componente hereditario. Existen 5 tipos de HHT clasificadas en base al gen o locus afectado. En más del 90% de los casos las mutaciones están localizadas en *ENG* (gen endogлина) o *ACVRL1* (gen ALK-1), que dan lugar a la HHT1 y HHT2, respectivamente. En el 10% de los casos restantes la mutación puede localizarse en un locus del cromosoma 5 (gen sin identificar), un locus del cromosoma 7 (gen sin identificar) o bien en *GDF2* (gen BMP9). Finalmente, ha sido identificado un síndrome conocido como poliposis juvenil asociado a la HHT causado por mutaciones en *MADH4* (gen Smad4). Todos los genes identificados codifican proteínas pertenecientes al sistema de señalización de TGF- $\beta$ 1. El diagnóstico HHT viene confirmado mediante el diagnóstico genético, pero éste puede prolongarse en el tiempo en especial cuando no existe un caso índice en la familia. Bien sea por el desconocimiento de la mutación familiar o porque los individuos no cumplen los criterios de Curaçao, frecuente en edad infantil o individuos jóvenes, un diagnóstico precoz alternativo al genético sería de gran utilidad para poder iniciar el *screening* del paciente lo antes posible y aplicar un tratamiento en el caso de que fuese necesario, traduciéndose ello en una mejora de la calidad de vida. Es por ello que uno de los primeros objetivos del presente trabajo fue hallar un mecanismo sencillo y rápido de realizar un diagnóstico a partir de muestras sanguíneas. En consecuencia, hemos establecido una fórmula diagnóstica mediante la valoración de los niveles de endogлина soluble (sEng) y angiopoietina-2 (Ang-2), que nos permite identificar a los individuos afectados de HHT1 o HHT2 con una elevada fiabilidad y rápidamente puesto que en 6 horas se pueden realizar las valoraciones mediante técnicas de ELISA.

Como se ha mencionado anteriormente, la HHT se caracteriza por la presencia de MAVs cuya localización y/o el resultado de hemorragias derivadas de las mismas, dan lugar a los síntomas clásicos que constituyen a su vez los criterios clínicos de Curaçao. Si bien, en los últimos años son varios los estudios y publicaciones que sugieren que la HHT podría estar relacionada con una deficiencia en la respuesta inmunitaria. Algunas publicaciones muestran que hay una mayor incidencia y recurrencia de enfermedades infecciosas en pacientes HHT. Se han descrito abscesos cerebrales, osteomielitis, espondilodiscitis y sepsis entre otros, normalmente causados por patógenos oportunistas siendo uno de los microorganismos más comunes el *Staphylococcus aureus*. En base a ello, se realizó un análisis retrospectivo de las

historias clínicas de una cohorte HHT para comprobar la incidencia de determinadas infecciones, de cuyos resultados podemos concluir que en la población HHT española, se observa una mayor incidencia de determinados procesos infecciosos en comparación con la población general. Además de las infecciones, la expresión de endogлина y ALK1 durante la transición monocito-macrófago hace sospechar que la respuesta inmunitaria puede estar afectada en el paciente HHT. Por ello, el siguiente paso fue analizar los niveles de expresión génica mediante *microarrays* de ADN en macrófagos de pacientes HHT diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica. De ellos se concluye que 27 genes están inducidos mientras que 185 están reprimidos, respecto a controles no HHT. Dentro del listado de genes reprimidos, comprobamos que una gran parte interviene en procesos de la respuesta inmune. Estos estudios se complementaron con la evaluación de la producción de citoquinas por parte de la fracción MNC de pacientes HHT.

Para profundizar en el estudio de la respuesta inmunitaria en el paciente de HHT, se generó un ratón deficiente en endogлина en macrófagos (*Eng<sup>f/f</sup>LysMCre*). Tras su caracterización, se realizaron ensayos para evaluar la respuesta inmunitaria. Los resultados de supervivencia a un shock séptico sugieren que la expresión de endogлина en el macrófago es importante para la iniciación de la respuesta inmune frente a infecciones. Además de esto, hemos observado que el reclutamiento de células inflamatorias tras inducir una peritonitis y la fagocitosis, son procesos que se ven afectados en ausencia de la expresión de endogлина en macrófagos. Tras la evaluación de algunos genes diana de TGF- $\beta$  en los macrófagos peritoneales, postulamos que endogлина y ALK1 modulan el sistema de señalización de TGF- $\beta$  en monocitos en diferenciación y macrófagos maduros. De este modo, la haploinsuficiencia en endogлина y ALK1 dará lugar a una disfunción de la respuesta inmune, que sería la causa subyacente a la mayor incidencia de enfermedades infecciosas reportadas en la literatura y también descritas en la presente tesis. En conjunto, los datos indican que sería necesario, a nivel clínico, ampliar la sintomatología clásica vascular asociada al síndrome de HHT, añadiendo una inmunodeficiencia o fallo de la respuesta inmune innata. Incluyendo estos factores en el seguimiento de los pacientes HHT, se podría mejorar su asesoramiento y supervisión por parte del personal clínico y, prevenir la aparición de determinadas infecciones o bien en su defecto, paliar las complicaciones serias de infecciones severas como los abscesos cerebrales y las bacteremias.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....                                                             | <b>1</b>  |
| 1. La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria .....                                       | 3         |
| 1.1. Manifestaciones clínicas .....                                                      | 4         |
| 1.2. Procesos infecciosos asociados al síndrome HHT .....                                | 8         |
| 1.3. Criterios clínicos y de diagnóstico .....                                           | 10        |
| 1.4. Otros criterios de diagnóstico: marcadores moleculares en HHT .....                 | 12        |
| 1.5. Genética de la HHT .....                                                            | 15        |
| 1.6. Correlación genotipo-fenotipo .....                                                 | 16        |
| 1.7. Bases moleculares .....                                                             | 18        |
| 1.8. Principales proteínas implicadas en HHT: Endoglina y ALK-1 .....                    | 19        |
| 1.8.1. Endoglina .....                                                                   | 19        |
| 1.8.2. Isoformas de endoglina .....                                                      | 21        |
| 1.8.3. ALK-1 .....                                                                       | 23        |
| 2. Modelos animales en HHT .....                                                         | 24        |
| 2.1. Modelos deficientes en <i>eng</i> .....                                             | 25        |
| 2.2. Modelos deficientes en <i>Acvr11</i> .....                                          | 29        |
| 2.3. Modelos condicionales y específicos .....                                           | 30        |
| 2.4. Formación de MAVs: Teoría de los tres eventos .....                                 | 33        |
| 3. Sistema de señalización de TGF- $\beta$ .....                                         | 34        |
| 3.1. TGF- $\beta$ 1 en el sistema endotelial .....                                       | 36        |
| 3.2. Alteraciones del sistema de señalización de TGF- $\beta$ en HHT .....               | 38        |
| 3.3. Papel de TGF- $\beta$ en el sistema inmunológico .....                              | 40        |
| 3.4. Acción del TGF- $\beta$ sobre el monocito/macrófago .....                           | 43        |
| 3.4.1. Acción del TGF- $\beta$ sobre el monocito .....                                   | 43        |
| 3.4.2. Acción del TGF- $\beta$ sobre el macrófago .....                                  | 44        |
| 4. El macrófago .....                                                                    | 45        |
| 4.1. Respuesta inmune innata .....                                                       | 45        |
| 4.2. El macrófago: rasgos generales .....                                                | 46        |
| 4.3. Fenotipo M1/M2 .....                                                                | 46        |
| 4.4. Origen de los macrófagos: hematopoyesis .....                                       | 48        |
| 4.5. El monocito: rasgos generales del precursor del macrófago .....                     | 50        |
| 4.6. Origen de los macrófagos tisulares: auto-renovación .....                           | 52        |
| 4.7. Macrófagos tisulares .....                                                          | 53        |
| 4.7.1. Macrófagos peritoneales .....                                                     | 56        |
| <b>II. OBJETIVOS</b> .....                                                               | <b>59</b> |
| <b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....                                                     | <b>63</b> |
| 1. Características de los donantes incluidos en los análisis .....                       | 65        |
| 1.1. Características de los pacientes HHT y donantes sanos incluidos en el estudio ..... | 65        |
| 1.2. Análisis de la incidencia de procesos infecciosos .....                             | 65        |

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.3. Evaluación de los valores analíticos en la población HHT .....                                               | 65 |
| 2. Aislamiento de células y cultivos celulares .....                                                              | 66 |
| 2.1. Obtención de plasma y fracción de MNCs de sangre periférica .....                                            | 66 |
| 2.2. Cultivo de MNCs humanas .....                                                                                | 67 |
| 2.2.1. Tratamiento con el agente inflamatorio LPS .....                                                           | 67 |
| 2.3. Obtención de células de origen murino .....                                                                  | 67 |
| 2.3.1. Obtención de leucocitos de sangre periférica .....                                                         | 68 |
| 2.3.2. Aislamiento de células de la cavidad peritoneal .....                                                      | 68 |
| 2.3.2.1. Obtención de células de la cavidad peritoneal tras peritonitis<br>mediada por zymosan .....              | 69 |
| 2.3.3. Aislamiento de células de Kupffer .....                                                                    | 69 |
| 2.3.4. Obtención de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) .....                                             | 69 |
| 2.4. Cultivo de la línea de linfocitos SR.D10-CD4 F1 .....                                                        | 70 |
| 2.5. Cultivo de macrófagos peritoneales .....                                                                     | 70 |
| 2.5.1. Tratamiento con TGF- $\beta$ 1: inhibición de la inflamación mediada por LPS .....                         | 70 |
| 3. Análisis de la expresión de ARN .....                                                                          | 70 |
| 3.1. Extracción de ARNm de MNCs .....                                                                             | 70 |
| 3.2. Extracción de ARN y PCR cuantitativa a tiempo real de células de origen murino .....                         | 71 |
| 4. Estudio de expresión diferencial por <i>Microarrays</i> de ADNc .....                                          | 72 |
| 4.1. Hibridación y detección de la señal .....                                                                    | 72 |
| 4.2. Análisis estadístico de los datos: selección de genes diferencialmente expresados .....                      | 73 |
| 4.3. Análisis funcional .....                                                                                     | 74 |
| 5. Generación y caracterización de un modelo murino con ausencia de expresión<br>de endogлина en macrófagos ..... | 75 |
| 5.1. Líneas parenterales y cruces establecidos .....                                                              | 75 |
| 5.2. Genotipado por PCR .....                                                                                     | 76 |
| 5.3. Análisis hematológico .....                                                                                  | 78 |
| 5.4. Análisis microbiológico y necropsia .....                                                                    | 78 |
| 5.5. Análisis de la fagocitosis .....                                                                             | 79 |
| 5.5.1. Fagocitosis <i>in vitro</i> .....                                                                          | 79 |
| 5.5.2. Fagocitosis <i>in vivo</i> .....                                                                           | 80 |
| 5.6. Inducción de shock séptico .....                                                                             | 81 |
| 5.7. Ensayo de migración celular .....                                                                            | 81 |
| 5.8. Transmigración <i>in vivo</i> .....                                                                          | 81 |
| 6. Análisis de la expresión de proteínas .....                                                                    | 81 |
| 6.1. ELISA .....                                                                                                  | 81 |
| 6.1.1. Valores de sEng y Ang-2 en plasma .....                                                                    | 82 |
| 6.1.2. Producción de citoquinas/quimioquinas en MNCs .....                                                        | 82 |
| 6.1.3. Muestras de origen murino .....                                                                            | 83 |
| 6.2. Citometría de flujo .....                                                                                    | 83 |
| 6.2.1. Fenotipado celular con fluorocromos .....                                                                  | 83 |
| 6.2.2. Expresión de endogлина en leucocitos .....                                                                 | 84 |
| 6.3. Microscopia de inmunofluorescencia .....                                                                     | 85 |
| 6.3.1. Inmunohistofluorescencia .....                                                                             | 85 |
| 6.3.2. Inmunocitofluorescencia .....                                                                              | 86 |

|                                                                                                                                              |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 7. Análisis estadístico .....                                                                                                                | 87         |
| 8. Aspectos legales .....                                                                                                                    | 88         |
| 8.1. Muestras de origen humano .....                                                                                                         | 88         |
| 8.2. Manipulación experimental de animales .....                                                                                             | 88         |
| <b>IV. RESULTADOS .....</b>                                                                                                                  | <b>89</b>  |
| 1. Diagnóstico diferencial de HHT1 y HHT2 mediante la valoración de Ang-2 y sEng en plasma .....                                             | 91         |
| 1.1. Niveles reducidos de Ang-2 y sEng en plasma de pacientes HHT .....                                                                      | 91         |
| 1.2. Análisis discriminante .....                                                                                                            | 92         |
| 2. Procesos infecciosos en la población HHT española .....                                                                                   | 94         |
| 2.1. Incidencia de infecciones .....                                                                                                         | 94         |
| 2.2. Hemogramas, perfiles bioquímicos generales y cuantificación de inmunoglobulinas .....                                                   | 97         |
| 3. Expresión génica diferencial en MNCs de pacientes HHT .....                                                                               | 99         |
| 3.1. Procesos funcionales afectados en MNCs de pacientes HHT .....                                                                           | 101        |
| 3.2. Validación de proteínas componentes de la Respuesta Inmune .....                                                                        | 103        |
| 4. Expresión de endogлина en macrófagos de ratón .....                                                                                       | 104        |
| 4.1. Inducción de la expresión de endogлина durante la diferenciación <i>in vitro</i> de monocitos .....                                     | 104        |
| 4.2. Expresión de endogлина en macrófagos tisulares .....                                                                                    | 107        |
| 4.3. Diferenciación de monocitos reclutados a cavidad peritoneal .....                                                                       | 109        |
| 4.3.1. Inducción de la expresión de endogлина durante la transición <i>in vivo</i> monocito/macrófago .....                                  | 111        |
| 5. Generación de un modelo <i>knock-out</i> de endogлина en linaje mieloide .....                                                            | 112        |
| 5.1. Establecimiento de las líneas experimentales y su identificación mediante genotipado por PCR .....                                      | 112        |
| 5.2. Eficiencia de acción de la recombinasa Cre .....                                                                                        | 113        |
| 5.3. Especificidad de acción de la recombinasa Cre .....                                                                                     | 115        |
| 5.4. Análisis hematológico .....                                                                                                             | 117        |
| 5.5. Infecciones espontáneas en ratones <i>Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre</i> .....                                                              | 118        |
| 5.6. Análisis de la respuesta inmunitaria en ratones <i>Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre</i> .....                                                 | 121        |
| 5.6.1. Reclutamiento de leucocitos tras una peritonitis mediada por Zymosan .....                                                            | 121        |
| 5.6.2. Actividad fagocítica en macrófagos de la cavidad peritoneal .....                                                                     | 123        |
| 5.6.3. Supervivencia a un shock séptico inducido por LPS .....                                                                               | 125        |
| 5.7. Análisis de la influencia de la delección de <i>eng</i> sobre dianas del TGFβ .....                                                     | 129        |
| 5.7.1. Efecto de la expresión de endogлина sobre la inhibición de TGF-β1 en la inducción de <i>Mmp12</i> y <i>Nos2</i> mediada por LPS ..... | 130        |
| <b>V. DISCUSIÓN .....</b>                                                                                                                    | <b>133</b> |
| 1. Ang-2 y sEng: nuevos biomarcadores en HHT .....                                                                                           | 135        |
| 1.1. Beneficios de un diagnóstico molecular para la evaluación de componentes presentes en sangre.....                                       | 135        |

|                                                                                                                                                         |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 1.2. Diagnóstico de HHT1 y HHT2 .....                                                                                                                   | 136        |
| 1.3. Implicaciones biológicas de niveles reducidos de Ang-2 en el plasma de<br>pacientes HHT .....                                                      | 137        |
| 1.4. Implicaciones biológicas de niveles reducidos de sEng en el plasma de<br>pacientes HHT .....                                                       | 138        |
| 1.5. Búsqueda de nuevos biomarcadores para HHT .....                                                                                                    | 140        |
| 2. Alteraciones inmunológicas en pacientes HHT .....                                                                                                    | 142        |
| 2.1. Procesos infecciosos asociados al síndrome HHT .....                                                                                               | 142        |
| 2.2. El mayor riesgo de infecciones severas y/o infecciones recurrentes<br>en HHT es independiente de una IP .....                                      | 145        |
| 2.3. Medidas preventivas en HHT .....                                                                                                                   | 147        |
| 2.3.1. Profilaxis antibiótica .....                                                                                                                     | 147        |
| 2.3.2. Vacunación .....                                                                                                                                 | 148        |
| 2.3.3. Fármacos .....                                                                                                                                   | 148        |
| 2.3.4. Modificación de las guías internacionales de manejo del paciente HHT .....                                                                       | 149        |
| 3. La haploinsuficiencia en endogлина y Alk-1 altera la expresión de genes<br>implicados en la respuesta inmune .....                                   | 150        |
| 3.1. Evidencias previas de una alteración inmunológica en pacientes HHT .....                                                                           | 150        |
| 3.2. Expresión génica diferencial y alteración de procesos biológicos .....                                                                             | 151        |
| 3.3. Genes de interés para validaciones futuras .....                                                                                                   | 153        |
| 4. Expresión de endogлина en macrófagos de ratón .....                                                                                                  | 155        |
| 4.1. La transición monocito/macrófago .....                                                                                                             | 155        |
| 4.2. Endogлина como marcador de la diferenciación de monocitos de ratón .....                                                                           | 155        |
| 4.3. Diversidad en los niveles de expresión de endogлина y F4/80 entre<br>diferentes macrófagos tisulares .....                                         | 156        |
| 4.4. Dinámica de SPM y LPM durante una peritonitis inducida por Zymosan .....                                                                           | 157        |
| 4.5. Inducción de endogлина durante el reclutamiento de monocitos y su<br>diferenciación a SPM .....                                                    | 159        |
| 4.6. Implicaciones de la expresión de endogлина en macrófagos .....                                                                                     | 161        |
| 5. Papel de endogлина en las funciones del macrófago .....                                                                                              | 162        |
| 5.1. Nueva herramienta en el estudio de las funciones de endogлина en el macrófago<br>de ratón: modelo deficiente en endogлина en linaje mieloide ..... | 162        |
| 5.2. La ausencia de endogлина en el macrófago confiere una predisposición al<br>desarrollo de infecciones por oportunistas .....                        | 163        |
| 5.3. Respuesta inmunitaria ante la deficiencia de endogлина en el linaje mieloide .....                                                                 | 165        |
| 5.4. Papel de endogлина en la señalización del TGF- $\beta$ en el macrófago .....                                                                       | 168        |
| 6. Futuros desarrollos .....                                                                                                                            | 171        |
| 6.1. S-endogлина e inmunosenescencia en macrófagos de pacientes HHT .....                                                                               | 171        |
| 6.2. Liberación de sEng por inflamación .....                                                                                                           | 172        |
| 6.3. Qué esperar de un modelo ALK1 .....                                                                                                                | 173        |
| <b>VI. CONCLUSIONES .....</b>                                                                                                                           | <b>175</b> |
| <b>VII. BIBLIOGRAFIA .....</b>                                                                                                                          | <b>183</b> |

|                                               |            |
|-----------------------------------------------|------------|
| <b>VIII. ANEXOS .....</b>                     | <b>209</b> |
| Publicaciones relacionadas con la tesis ..... | 211        |
| Tablas suplementarias .....                   | 213        |
| Resumen en inglés .....                       | 227        |





### I. INTRODUCCIÓN

|                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Médicos que asociaron el síndrome Rendu-Osler-Weber a una herencia familiar .....                                                        | 3  |
| <b>Figura 2.</b> Evolución de una telangiectasia cutánea.....                                                                                             | 5  |
| <b>Figura 3.</b> Base genética y sintomatología HHT .....                                                                                                 | 7  |
| <b>Figura 4.</b> Absceso cerebral y spondilodiscitis .....                                                                                                | 9  |
| <b>Figura 5.</b> Criterios de diagnóstico clínico de Curaçao .....                                                                                        | 12 |
| <b>Tabla 1.</b> Compuestos presentes en plasma analizados en la población HHT .....                                                                       | 14 |
| <b>Tabla 2.</b> Genes y locus implicados en HHT .....                                                                                                     | 15 |
| <b>Figura 6.</b> Representación esquemática de las diferentes isoformas de endogлина.....                                                                 | 20 |
| <b>Figura 7.</b> Representación esquemática de la estructura de ALK1 .....                                                                                | 24 |
| <b>Figura 8.</b> Desarrollo del sistema vascular .....                                                                                                    | 26 |
| <b>Figura 9.</b> Alteraciones vasculares en ratones deficientes para endogлина .....                                                                      | 27 |
| <b>Figura 10.</b> Fenotipo similar a HHT1 en ratones <i>eng</i> <sup>+/-</sup> 129/Ola .....                                                              | 28 |
| <b>Figura 11.</b> Alteraciones vasculares en ratones deficientes para ALK1 .....                                                                          | 29 |
| <b>Figura 12.</b> Formación de MAVs en retina de ratón neonato tras la pérdida de expresión de <i>Eng</i> o <i>Acvrl1</i> en de células endoteliales..... | 32 |
| <b>Figura 13.</b> Formación de MAVs en HHT: teoría de los tres eventos .....                                                                              | 34 |
| <b>Figura 14.</b> Señalización de la superfamilia del TGF-β en células endoteliales .....                                                                 | 35 |
| <b>Figura 15.</b> Endogлина modula la señalización de TGF-β1 en la célula endotelial .....                                                                | 38 |
| <b>Figura 16.</b> Modelo de acción de S-endogлина durante la senescencia endotelial .....                                                                 | 40 |
| <b>Figura 17.</b> Regulación de la tolerancia y la inmunidad por el TGF-β .....                                                                           | 41 |
| <b>Figura 18.</b> Efectos pleiotrópicos del TGF-β sobre los leucocitos .....                                                                              | 42 |
| <b>Figura 19.</b> Acción del TGF-β sobre el monocito y macrófago .....                                                                                    | 43 |
| <b>Figura 20.</b> Funciones efectoras de los macrófagos .....                                                                                             | 46 |
| <b>Figura 21.</b> Árbol de linajes celulares presentes en la hematopoyesis en el individuo adulto ....                                                    | 49 |
| <b>Figura 22.</b> Principales características de los macrófagos peritoneales .....                                                                        | 57 |

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 23.</b> Esquema de la obtención de plasma y la fracción de MNCs mediante la técnica de centrifugación en gradiente de densidad .....           | 66 |
| <b>Tabla 3.</b> Oligonucleóticos utilizados para la cuantificación por PCR a tiempo real en células de origen murino .....                               | 71 |
| <b>Tabla 4.</b> Descripción de las mutaciones presentes en los pacientes HHT incluidos en el análisis de la expresión génica en MNCs .....               | 72 |
| <b>Figura 24.</b> Esquema de las sondas MM y PM utilizadas por Affymetrix .....                                                                          | 73 |
| <b>Figura 25.</b> Representación esquemática de las cepas utilizadas para generar un ratón endoglina deficiente específico de linaje mieloide .....      | 75 |
| <b>Figura 26.</b> Representación esquemática del lugar de hibridación de los cebadores Z, Y y X sobre <i>eng</i> .....                                   | 77 |
| <b>Tabla 5.</b> Descripción de cebadores utilizados para el genotipado de los ratones .....                                                              | 77 |
| <b>Tabla 6.</b> Kits de ELISA utilizados en la detección de proteínas solubles .....                                                                     | 82 |
| <b>Figura 27.</b> Representación esquemática de la tinción realizada para la detección de endoglina por citometría de flujo en macrófagos de ratón ..... | 85 |
| <b>Tabla 7.</b> Anticuerpos utilizados en las técnicas de inmunodetección .....                                                                          | 87 |
| <b>IV. RESULTADOS</b>                                                                                                                                    |    |
| <b>Tabla 8.</b> Niveles plasmáticos de Ang-2 y sEng en las poblaciones control, HHT1 y HHT2 .....                                                        | 91 |
| <b>Figura 28.</b> Representación <i>box-plot</i> de los niveles plasmáticos de Ang-2 y sEng en donantes sanos y pacientes HHT .....                      | 92 |
| <b>Tabla 9.</b> Clasificación de los coeficientes de la función .....                                                                                    | 92 |
| <b>Tabla 10.</b> Validación cruzada de los datos obtenidos en la función discriminante del test de Fisher .....                                          | 93 |
| <b>Figura 29.</b> Correlación entre los niveles de Ang-2 y sEng .....                                                                                    | 93 |
| <b>Figura 30.</b> Incidencia de infecciones en la población HHT .....                                                                                    | 95 |
| <b>Tabla 11.</b> Osteomielitis registradas en la población HHT .....                                                                                     | 95 |
| <b>Tabla 12.</b> Abscesos cerebrales y cutáneos en la población HHT .....                                                                                | 96 |
| <b>Tabla 13.</b> Infecciones del sistema digestivo en pacientes HHT .....                                                                                | 97 |
| <b>Tabla 14.</b> Endocarditis en pacientes HHT .....                                                                                                     | 97 |
| <b>Tabla 15.</b> Recuento leucocitario en pacientes HHT .....                                                                                            | 98 |

|                                                                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 31.</b> Porcentaje de pacientes HHT con un déficit de recuento leucocitario .....                                                                                                      | 99  |
| <b>Tabla 16.</b> Niveles de IgG, IgM e IgA en pacientes HHT .....                                                                                                                                | 99  |
| <b>Figura 32.</b> Representación <i>box-plot</i> de los señales de intensidad de los <i>microarrays</i> de ADN .....                                                                             | 100 |
| <b>Figura 33.</b> Representación de los grupos funcionales implicados en procesos biológicos afectados en MNCs de pacientes HHT .....                                                            | 102 |
| <b>Figura 34.</b> Genes compartidos entre grupos GO afectados por la represión génica en MNCs de pacientes HHT .....                                                                             | 103 |
| <b>Figura 35.</b> Producción de citoquinas/quimioquinas en MNCs de pacientes HHT .....                                                                                                           | 104 |
| <b>Figura 36.</b> Fenotipo de leucocitos de sangre periférica .....                                                                                                                              | 105 |
| <b>Figura 37.</b> Expresión de endoglina durante la transición monocito/macrófago .....                                                                                                          | 106 |
| <b>Figura 38.</b> Expresión de endoglina en macrófagos tisulares .....                                                                                                                           | 108 |
| <b>Figura 39.</b> Índice de expresión de endoglina y F4/80 en macrófagos tisulares .....                                                                                                         | 108 |
| <b>Figura 40.</b> Fenotipado de las principales poblaciones de leucocitos en la cavidad peritoneal de ratones C57Bl6 .....                                                                       | 109 |
| <b>Figura 41.</b> Reemplazo de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal por monocitos circulantes .....                                                                                    | 110 |
| <b>Figura 42.</b> Inducción de la expresión de endoglina durante la diferenciación de monocito a macrófago .....                                                                                 | 112 |
| <b>Figura 43.</b> Identificación de los genotipos de ratones experimentales mediante genotipado por PCR .....                                                                                    | 113 |
| <b>Figura 44.</b> Acción de la recombinasa Cre: detección del alelo <i>eng</i> <sup>Δ5-6</sup> .....                                                                                             | 114 |
| <b>Figura 45.</b> Eficiencia de acción de la recombinasa Cre en macrófagos peritoneales .....                                                                                                    | 115 |
| <b>Figura 46.</b> Expresión de endoglina en órganos internos .....                                                                                                                               | 116 |
| <b>Figura 47.</b> Niveles de sEng en suero de ratones <i>Eng</i> <sup>wt/wt</sup> <i>LysMCre</i> , <i>Eng</i> <sup>wt/fj</sup> <i>LysMCre</i> y <i>Eng</i> <sup>fj/fj</sup> <i>LysMCre</i> ..... | 117 |
| <b>Tabla 17.</b> Análisis hematológico de los ratones <i>Eng</i> <sup>wt/wt</sup> <i>LysMCre</i> y <i>Eng</i> <sup>fj/fj</sup> <i>LysMCre</i> .....                                              | 117 |
| <b>Figura 48.</b> Frecuencia de abscesos y localización de las infecciones .....                                                                                                                 | 119 |
| <b>Figura 49.</b> Incidencia de infecciones en ratones reproductores .....                                                                                                                       | 119 |
| <b>Figura 50.</b> Longitud del bazo y microorganismos identificados .....                                                                                                                        | 120 |
| <b>Figura 51.</b> Niveles de sEng en suero de ratones <i>Eng</i> <sup>fj/fj</sup> <i>LysMCre</i> que habían desarrollado una infección espontánea .....                                          | 121 |
| <b>Figura 52.</b> La deficiencia en la expresión de endoglina en el macrófago altera el reclutamiento leucocitario .....                                                                         | 122 |
| <b>Figura 53.</b> La deficiencia en endoglina se traduce en un menor reclutamiento de células mieloides mediado por una peritonitis inducida por Zymosan .....                                   | 122 |
| <b>Figura 54.</b> Fagocitosis <i>in vitro</i> de partículas de Zymosan en macrófagos peritoneales .....                                                                                          | 123 |
| <b>Figura 55.</b> Fagocitosis <i>in vivo</i> de partículas de Zymosan .....                                                                                                                      | 124 |

|                                                                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 56.</b> Niveles de TLR2 en macrófagos peritoneales .....                                                                                                             | 125 |
| <b>Figura 57.</b> Ralentización de la mortalidad frente a una sepsis mediada por LPS<br>en ratones <i>Eng<sup>wt/fl</sup>LysMCre</i> y <i>Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre</i> ..... | 126 |
| <b>Figura 58.</b> Niveles de IL-6, IL-1 $\beta$ y TNF $\alpha$ en la cavidad peritoneal tras un shock<br>séptico inducido por LPS .....                                        | 127 |
| <b>Figura 59.</b> Niveles de IL-6, IL-1 $\beta$ y TNF $\alpha$ en suero tras un shock<br>séptico inducido por LPS .....                                                        | 128 |
| <b>Figura 60.</b> Ensayo de migración celular hacia el exudado de la cavidad peritoneal<br>tras la inducción de un shock séptico mediado por LPS .....                         | 129 |
| <b>Figura 61.</b> Endoglina modula la señalización de TGF $\beta$ 1 en macrófagos .....                                                                                        | 130 |
| <b>Figura 62.</b> Expresión de <i>Nos2</i> y <i>Mmp12</i> tras la inhibición con TGF $\beta$ 1 de la<br>inducción mediada por LPS .....                                        | 131 |
| <b>V. DISCUSION</b>                                                                                                                                                            |     |
| <b>Figura 63.</b> Papel de Ang-2 en los procesos de angiogenesis .....                                                                                                         | 138 |
| <b>Figura 64.</b> Expresión de endoglina durante la diferenciación de SPM a LPM<br>en la cavidad peritoneal .....                                                              | 160 |

# INTRODUCCIÓN



## I. INTRODUCCIÓN

### 1 La Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria

La telangiectasia hemorrágica hereditaria (HHT, del inglés *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia*), también conocida como enfermedad de Osler-Weber-Rendu, es una enfermedad genética que conduce a la formación de vasos sanguíneos anormales en la piel, las membranas mucosas, y a menudo en órganos tales como los pulmones, el hígado y el cerebro. Siendo descrita por primera vez por Sutton en 1864, la enfermedad lleva el nombre de Sir William Osler (médico canadiense), Henri Jules Louis Marie Rendu (médico francés) y Frederick Parkes Weber (dermatólogo inglés), quienes a finales del siglo XIX y principios del siglo XX, identificaron un síndrome de herencia familiar que daba lugar a sangrados nasales (epistaxis), sangrados gastrointestinales y unas estructuras vasculares anómalas (Rendu , 1896; Osler, 1901; Weber, 1907). Será el término apostillado por Hanes en 1909 el que defina el nombre HHT y de mayor uso en la comunidad clínica y científica.



**Figura 1. Médicos que asociaron el síndrome Rendu-Osler-Weber a una herencia familiar.** Henri Jules Louis Marie Rendu era un físico francés que posteriormente se licenció en medicina. En 1877 fue nombrado miembro de la Académie Nationale de Médecine. Sir William Osler era un médico canadiense especializado en medicina clínica. En 1905 se trasladó a Inglaterra y allí permaneció en Oxford hasta su muerte. En 1911 fue nombrado Sir por sus grandes contribuciones en medicina. Frederick Parkes Weber era un dermatólogo inglés. Su nombre ha sido adscrito a diversos síndromes además de la HHT.

La HHT es una enfermedad rara<sup>1</sup> con una prevalencia mundial de 1/5.000-8.000 habitantes (Bideau *et al.*, 1989; Kjeldsen *et al.*, 1999; Dakeishi *et al.*, 2002). Numerosos estudios indican que la HHT es más frecuente de lo que se había pensado en un principio. Su prevalencia varía según la región geográfica que se considere. En el norte de América su

<sup>1</sup> Las enfermedades genéticas catalogadas como "raras" tienen una frecuencia (prevalencia) en la población menor a 5 casos por cada 10.000 habitantes. En HHT la prevalencia sería de entre 1,25 a 2 casos por cada 10.000 habitantes. [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education\\_Home.php?lng=ES](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education_Home.php?lng=ES)

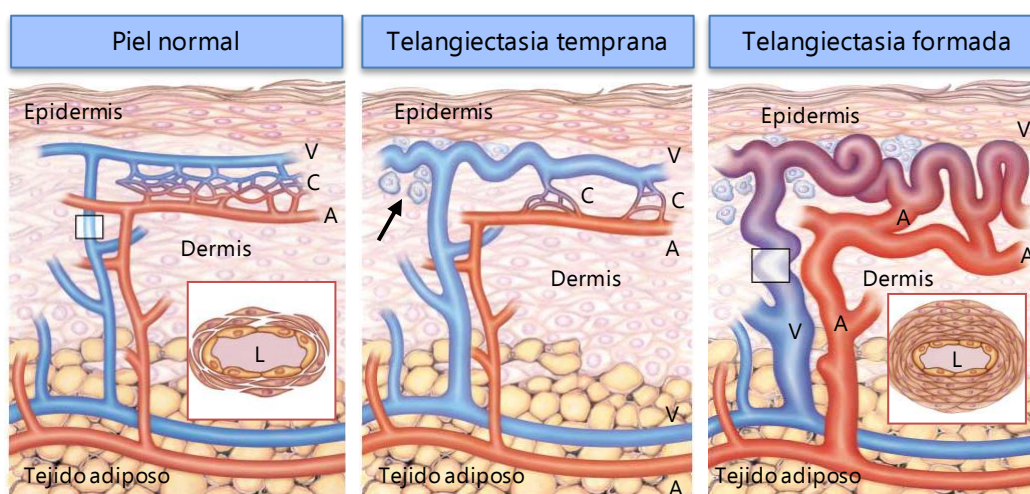


prevalencia se estima en 1/10.000 habitantes (Marchuk *et al.*, 1998), pero probablemente esta estimación esté infravalorada (Guttmacher *et al.*, 2012). Por ejemplo, cuando un individuo es diagnosticado de HHT, es relativamente frecuente encontrar varios individuos afectados en la familia que no habían sido diagnosticados de HHT, pero habían presentado episodios de epistaxis, infarto cerebral trombótico, o sangrados gastrointestinales. Un estudio reciente indica una prevalencia de 1,06/10.000 habitantes en Reino Unido (Donaldson *et al.*, 2014), pero cabe destacar que la insularidad y el efecto fundador da lugar a una mayor prevalencia en algunas regiones geográficas como las Antillas Holandesas, con una prevalencia de 19,4 casos por 100.000 habitantes (Jessurun *et al.*, 1993), la región de Fyn en Dinamarca con 15,6 por 100.000 (Kjeldsen *et al.*, 1999), la región de Ain en Francia con 12,5 por 100.000 (Plauchu *et al.*, 1989), Vermont en Estados Unidos con 6,1 por 100.000 (Guttmacher *et al.*, 1994), y 2,5 por 100.000 en Newcastle, Inglaterra (Porteous *et al.*, 1994). En España, se estimaba una prevalencia de 8,2 por 100.000 en Cantabria (Morales *et al.*, 1997), antes de la existencia del Hospital de Sierrallana (Cantabria) como centro de referencia de HHT. Recientemente, Zarrabeitia y colaboradores (2014, datos no publicados) estiman la prevalencia en Cantabria entre 1/5000 – 1/6000 habitantes, habiéndose llegado prácticamente a la saturación de casos de HHT en esta comunidad. En España también se ha descrito un efecto de insularidad, concretamente en Las Palmas de Gran Canaria (Islas Canarias) con una prevalencia estimada de 1 caso por cada 3.000 habitantes (Vázquez *et al.*, 2013). El origen de la mutación fundadora de Las Palmas y su evolución debido a la insularidad está en la actualidad en estudio. En términos generales, la HHT está “infradiagnosticada” debido a que sus manifestaciones clínicas no siempre afectan con la misma severidad, disminuye su detección en pacientes de grupos socioeconómicos más bajos y está influenciada por la región geográfica (Donaldson *et al.*, 2014).

### 1.1 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad están causadas por anomalías de la pared vascular. La HHT se caracteriza por la presencia de múltiples malformaciones arteriovenosas (MAVs), consistentes en la aparición de vasos sanguíneos anormales donde la sangre pasa directamente desde las arterias a las venas sin pasar a través del lecho capilar (Braverman *et al.*, 1990). Estos vasos sanguíneos anormales son frágiles y tienen una mayor tendencia a romperse dando lugar a hemorragias que serán de mayor o menor gravedad dependiendo de su localización. Podemos encontrar dos tipos de lesiones: telangiectasias y MAVs. Las telangiectasias son MAVs de pequeño tamaño y pueden localizarse en labios, lengua, mucosa bucal, cara, pecho y dedos, y es común que aparezcan por toda la mucosa

gastrointestinal de los individuos adultos. En las telangiectasias desarrolladas, las vénulas están claramente dilatadas y se conectan directamente con las arteriolas que también están dilatadas (Figura 2). Debido a las paredes vasculares debilitadas, la disposición retorcida de las vénulas y su proximidad a la superficie de la piel o la membrana de la mucosa, las telangiectasias pueden romperse fácilmente frente a un leve trauma. El término MAV usualmente hace referencia a las “grandes” telangiectasias, que en algunas ocasiones pueden presentarse con un diámetro de uno o más centímetros. Las MAVs se encuentran en distintos órganos, siendo típicamente presentes en pulmón, cerebro e hígado. En el cerebro, normalmente ya se encuentran al momento del nacimiento, mientras que las MAVs localizadas en el pulmón y el hígado evolucionan y crecen a lo largo de los años (McDonald *et al.*, 2011). A diferencia de las telangiectasias, las complicaciones derivadas de las MAVs en órganos internos son debidas a cortocircuitos arterio-venosos, que da lugar a un aumento del gasto cardíaco y, en el pulmón, a la desaturación de la presión arterial de oxígeno. Las MAVs pulmonares también dan lugar a un cortocircuito directo derecha-izquierda para los trombos venosos (estériles o bacterianos) que alcanzan la circulación arterial. Ocasionalmente, una MAV pulmonar puede romperse dando lugar a una hemoptisis.



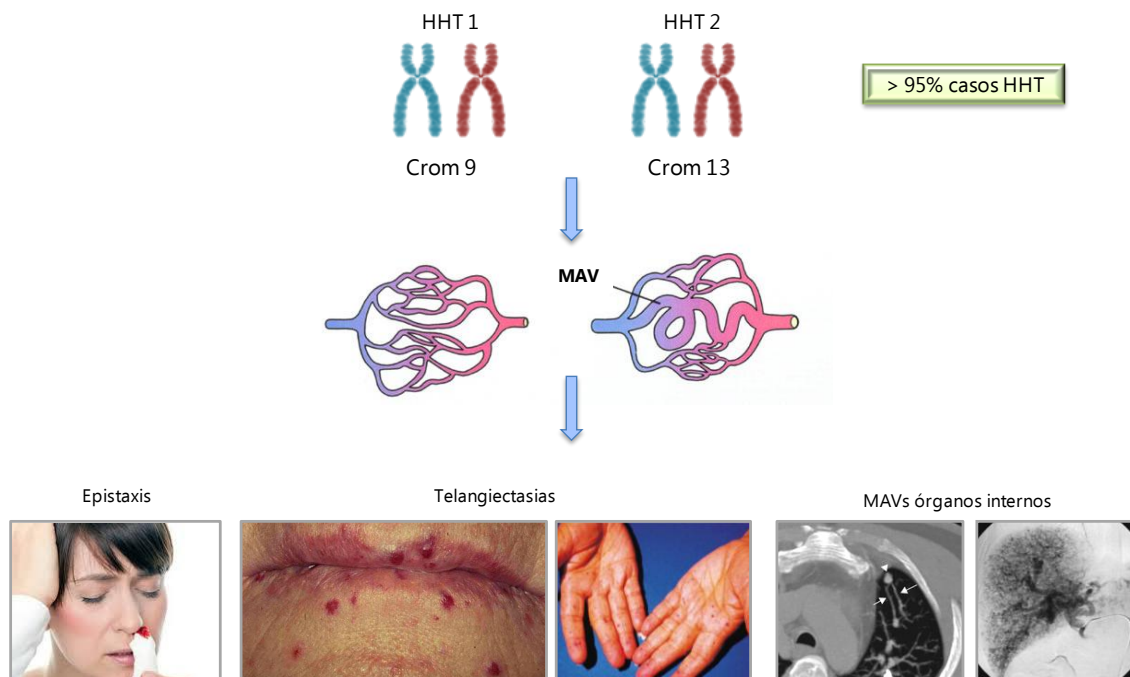
**Figura 2. Evolución de una telangiectasia cutánea.** En la piel normal, las arteriolas (A) de la dermis están conectadas con las vénulas (V) a través de múltiples capilares (C). Estos vasos provienen de arteriolas y vénulas de mayor tamaño presentes en la unión entre dermis y tejido adiposo. La ultraestructura de una vénula postcapilar normal (mostrada en la sección transversal del recuadro) está constituida por el lumen (L), las células endoteliales y entre 2 – 3 capas de pericitos que recubren las células endoteliales. En las primeras fases de la formación de una telangiectasia cutánea, una vénula está engrosada pero aún se mantiene unida a la arteriola a través de uno o más capilares. También aparece un infiltrado linfocitario perivascular (flecha). En una telangiectasia cutánea totalmente formada, la vénula y sus bifurcaciones están dilatadas, alargadas y retorcidas a través de la dermis. Las arteriolas que estaban en conexión también se han dilatado y ahora se comunican directamente con las vénulas sin la intervención de los capilares. El infiltrado perivascular ha aumentado. La pared engrosada de la rama descendente (mostrada en la sección transversal del recuadro) contiene alrededor de 11 capas de células de musculatura lisa. Adaptado de Guttmacher *et al.*, 1995.

El síntoma más común por el que individuos jóvenes con HHT acuden a consulta médica son las epistaxis (sangrados nasales) y las telangiectasias. La mucosa nasal es frágil y pequeñas agresiones como la exposición al aire seco y pequeñas abrasiones, da lugar a sangrados nasales recurrentes. El 95% de los pacientes HHT en algún momento de su vida presentan un episodio de epistaxis recurrente (Berg *et al.*, 2003). La edad de inicio de las epistaxis en un tercio de la población HHT es los 10 años, aproximadamente el 80% ya ha presentado algún episodio de epistaxis a los 20 años y, el 90% ha manifestado epistaxis antes de los 30 años (McDonald *et al.*, 2000). Los sangrados nasales pueden aumentar en frecuencia e intensidad con el incremento de la edad. Su manifestación es muy variable, ya que hay pacientes con epistaxis esporádicas y de escasa cuantía y, otros con epistaxis muy graves y una frecuencia diaria que precisan transfusiones de sangre repetidas (Shah *et al.*, 2002). Tanto es así, que las epistaxis eran una causa común de muerte en HHT antes del desarrollo de las trasfusiones sanguíneas. La variabilidad en los sangrados nasales también la encontramos en distintas etapas de la vida de un paciente, por ejemplo, se ha descrito su aparición o un aumento en frecuencia e intensidad asociado con la pubertad o bien con el embarazo (Shovlin *et al.*, 1995; Begbie *et al.*, 2003). Las telangiectasias mucocutáneas suelen aparecer entre los 5 y 20 años, después de las epistaxis y, tienden a aumentar en número con la edad. Los sitios más comunes de localización son las palmas de las manos, el lecho ungueal, los labios, la lengua y la cara (Porteous *et al.*, 1992). La frecuencia de estas lesiones varía entre el 85 y el 90% (Sabbà *et al.*, 2002; Haitjema *et al.*, 1995).

Aproximadamente, una cuarta parte de los pacientes HHT presenta un episodio de sangrado gastrointestinal en algún momento de su vida debido a la existencia de telangiectasias en la mucosa gástrica (McDonald *et al.*, 2000). Los sangrados gastrointestinales (GI) normalmente inician a partir de los 50 años, siendo suaves pero persistentes, y frecuentemente se acentúan con la edad. Los sangrados GI y las epistaxis son los síntomas que pueden llevar a que una anemia leve evolucione a severa, en muchas ocasiones siendo necesaria una terapia de suplemento de hierro y, en los casos más graves una transfusión de sangre.

Las MAVs pulmonares se presentan en el 30-50% de los pacientes. A su vez, el 70% de los individuos que presentan MAVs pulmonares, están afectados de HHT (White *et al.*, 1994). Suelen ser múltiples y se localizan fundamentalmente en los lóbulos inferiores. Pueden aparecer a cualquier edad de la vida y aumentar de tamaño con el paso del tiempo (Kjeldsen *et al.*, 1999). Aunque no es muy habitual, se han descrito casos de MAVs pulmonares en recién nacidos (Koppen *et al.*, 2002). El paso de aire, trombos y bacterias a través de las MAVs

pulmonares puede dar lugar a un accidente isquémico transitorio o TIA (*transient ischemic attack*), embolia, ictus cerebral y abscesos cerebrales o de otra tipología.



**Figura 3. Base genética y sintomatología en HHT.** En la HHT, debido a las mutaciones en *ENG* o *ALK1*, existe una pérdida de red capilar, produciéndose una conexión directa arteriola-vénula, que da lugar a mezcla de sangre arterial y venosa. Estas malformaciones arterio-venosas pueden encontrarse en piel y mucosas, dando lugar a las telangiectasias, que si se encuentran en la mucosa nasal van a provocar los sangrados que tanto disminuyen la calidad de vida de los pacientes o si se encuentran en órganos internos (cerebro, pulmón o hígado) pueden provocar fístulas que alteran su función.

Las malformaciones vasculares en el sistema nervioso central tienen una frecuencia entre el 9 – 23% en pacientes HHT (*Sabbà et al., 2002; Haitjema et al., 1995; Fulbright et al., 1998; Willemse et al., 2000*), pudiendo estar presentes desde el nacimiento (*Morgan et al., 2002*). Las MAVs cerebrales están presentes en un 10% de la población HHT y su hemorragia es habitualmente el primer síntoma HHT detectado. Las MAVs en médula espinal son menos comunes pero pueden presentarse junto a una parálisis.

La frecuencia de las MAVs hepáticas varía según el método de diagnóstico utilizado: se observó una incidencia del 74% en un estudio que utilizaba la tomografía computerizada (CT) como método de diagnóstico y, un 41% en un estudio en el que se utilizó el diagnóstico mediante ultrasonidos. Las MAVs hepáticas pueden desencadenar un fallo cardíaco, hipertensión portal, o enfermedad biliar. Por fortuna, sólo una minoría de las MAVs hepáticas son sintomáticas (apenas un 8% en el estudio realizado con CT). La hipertensión pulmonar es otra tipología de manifestación vascular pulmonar presente en la población HHT. Es mucho menos frecuente que las MAVs pulmonares, y puede ser a consecuencia de una derivación (*shunting*) arteriovenosa sistémica en hígado que aumenta el gasto cardíaco o ser clínicamente

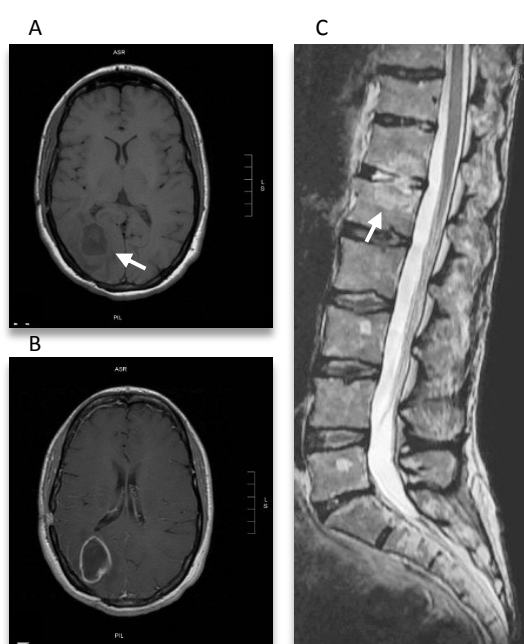
e histológicamente indistinguible de una hipertensión arterial pulmonar idiopática. Las lesiones vasculares en el páncreas son comunes pero raramente tienen una relevancia clínica o comprometen la salud del individuo.

### 1.2 Procesos infecciosos asociados al síndrome HHT

El desarrollo de abscesos cerebrales es una potencial complicación de los pacientes HHT (Hall, 1994; Dong *et al.*, 2001; Shovlin *et al.*, 2008 (b); Mylona *et al.*, 2012). Los abscesos cerebrales son muy raros en la población general (0,4-1,3/100.000) (Nicolosi *et al.*, 1991; Kjeldsen *et al.*, 2014) y en la población HHT se presentan con una frecuencia que puede variar entre el 1%, el 5% y el 5-10% según los autores (Hall, 1994; Galitelli *et al.*, 2006; Sell *et al.*, 2008). Estos pueden derivar en complicaciones médicas fatales para el individuo como la muerte o dejar secuelas neurológicas (Dong *et al.*, 2001; Shovlin *et al.*, 2008). Cabe destacar que en pacientes no diagnosticados, una de las primeras complicaciones que puede aparecer es el absceso cerebral. Una vez comprobada la presencia de un absceso cerebral, se observa la existencia de una MAV pulmonar. La existencia de una MAV pulmonar y el análisis de la historia familiar, conllevan al diagnóstico de HHT mediante los criterios clínicos de Curaçao (Chen *et al.*, 2013). Es por ello que cuando un paciente que acude a consulta se le detecta un absceso cerebral de origen desconocido, debería ser evaluado en primer lugar para comprobar la presencia de MAVs pulmonares y, en segundo lugar, descartar o confirmar que sea un individuo HHT. La HHT es un factor de predisposición al desarrollo de un absceso cerebral por diseminación hematogena ya que en la mayoría de los casos se observa en pacientes que presentan MAVs pulmonares (Gallitelli *et al.*, 2005; Gallitelli *et al.*, 2006; Shovlin *et al.*, 2008 (b)). Las MAVs pulmonares pueden permitir el paso de trombos bacterianos a través de la circulación pulmonar sin pasar por el filtrado de la red capilar, o bien permitiendo la colonización bacteriana de porciones isquémicas del cerebro tras un trombo estéril que se haya formado previamente (Shovlin, 2010). Se considera que la hipoxia cerebral y la policitemia derivada de un cortocircuito derecha-izquierda facilitan el crecimiento bacteriano (Shovlin, 2010). Es esperable por tanto, que los pacientes HHT experimenten periodos de bacteremia debido a que los microorganismos no están expuestos al sistema de células reticuloendoteliales de la red capilar (Shovlin *et al.*, 2008 a).

Los abscesos cerebrales comúnmente se forman por un foco de infección contiguo como el oído medio y los sinusoides paranasales y, con menor frecuencia a partir de una infección bucal o por una diseminación hematogena (bacteremia) (Mathisen *et al.*, 1997). Sin embargo, las bacteremias de origen dental son consideradas una de las principales causas de abscesos cerebrales en pacientes HHT (Shovlin *et al.*, 2008). La naturaleza de los

microorganismos aislados en los abscesos cerebrales es diversa siendo predominante los microorganismos microaerofílicos y bacterias anaerobias encontradas frecuentemente en infecciones endo y periodontales (Shovlin *et al.*, 2008 (b); Mathis *et al.*, 2012), siendo en muchas ocasiones una población polimicrobiota (Hall 1994). En esta ocasión, es la fuente de los microorganismos la que está indicando que los abscesos cerebrales son secundarios a una fístula pulmonar que facilita la diseminación bacteriana. Si bien, además de las bacterias asociadas a infecciones bucales, también se han aislado patógenos cuyo origen no sería la cavidad oral como el *Staphylococcus aureus* (Shovlin *et al.*, 2008; Mylona *et al.*, 2012; Galitelli *et al.*, 2006).



**Figura 4. Absceso cerebral y spondilodiscitis. (A)** Imagen por RMN de un absceso cerebral en un paciente HHT. En la imagen se observa una lesión hipodensa en el lóbulo occipital derecho (flecha blanca), con un resalte del anillo tras la administración del contraste **(B)** Mylona *et al.*, 2012. **(C)** Imagen de resonancia magnética de la columna mostrando una espondilodiscitis localizada en D12-L1 en un paciente HHT. El hemocultivo dio como resultado *Streptococcus mutans*. Musso *et al.*, 2014.

Debido a la gran incidencia en abscesos cerebrales en pacientes HHT en comparación con la población general, el estudio de las infecciones se divide habitualmente en abscesos cerebrales e infecciones extracerebrales. De igual modo que para los abscesos cerebrales, también se ha reportado una mayor incidencia de infecciones extracerebrales en la población HHT (Duval *et al.*, 2001; Dupuis-Girod *et al.*, 2007; Musso *et al.*, 2014) donde la conexión entre MAV en órganos internos y la aparición de infecciones de mayor o menor gravedad, no ha sido analizada en profundidad. Dentro de las infecciones extracerebrales se incluyen septicemias, endocarditis, osteoartritis, osteomielitis, espondilodiscitis (Duval *et al.*, 2001; Musso *et al.*,

2014), abscesos dérmicos (Haarmann et al 2006) abscesos subcutáneos (Kawaguchi et al, 1990) y abscesos hepáticos (Bui et al, 2010). En 2007 se realizó el primer estudio sobre la incidencia de infecciones cerebrales y extracerebrales en la población HHT (Dupuis-Girod et al., 2007). El objetivo de los autores era definir qué tipo de infecciones eran las más frecuentes y los factores de riesgo para la población HHT. Aproximadamente el 13% de los pacientes HHT había padecido infecciones severas, de las cuales más de un 60% eran infecciones extracerebrales entre las que se incluyen septicemia, artritis, osteomielitis, infecciones en piel (abscesos y erisipelas), abscesos musculares, espondilodiscitis, abscesos hepáticos y otras infecciones severas como endocarditis, neumonía, pielonefritis, tuberculosis, rickettsias, y apendicitis agudas y peritonitis. El patógeno más común identificado fue *Staphylococcus aureus*. También se identificaron otros patógenos oportunistas como *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus viridans* y otras especies de *Streptococcus* sin identificar. A rasgos generales, los microorganismos aislados en infecciones cerebrales eran múltiples y de especies anaerobias.

A pesar de los casos infecciosos reportados en la literatura, las funciones inmunológicas en HHT no se han estudiado ampliamente. Queda claro que los abscesos cerebrales son secundarios a las MAVs pulmonares, sin embargo, el mecanismo por el que se producen las infecciones extracerebrales, aún no ha sido determinado. Algunos autores han reportado anomalías en las células polimorfonucleares y monocitos en pacientes HHT (Cirulli et al., 2006), que sugieren que los pacientes HHT podrían presentar una leve inmunodeficiencia. Recientemente se ha observado que pacientes con HHT exhiben anormalidades inmunológicas como la linfopenia en células T CD4, T CD8 y NK, y muestran unos niveles elevados de inmunoglobulinas G y A (Guilhem et al., 2013). Todos estos datos en su conjunto, sugieren que los pacientes con HHT presentan una mayor susceptibilidad a padecer complicaciones infecciosas, donde factores mecánicos asociados a anomalías moderadas del sistema inmune explicarían una mayor incidencia de dichas infecciones.

### 1.3 Criterios clínicos y de diagnóstico

Las manifestaciones clínicas de HHT entre diferentes familias son muy heterogéneas, así como dentro de los miembros de una misma familia (Bourdeau et al., 2001; Sadick et al., 2006). Un comité de expertos se reunió en 1999 y estableció los criterios clínicos de diagnóstico de la HHT conocidos como Criterios de Curaçao<sup>2</sup> (Shovlin et al., 2000) (Figura 5).

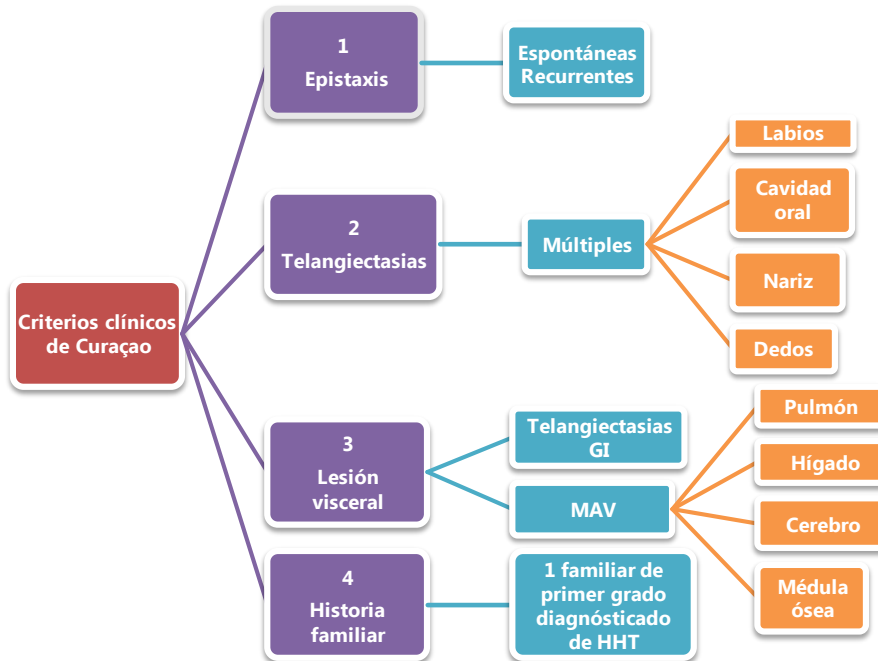
---

<sup>2</sup> Los criterios de Curaçao reciben el nombre de la Isla de Curaçao (Antillas Holandesas), dónde tuvo lugar la reunión del comité constituido por clínicos y científicos expertos en HHT con motivo del congreso internacional de HHT en 1999.

Aunque ha habido revisiones posteriores de los criterios clínicos de diagnóstico de la HHT, como el establecimiento de unas guías internacionales para el diagnóstico y manejo de la enfermedad (Faughnan *et al.*, 2011), el sistema básico con los Criterios de Curaçao sigue siendo la referencia para establecer un primer diagnóstico clínico de HHT. Los criterios de Curaçao se basan en la observación de la presencia de la sintomatología clásica asociada a HHT, además de que debe haber un componente de herencia familiar. El primer criterio son los sangrados nasales o epistaxis. Estos deben ser espontáneos y recurrentes. Por ejemplo, las epistaxis nocturnas inclinan el diagnóstico hacia HHT. El segundo criterio está constituido por las telangiectasias mucocutáneas que deben de ser múltiples y localizarse en sitios característicos como labios, cavidad oral, dedos y nariz. El tercer criterio está constituido por la presencia de malformaciones arteriovenosas viscerales. Las MAVs resultantes de la conexión directa entre arteria y vena. Éstas deben de localizarse en pulmón, cerebro, hígado, médula espinal, páncreas o bien la presencia de telangiectasias gastrointestinales. Estas últimas pueden dar lugar a sangrados. El cuarto criterio de diagnóstico clínico es la historia familiar, dónde debe encontrarse un familiar de primer grado que haya sido diagnosticado de HHT. Finalmente, el diagnóstico clínico de HHT se considera i) definitivo cuando se presentan 3 criterios o más, ii) posible cuando el paciente presenta 2 criterios y iii) poco probable cuando se presenta 1 criterio o ninguno.

Sin embargo, la aplicación de los criterios de Curaçao a niños no es del todo correcta ya que se ha establecido para individuos adultos. Los síntomas y signos de la HHT generalmente se desarrollan durante la infancia y la adolescencia, por lo que la ausencia de epistaxis, telangiectasias o afectación de órganos internos es común en niños. Los niños con un riesgo de ser HHT en virtud de la presencia de un familiar afecto, deberían someterse a un test genético para confirmar o descartar la HHT. En familias dónde la mutación es desconocida, el niño debería de ser evaluado clínicamente a lo largo del crecimiento.





**Figura 5. Criterios de diagnóstico clínico de Curaçao.** Los criterios de Curaçao están constituidos por la presencia de epistaxis, telangiectasias, afectación de órganos internos y la existencia de un componente hereditario (1 familiar de primer grado diagnosticado de HHT). El diagnóstico es definitivo si se cumplen 3 o más criterios, probable si se cumplen dos, y poco probable si se cumple un criterio o ninguno.

### 1.4 Otros criterios de diagnóstico: marcadores moleculares en HHT.

La HHT es fácil de diagnosticar en individuos que presentan la tríada clásica de síntomas (epistaxis, telangiectasias y afectación de órganos internos) y un familiar de primer grado que haya sido diagnosticado de HHT. Sin embargo, es habitual encontrarse con pacientes dónde la HHT se sospecha pero no presentan un diagnóstico HHT claro, o no se ha identificado una variante patogénica en los genes implicados en HHT. Cuando sí se ha observado un componente de herencia familiar pero la sintomatología HHT es muy leve o nula (por ejemplo en infancia y adolescencia), la realización de pruebas genéticas favorecerá la detección de sujetos afectados en una familia y evitará la aplicación de programas de cribado indiscriminados a sus miembros, lo que justifica el coste-efectividad de dicha realización. Pero, si la mutación no ha sido identificada, el diagnóstico se complica y aumentan los costes de forma notable, por lo que sería de gran utilidad identificar biomarcadores alternativos de la enfermedad que facilitaran el diagnóstico frente a estas situaciones. El término biomarcador

hace referencia a una amplia categoría de signos médicos que pueden ser evaluados con exactitud y ser reproducibles.<sup>3</sup>

En los últimos años se han analizado diversos compuestos solubles, microRNAs y diversas aproximaciones metodológicas para establecer diagnósticos alternativos de HHT (Botella *et al.*, 2015). La detección en plasma de proteínas solubles alteradas en las muestras de HHT, sería una de las aproximaciones más sencillas para establecer un diagnóstico más rápido a nivel de laboratorio clínico y menos costoso. Dentro de estos se encuentran la determinación de los niveles sanguíneos de determinadas moléculas tales como VEGF, endoglina soluble (sEng), TGF- $\beta$ 1 o Angiopoyetina-2 (Ang-2) en sangre periférica. Si bien, de momento no forman parte de los criterios de diagnóstico de la enfermedad y deben ser considerados en el contexto de cuadros clínicos compatibles.

Al ser la HHT una enfermedad rara, la población analizada suele ser pequeña para establecer con certeza unos rangos de concentración en plasma o suero para determinados marcadores en la población HHT. Esto también da lugar a resultados contrapuestos en los niveles de algunos de los marcadores analizados que han sido publicados por diferentes grupos (Tabla 1). Por ejemplo, la haploinsuficiencia en *ENG* ha sido relacionada con una menor concentración de TGF- $\beta$ 1 circulante en pacientes HHT1 en comparación con un grupo de pacientes HHT2 y una población control (Letarte *et al.*, 2005). Estas diferencias deberían de ser evaluadas de nuevo puesto que también se ha reportado unos mayores niveles de TGF- $\beta$ 1 en pacientes HHT (Sadick *et al.*, 2005) que no encajan con los niveles anteriormente descritos. Hasta la fecha, diversos autores han comprobado que los niveles de VEGF circulante son más elevados en la población HHT que en la población control (Cirulli *et al.*, 2003; Sadick *et al.*, 2005; Sadick *et al.*, 2008). Cabe destacar que dentro de estos trabajos existe una elevada variabilidad en los niveles de VEGF detectado en la población HHT. Se ha postulado que el aumento notable de VEGF circulante esté relacionado con la presencia de epistaxis severas o sangrados gástricos en la infancia (Giordano *et al.*, 2009). Sin embargo, no se ha observado una clara relación entre presencia de MAVs en órganos internos y niveles de VEGF circulante. Los niveles de endoglina soluble (sEng), la forma circulante de la proteína de membrana resultante de un corte proteolítico, también han sido objeto de estudio sin grandes resultados puesto que no se han observado diferencias entre la población HHT y controles sanos (Letarte *et al.*, 2005).

---

<sup>3</sup> En 1998, el *National Institute of Health* (NIH) *Biomarkers Definition Working Group* definió un biomarcador como “una característica que se puede medir de forma objetiva como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos, o respuestas farmacológicas frente a una intervención terapéutica”.

| Molécula | Población control             | Población HHT                           | Referencia                       |
|----------|-------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------|
| Ang-2    | 1,3 ng/ml                     | ↓0,7 ng/ml                              | Fernandez-L <i>et al.</i> , 2007 |
| sEng     | 0,57 ng/ml                    | 0,52 – 0,70 ng/ml                       | Letarte <i>et al.</i> , 2005     |
| TGFβ1    | 44,0 ng/ml                    | ↓↓ HHT1 → 25,5 ng/ml<br>HHT2 → 40 ng/ml | Letarte <i>et al.</i> , 2005     |
| TGFβ1    | 4 ng/ml                       | ↑↑↑ 56 ng/ml                            | Sadick <i>et al.</i> , 2005      |
| VEGF     | 152,0 pg/ml                   | ↑196,3 pg/ml                            | Cirulli <i>et al.</i> , 2003     |
| VEGF     | 14 pg/ml                      | ↑↑ 249 pg/ml                            | Sadick <i>et al.</i> , 2005      |
| VEGF     | 25 pg/ml<br>(<10 – 172 pg/ml) | ↑↑ 321 pg/ml<br>(10 – 1480 pg/ml)       | Sadick <i>et al.</i> , 2008,     |

**Tabla 1. Compuestos presentes en plasma analizados en la población HHT.** En la tabla se muestran por orden alfabético, los principales compuestos solubles presentes en circulación sanguínea que se han analizado en la población HHT. En la valoración de TGF-β1 se observa resultados contradictorios entre publicaciones y, en VEGF se ha reportado un aumento en los niveles plasmáticos en HHT pero con gran diversidad en sus valores. Ninguno de los componentes mostrado en la tabla ha sido establecido como un marcador de diagnóstico bioquímico para el síndrome HHT.

Los microRNAs, pequeños fragmentos de ARN (≈22 nucleótidos) no codificante, regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional uniéndose a las regiones no traducidas del extremo 3' (3' –UTR) de mRNAs específicos (Bartel, 2009). En los últimos años ha cobrado interés su identificación y uso como biomarcadores de diversas enfermedades. Recientemente se han identificado dos miRNAs diferencialmente expresados en plasma de pacientes HHT. Por un lado está miR-27a, cuyos niveles plasmáticos están elevados y el miR-205 que se encuentra en concentraciones más bajas, casi la mitad, en muestras de pacientes HHT con respecto a la población no HHT (Tabruyn *et al.*, 2013). El miR-27 ha sido descrito como un miRNA con propiedades pro-angiogénicas (Zhou *et al.*, 2011). En contraposición, el miR-205 actuaría como factor anti-angiogénico ya que en los ensayos *in vitro* se ha comprobado que reduce la proliferación, migración y la formación de tubos en células endoteliales. En otro estudio se ha comprobado que los pacientes HHT con MAVs pulmonares presentan niveles significativamente más elevados de miR-210 que los presentes en muestras de pacientes HHT sin MAVs pulmonares o muestras de individuos control (Zhang *et al.*, 2013), lo que sugiere un papel específico de miR-210 a la patología pulmonar en HHT.

Los componentes diferencialmente expresados en HHT no son únicamente de interés por su valor diagnóstico, si no que pueden ser claves en el desarrollo y progreso de la sintomatología HHT. A pesar de los diferentes trabajos publicados, de momento ninguno de los componentes analizados permite distinguir entre el tipo de HHT y/o establecer una correlación genotipo-fenotipo concisa.

### 1.5 Genética de la HHT

La herencia no está ligada al sexo y es autosómica dominante, por lo que cada descendiente de una persona afectada tiene el 50% de probabilidades de padecer la enfermedad. Hasta la fecha se han identificado variantes patogénicas en 4 genes diferentes que dan lugar a la HHT. Pero son 6 las tipologías de HHT descritas en bibliografía, clasificadas según el gen afectado o el locus al cual se han vinculados (Tabla 2). En más del 90% de la población HHT, las mutaciones se localizan en *ENG* y *ACVRL1*, y permiten clasificarlas en dos tipos: HHT1 y HHT2 (Figura 4). En el primero, el gen afectado se localiza en el cromosoma 9 (McAllister *et al.*, 1994) y codifica una proteína transmembrana denominada endogлина. Ésta se expresa especialmente en las células endoteliales, aunque también se encuentra en menor cantidad en los macrófagos y en las células de la musculatura lisa. En la HHT2 la alteración se sitúa en el cromosoma 12 (Johnson *et al.*, 1996), que codifica el receptor tipo kinasa 1 (ALK-1), y que forma parte del complejo receptor TGF- $\beta$ . Están descritas más de 500 mutaciones diferentes en el gen *Endogлина* y más de 400 en el gen de *ACVRL1*<sup>4</sup>, y su mecanismo de actuación es la haploinsuficiencia. Las mutaciones descritas afectan, tanto a regiones codificantes del gen; deleciones, inserciones, mutaciones sin sentido (*missense*), así como a regiones no codificantes como lugares de ajuste (*splicing*), en intrones y, mutaciones en regiones promotoras (Abdalla *et Letarte*, 2006; Fontalba *et al.*, 2013). En la mayoría de los laboratorios, el porcentaje de hallazgo de estas mutaciones en pacientes con HHT oscila entre el 80 y el 90%. El porcentaje de variantes patogénicas en *ENG* y *ACVRL1* es virtualmente equivalente (53% y 47% respectivamente) si el efecto fundador está descartado (Bayrak-Toydemir *et al.*, 2004).

| Gen           | Localización | Proteína  | Tipo HHT | OMIM   |
|---------------|--------------|-----------|----------|--------|
| <i>ENG</i>    | 9q34.11      | Endogлина | HHT 1    | 187300 |
| <i>ACVRL1</i> | 12q13.13     | ALK1      | HHT 2    | 600376 |
| ---           | 5q31.3q32    | ---       | HHT 3    | 601101 |
| ---           | 7p14         | ---       | HHT 4    | 610655 |
| <i>GDF2</i>   | 10q11.22     | BMP9      | HHT 5    | 605120 |
| <i>MADH4</i>  | 18q21.2      | Smad4     | JP-HHT   | 175050 |

**Tabla 2. Genes y locus implicados en HHT.** Se han identificado un total de 4 genes y 2 loci cuyo gen aún no está identificado que dan lugar a HHT. Los diferentes tipos de HHT se clasifican según su genética. Las proteínas de los genes identificados son todos miembros del sistema de señalización de TGF- $\beta$ .

<sup>4</sup> El registro de las variantes patogénicas conocidas en *ACVRL1* y *ENG* se puede consultar en la base de datos de mutaciones en HHT o *HHT Mutation Database*, accesible online en <http://arup.utah.edu/database/HHT/>

Se contempla la implicación de otros genes para aquellos casos dónde la mutación en *ENG* o *ACVRL1*, no ha sido identificada. Estos datos estarían apoyados por la existencia de la HHT3 y HHT4, determinada por pacientes con criterios clínicos de la enfermedad y que mediante análisis de ligamiento, la patología co-segregaba con dos loci; uno en el cromosoma 5 (Cole *et al.*, 2005) y otro locus en el cromosoma 7 (Bayrak-Toydemir *et al.*, 2006) que darían lugar a la HHT tipo 3 y tipo 4, respectivamente. Estudios posteriores de secuenciación de genes candidatos en el locus hallado en el cromosoma 5, no han llegado a identificar un gen, si bien han descartado genes implicados en procesos de angiogenesis como VE-Cadherina y Sprouty4 (Govani *et Shovlin*, 2010). Recientemente se ha descrito una nueva variante de la HHT; la HHT 5 causado por mutaciones en *GDF2* (también conocido como *BMP9*) (Wooderchak-Donahue *et al.*, 2013). Los individuos con la mutación en *GDF2* (miembro de la superfamilia del TGF $\beta$ ) presentaban epistaxis y telangiectasias, y las mutaciones halladas daban lugar a una disminución de la proteína y/o su función. Finalmente, debemos resaltar la existencia de un síndrome combinado con la clínica de HHT, el síndrome de la poliposis juvenil (JP-HHT) dónde las mutaciones están localizadas en el gen *MADH4* que codifica la proteína Smad4, (Gallione, 2006). Todos los genes identificados codifican proteínas que son miembros del sistema de señalización de TGF- $\beta$ .

### 1.6 Correlación genotipo-fenotipo

En primer lugar cabe destacar que aunque las manifestaciones clínicas vasculares tales como epistaxis, telangiectasias y las MAVs en órganos internos son bien conocidas, el síndrome HHT presenta una peculiaridad; no todos los individuos desarrollan las mismas lesiones o con la misma severidad, por lo que habría individuos con una mayor predisposición genética a su aparición. Otro dato a destacar es que las manifestaciones clínicas varían dentro de individuos de una misma familia, por lo que, la penetrancia de la enfermedad puede verse influenciada por la presencia de genes modificadores o la influencia de factores ambientales. En general, muchos pacientes muestran una penetrancia completa de la enfermedad entorno a los 40 años (Shovlin *et al.*, 2010; Faughnan *et al.*, 2011).

Los datos sugieren que no existe en absoluto una correlación genotipo-fenotipo entre las manifestaciones clínicas y un tipo de mutación concreta, pero se ha observado que ciertas manifestaciones clínicas son más comunes en determinados tipos de HHT. Por ejemplo, las MAVs pulmonares son más frecuentes en la HHT1 y presentan cuadros clínicos más graves que la HHT2 (Berg *et al.*, 2003). La prevalencia de MAV en cerebro es 1.000 veces mayor en pacientes HHT1 y 100 veces mayor en pacientes HHT2 que en la población general (10/10.000) (Kim *et al.*, 2008). Las MAV hepáticas son más prevalentes en pacientes HHT2 en comparación

con los pacientes HHT1 (Letteboer *et al.*, 2006). Estos datos permiten que el consejo genético sea más preciso cuando la mutación de la familia es conocida. La hipertensión pulmonar en ausencia de cortocircuito arterio-venoso pulmonar severo, es una manifestación rara en HHT, pero se ha descrito con mayor frecuencia en individuos HHT2 (Trembath *et al.*, 2001; Soubrier *et al.*, 2013).

La HHT presenta una penetrancia dependiente de la edad del individuo, dónde las manifestaciones clínicas se agravan con la edad. El 50% de los pacientes HHT indica haber presentado el primer episodio de epistaxis alrededor de los 10 años. Alrededor de los 21 años entre el 80-90% de los pacientes HHT ya han presentado epistaxis. El 95% de los individuos HHT ha presentado epistaxis a lo largo de su vida. El porcentaje de individuos con telangiectasias es similar al presentado por las epistaxis, la diferencia reside en su edad de aparición, que suele ser entre 5 y 30 años posteriores a la manifestación de las primeras epistaxis (Plauchu *et al.*, 1989; Porteous *et al.*, 1992). La hemorragia intracraneal secundaria a una MAV es el síntoma de presentación de HHT en lactantes y niños (Morgan *et al.*, 2000).

Además de la diferente predisposición a la localización de las MAVs en órganos internos entre pacientes HHT1 y HHT2, también hay una variabilidad existente en la penetrancia de la enfermedad, que no está sólo vinculada a la edad, sino que para una misma mutación, como es el caso de miembros de una misma familia, se encuentran diferencias tanto en el inicio de la aparición de epistaxis y telangiectasia como en la afectación de órganos internos. Estas diferencias indican la presencia de genes modificadores que están modulando la penetrancia y expresividad de los síntomas. Esta hipótesis está apoyada por los trabajos realizados en modelos animales de endoglin. Existen varios modelos animales en HHT1 generados en fondos genéticos diferentes y donde se ha observado una penetrancia de la sintomatología diversa. Por ejemplo, la cepa Ola129 presenta una sintomatología claramente HHT1 que no se observa en la cepa C57Bl6. Estudios posteriores comprobaron que la cepa Ola 129 presentaba una concentración menor de TGF- $\beta$ 1 en plasma que la cepa C57Bl6 (Bourdeau *et al.*, 2001). Los modelos animales generados para el estudio de la HHT se desarrollan en mayor profundidad en próximos apartados de la introducción. La menor concentración de TGF- $\beta$ 1 en plasma asociada a la aparición de epistaxis y telangiectasias en la cepa Ola129 estaría respaldada por los menores niveles de TGF- $\beta$ 1 hallados en la población HHT1 (Letarte *et al.*, 2005). Sin embargo, esta diferencia no explicaría las manifestaciones clínicas en HHT2. A este fenómeno, debemos añadir que hay una gran discrepancia en las concentraciones de esta citoquina en sangre entre diversos autores (Tabla 2). Además de los datos resultantes de los estudios realizados en modelos de ratón, Benzinous y colaboradores (2012) describieron que

determinadas variantes polimórficas de *PTPN14* están influyendo en la severidad clínica de los síntomas en HHT. La búsqueda de nuevos genes modificadores continúa siendo un área de investigación en HHT.

### 1.7 Bases moleculares

Las células endoteliales aisladas de pacientes HHT1 o HHT2 expresan aproximadamente la mitad de los niveles normales de endoglina o ALK-1 (Cymerman *et al.*, 2000; Abdalla *et al.*, 2000). Es por ello que el mecanismo molecular de la enfermedad es la haploinsuficiencia en endoglina y ALK-1, es decir, la cantidad de proteína presente es insuficiente para llevar a cabo las funciones normales de las células endoteliales. Esto ocurre en otros tipos celulares como en los monocitos aislados de sangre periférica de pacientes HHT1. En estas células, los niveles de expresión en membrana de endoglina son menores a aquellos presentados por las células provenientes de donantes no-HHT (Sanz-Rodriguez *et al.*, 2004).

Para investigar las anomalías en las células endoteliales derivadas de pacientes con HHT, los progenitores endoteliales circulantes fueron aislados y cultivados para generar células endoteliales provenientes de sangre periférica (en inglés se utiliza el término “BOECs” de *Blood Outgrowth Endothelial Cells*). Las células provenientes de pacientes HHT presentan un citoesqueleto de actina desorganizado que puede contribuir a la fragilidad vascular observada en HHT (Fernandez *et al.*, 2005). El análisis de la expresión génica en dichas células endoteliales aisladas de pacientes HHT1 y HHT2 en comparación con células endoteliales de donantes sanos no-HHT reveló que la haploinsuficiencia en endoglina o ALK-1 daba lugar a una alteración de la expresión génica (Fernandez-L *et al.*, 2007). Los genes diferencialmente expresados en las células endoteliales de pacientes HHT (un total de 277 genes inducidos y 63 genes reprimidos) estaban implicados en procesos biológicos relevantes para la patología de HHT tales como: angiogenesis, citoesqueleto, migración celular, proliferación y síntesis de NO (óxido nítrico).

Para que una MAV en pacientes HHT se desarrolle es necesaria la haploinsuficiencia en endoglina o ALK-1 pero no suficiente: en general las MAVs no están presentes en el neonato y en el adulto no se manifiestan en todos los órganos. Este aspecto ha llevado al establecimiento de la teoría del “segundo evento” (del inglés *second hit*). La teoría del segundo evento nos indica que un evento en un momento dado, se traduce en la necesidad de una mayor cantidad de proteína que la que se encuentra en un endotelio quiescente y, que no va a ser asumible en el contexto vascular de la HHT. Este segundo evento podría tratarse de un estímulo angiogénico local como hipoxia o daño vascular y/o una reducción en la expresión de

endoglina o ALK1 relacionada con un proceso inflamatorio (Lopez-Novoa *et al.* Bernabeu, 2010; Mahmoud *et al.*, 2010; Choi *et al.* 2012).

## 1.8 Principales proteínas implicadas en HHT: Endoglina y ALK-1

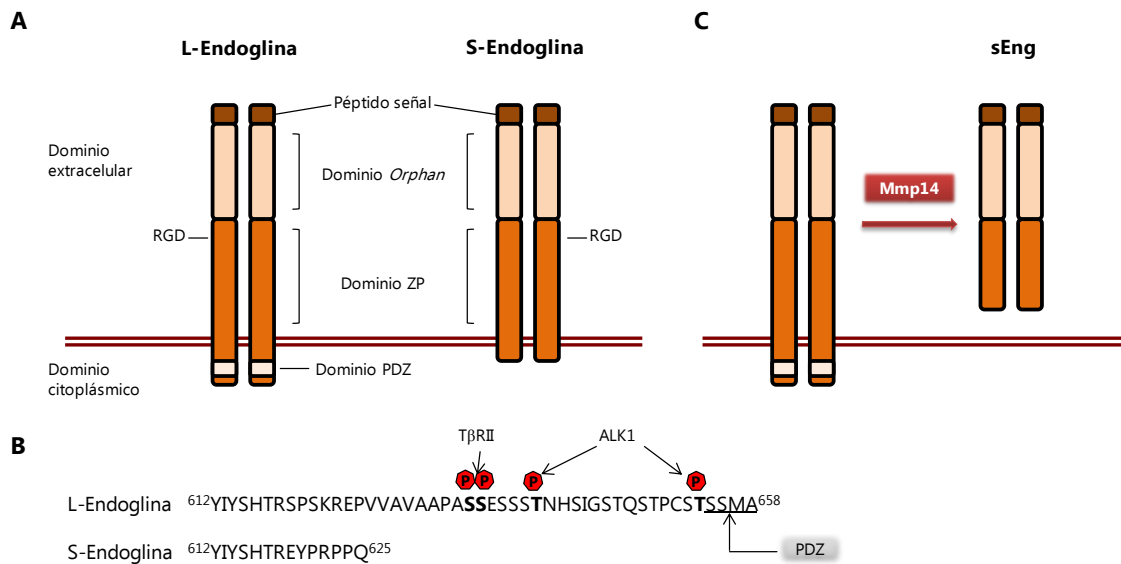
### 1.8.1 Endoglina

Endoglina es una glicoproteína de membrana de la vasculatura endotelial. Es un componente del complejo receptor de TGF- $\beta$  que se une con elevada afinidad a las isoformas TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3. El gen que codifica endoglina (*ENG*) se localiza en el cromosoma 9 humano (9q34.11) y contiene 16 exones (Fernández-Ruiz *et al.*, 1993). En ratón el gen (*Eng*) se localiza en el cromosoma 2 (2 B; 2 22.09 CM) y está constituido por 15 exones. Endoglina (también conocida como CD105) se identificó por primera vez en 1988 mediante el uso de un anticuerpo monoclonal (44G4) generado frente a células pre-B linfoblásticas de la línea celular HOON (Gougos *et al.* Letarte, 1988). La endoglina humana es una proteína homodimérica (unida mediante puentes disulfuro) de 658 aminoácidos que contiene un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un pequeño dominio intracelular (Gougos *et al.* Letarte, 1990). El dominio extracelular de endoglina humana contiene un dominio *Orphan* en el extremo N-terminal así como un dominio consenso zona pelúcida (ZP) yuxtamembrana (Figura 6A). Dentro del dominio ZP se localiza una secuencia RGD (Arg-Gly-Asp), un motivo de interacción con integrinas que no se conserva en ratón, cerdo y rata (Gougos *et al.* Letarte, 1990; Yamashita *et al.*, 1994). El dominio ZP está implicado en la oligomerización de endoglina y en la interacción heteromérica independiente de ligando con los receptores T $\beta$ RII y ALK5 (Guerrero-Esteo *et al.*, 2002). El dominio intracelular carece de un motivo enzimático pero contiene varios residuos Ser y Thr que son fosforilados por los receptores quinasa del TGF- $\beta$ . El tallo citoplásmico de endoglina presenta un motivo de unión PDZ (Ser-Ser-Met-Ala) en el extremo C-terminal que parece estar implicado en la modulación de la fosforilación de los residuos Ser y Thr vecinos (Koleva *et al.*, 2006) (Figura 6B). Aunque Endoglina se identificó en primer lugar en 1988 en células de linfoblastoma agudo y leucemia mielomonocítica (Gougos *et al.* Letarte (a), 1988; Gougos *et al.* Letarte (b), 1988), no fue hasta dos años después que se identificó como una glicoproteína de membrana presente en células endoteliales de capilares, arteriolas y vénulas y se le acuñó el nombre endoglina<sup>5</sup> (Gougos *et al.* Letarte, 1990). Endoglina se expresa a bajos niveles, no siendo fácilmente detectable, en células endoteliales en reposo (*resting*), pero su expresión aumenta notablemente durante una angiogénesis activa como la que tiene lugar

<sup>5</sup> La proteína endoglina recibe su nombre en 1990. “Endo” hace referencia a su expresión en endotelio, “g” y “l” son las iniciales de los apellidos de las autoras de la publicación en J Biol Chem: Gougos *et al.* Letarte y, la terminación “in” corresponde a la terminación inglesa utilizada para proteínas “proteín”.



durante la embriogénesis, en tejidos inflamados y en el interior y alrededor de tumores (ten Dijke *et al.*, 2008). Posteriormente se ha identificado su expresión en una gran variedad de tejidos o tipos celulares como precursores eritroides (Bühring *et al.*, 1991), macrófagos humanos (Lastres *et al.*, 1992; O'Connell *et al.*, 1992), sincitiotrofoblastos de placenta (Gougos *et al.*, 1992), células estromales (St Jacques *et al.*, 1994; Rockhlin *et al.*, 1995), fibroblastos (Guerrero-esteo *et al.*, 1999; Fernández-L *et al.*, 2005), células de la musculatura lisa (Conley *et al.*, 2000) y queratinocitos de la epidermis (Quintanilla *et al.*, 2003). Durante la diferenciación de las células madre embrionarias de ratón (ESCs, *Embryonic Stem Cells*) *in vitro*, las células hematopoyéticas precursoras Flk1+ (Vegfr2+) se caracterizan por su expresión de endogлина (Cho *et al.*, 2001). La combinación Flk1+ Eng+ permite identificar el hemangioblasto.



**Figura 6. Representación esquemática de las diferentes isoformas de endogлина.** **A)** Endogлина es una proteína homodimérica de membrana unida por puentes disulfuro. Presenta un dominio extracelular de gran tamaño, seguido por un único dominio transmembrana y un pequeño dominio citoplásmico. El dominio extracelular está constituido por un dominio *Orphan* y un dominio ZP (Zona Pelucida). En la figura se indica la localización del motivo RGD presente en endogлина humana. **B)** La endogлина corta o S-Endogлина difiere de la larga en el pequeño tallo citoplásmico y es generada por un procesamiento de ARN mensajero alternativo. La región intracelular de la isoforma corta no presenta un motivo enzimático pero es rico en residuos serina y treonina que pueden ser fosforilados por TβRII, ALK1 y ALK5. En el dominio C-terminal de endogлина larga un dominio de interacción PDZ (SMA) está presente. **B)** Detalle de la secuencia aminoacídica del tallo citoplásmico de las isoformas L y S de endogлина. **C)** La endogлина soluble o sEng, se genera por un corte proteolítico en la región extracelular. La metaloproteasa causante de dicho corte identificada es la metaloproteasa de membrana MT1 también conocida como MMP14. Aún así, no se descarta la acción de otras metaloproteasas en la generación y liberación de sEng. Adaptado de ten Dijke *et al.* 2008.

Desde que Endogлина fue identificada como un co-receptor de TGF-β (Cheifetz *et al.*, 1992), fue identificada como el gen causante del síndrome HHT (McAllister *et al.*, 1994) y se estableció su papel en angiogénesis (Li *et al.*, 1999; Bourdeau *et al.*, 1999; Arthur *et al.*, 2000; Jerkic *et al.*, 2006), aumentó tanto su relevancia a nivel clínico como a nivel de fisiología vascular. Sus funciones las realiza, mediante la modulación de la señalización del TGF-β1

(Letamendia *et al.*, 1998), y aumenta la unión del mismo a su complejo receptor formado por los receptores tipo I y TGF $\beta$ RII (Barbara *et al.*, 1999). Estudios posteriores muestran que endogлина está altamente expresada en células endoteliales vasculares en proliferación, y es evidente que endogлина juega un papel central en el desarrollo vascular y las enfermedades asociadas (ten Dijke *et Arthur*, 2007).

### 1.8.2 Isoformas de endogлина

En humano y ratón se han descrito dos isoformas alternativas de *splicing* para endogлина, la isoforma larga o L-endogлина y la isoforma corta o S-endogлина (Figura 6C). Ambas tienen la capacidad de unir TGF- $\beta$  pero difieren en su tallo citoplásmico (Gougos *et Letarte*, 1990; Bellón *et al.*, 1993; Perez-Gomez *et al.*, 2005). La isoforma L (del inglés *Long*) tiene un tallo citoplásmico de 47 residuos de longitud, mientras que la isoforma S (del inglés *Short*) presenta 14 aa. Comparten en común justo los 7 aminoácidos yuxtamembrana (Bellón *et al.*, 1993; Pérez-Gómez *et al.*, 2005). Los transcritos de S-endogлина se han identificado en algunos tejidos como pulmón e hígado (Pérez-Gómez *et al.*, 2005) y en células endoteliales senescentes (Blanco *et al.*, 2008). Sin embargo, la isoforma larga (L-endogлина) es la isoforma que se expresa predominantemente en la mayor parte de tejidos, particularmente en endotelio, siendo el objeto de análisis en la mayoría de estudios referidos a la biología de endogлина. Es por ello que cuando se hace referencia a endogлина sin especificar la isoforma, en la gran mayoría de publicaciones y en la presente tesis, se hace referencia a la isoforma larga. Ambas isoformas ejercen efectos opuestos: L-endogлина potencia la señalización vía TGF- $\beta$ /ALK1 mientras que S-endogлина promueve la señalización vía TGF- $\beta$ /ALK5 (Pérez-Gómez *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2005; Velasco *et al.*, 2008). La sobreexpresión de S-endogлина en el endotelio vascular de ratones se traduce en una disminución del crecimiento tumoral y su neovascularización que sugiere un papel antiangiogénico de la S-endogлина en contraposición con la larga. S-endogлина puede llevar a cabo este efecto inhibiendo la formación del homodímero L-L ya que L- y S- pueden formar heterodímeros (Perez-Gomez *et al.*, 2005).

Existe una tercera isoforma de endogлина de 65 kDa que se corresponde con la región extracelular (Figura 6C). Esta es conocida como endogлина soluble (sEng) y está generada por un corte proteolítico de la endogлина transmembrana (tanto L-endogлина como S-endogлина). En 2010 se identificó la metaloproteasa de membrana MT1 o MMP14 como la principal metaloproteasa implicada en el corte de endogлина y su liberación al torrente sanguíneo (Hawinkels *et al.*, 2010). De momento no queda muy claro cuál es el efecto del aumento de sEng en sangre sobre procesos fisiológicos aunque algunos datos *in vitro* indicarían que sEng antagonizaría los efectos de la isoforma larga, por tanto tendría un papel anti-angiogénico

(Venkatesha *et al.*, 2006). Sin embargo, estudios recientes con un modelo animal que sobreexpresa sEng han revelado que los niveles elevados de sEng circulantes no inducen una disfunción endotelial *per se* conservándose los niveles de expresión de eNOS, ICAM-1 y VCAM-1 en aorta de ratones transgénicos *sEng*<sup>+</sup> y los ratones control (Nemeckova *et al.*, 2015). Estos resultados no descartan que sEng contribuya a la disfunción endotelial en combinación con otros factores de riesgo relacionados con enfermedades cardiovasculares. De hecho, elevados niveles de sEng han sido detectados en pacientes que presentan MAVs cerebrales (no hereditarias y esporádicas) sugiriendo que el exceso de sEng perturba la organización vascular local (Chen *et al.*, 2009). El aumento de sEng se ha relacionado con un aumento de la expresión de VCAM-1 en células endoteliales y E-selectina, lo que conlleva a un aumento de la adhesión leucocitaria y promueve una respuesta inflamatoria local (Nachtigal *et al.*, 2012; Walshe *et al.*, 2009). Puesto que sEng conserva los sitios de unión para diferentes miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$  tras su procesado, se ha sugerido que sEng actuaría como un *scavenger*, secuestrando ligandos circulantes tales como TGF- $\beta$ 1, BMP9 y BMP10, dificultando así la unión de dichos ligandos a sus receptores funcionales e inhibiendo los procesos de angiogénesis tumoral (Venkatesha *et al.*, 2006; ten Dijke *et al.*, 2007; Hawinkels *et al.*, 2010; Castonguay *et al.*, 2011).

El estudio de los niveles de sEng en circulación ha cobrado interés en los últimos años puesto que un aumento de los mismos se ha asociado a diversas enfermedades vasculares, inflamatorias e autoinmunes, a la aparición de determinados tumores, y se ha establecido como un factor pronóstico de cáncer. Los niveles de sEng están vinculados a la patogenia de enfermedades vasculares tales como la esclerosis sistémica, preeclampsia e hipertensión (Wipff *et al.*, 2008; Venkatesha *et al.*, 2006; Valbuena-Diez *et al.*, 2012). En varios tipos de tumores como cáncer de mama, cáncer colorectal y otros tumores sólidos los niveles de sEng se han asociado al proceso de metástasis (Li *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2001). Tras un infarto de miocardio agudo los niveles de sEng en plasma aumentan, pero si el paciente presenta una buena evolución éstos disminuyen, por lo que sEng podría establecerse como un marcador de pronóstico en infarto de miocardio (Cruz-González *et al.*, 2008). Además, en diversos estudios se han asociado los niveles de sEng con la recuperación de tumores sólidos como cáncer de mama y, la supervivencia tras tratamientos hormonales, la respuesta a los tratamientos con quimioterapia y la recidiva en el tumor de próstata (Pérez-Gómez *et al.*, 2010). De nuevo, niveles elevados de sEng también se han encontrado asociados a leucemia mieloide aguda y desordenes mieloproliferativos crónicos, caracterizados por una elevada tasa de proliferación celular (Calabro *et al.*, 2003). Sin embargo, en otros tumores como gástrico, esofágico y de

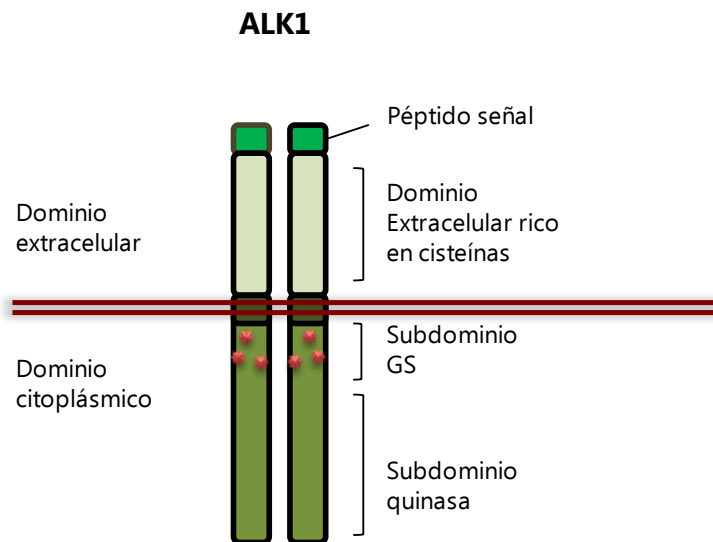
ovario, no se ha observado ninguna diferencia de sEng con una población control (Pérez-Gómez *et al.*, 2010). El aumento de los niveles de sEng en circulación, se debería a una combinación entre el aumento de los procesos de angiogénesis en determinadas patologías y el aumento de la expresión y/o actividad de las metaloproteasas. De hecho, se ha especulado que la disminución de sEng observada en pacientes con hipercolesterolemia familiar, está relacionada con la mejora de la disfunción endotelial y la disminución de la actividad inmunológica tras la eliminación extracorpórea de las sustancias arterogénicas (Blaha *et al.*, 2008). El descubrimiento de la MMP14 como principal responsable de la generación de sEng fue seguido por el desarrollo de estrategias para disminuir la liberación de sEng en modelos murinos de preeclampsia (Valbuena-Diez *et al.*, 2012). La pre-eclampsia es una enfermedad característica de los últimos estadios de gestación y asociada a hipertensión con graves problemas para la salud de la madre y el feto. Niveles elevados de la expresión de endogлина en placenta dan lugar a mayores niveles de sEng que estarían contribuyendo a la disfunción vascular en preeclampsia (Liu *et al.*, 2012). La sEng cooperaría con el receptor soluble de VEGF (también conocido como sFLT1) en su patogénesis (Venkatesha *et al.*, 2006; Levine *et al.*, 2006).

### 1.8.3 ALK1

ALK1<sup>6</sup> es una proteína homodimérica transmembrana localizada en la superficie celular que actúa como receptor tipo I de la superfamilia del TGF- $\beta$  (Attisano *et al.*, 1993; ten Dijke *et al.*, 1993). Consta de 503 aminoácidos y su peso molecular es de unos 55-65 kDa. Posee un pequeño péptido señal en el extremo N-terminal de su dominio extracelular, seguido de una zona rica en cisteínas y en glicosilaciones en grupos amino de las cadenas laterales de asparraginas y glutaminas. El tallo citoplásmico se encuentra en el extremo C-terminal y presenta una región rica en glicina y serina conocida como subdominio GS, seguida de un subdominio Ser/Thr-quinasa que presenta un alto grado de similitud con los de otros receptores tipo I del TGF- $\beta$  (ten Dijke *et al.*, 1994) (Figura 7). Cuando interacciona con el dímero T $\beta$ RII, éste fosforila los residuos Ser localizados en el dominio GS de ALK1 y lo activa (Wieser *et al.*, 1995). El gen que codifica la expresión de ALK1 se denomina *activin A receptor type II-like 1* (*ACVRL1*), se localiza en el brazo largo del cromosoma 12 (12q13.13) y está constituido por 11 exones (Berg *et al.*, 1997).

---

<sup>6</sup> En un primer momento se denominó TSR-I. El nombre de ALK1 (*Activin receptor Like Kinase 1*) lo adquirió posteriormente al ser caracterizado por su similitud con el receptor tipo II de activina (Attisano *et al.*, 1993; ten Dijke *et al.*, 1993).



**Figura 7. Representación esquemática de la estructura de ALK1.** El receptor consta de un péptido señal que dirige la proteína hacia la membrana tras su síntesis, un dominio extracelular con abundantes cisteínas y glicosilaciones en grupos amino (de las cadenas laterales de asparraginas y glutaminas), un segmento transmembrana y, un dominio citoplásmico (que posee una región GS -rica en glicina y serina- y un subdominio catalítico con actividad Ser/Thr quinasa). Los puntos rojos en el subdominio GS simbolizan las fosforilaciones de ALK1 por parte del T $\beta$ RII que activan su capacidad catalítica.

La expresión de ALK1 se halló primeramente en tejidos altamente vascularizados como son pulmón, la placenta y el corazón (Johnson *et al.*, 1996). Posteriormente, se detectó su expresión en otras localizaciones como las células epiteliales durante la transición epitelio-mesénquima (Jonson *et al.*, 2001), los monocitos (Mo *et al.*, 2002; Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004), los cardiomiocitos (Su *et al.*, 2004), la microglía neural (Konig *et al.*, 2005), los fibroblastos de la piel (Beger *et al.*, 2006), las células esteladas hepáticas (Li *et al.*, 2008), los condrocitos (Finsson *et al.*, 2008), las células de la cresta neural (Mancini *et al.*, 2007) y en mioblastos (Velasco *et al.*, 2008). La expresión de ALK1 en endotelio se da principalmente en las arterias durante el desarrollo embrionario y durante las etapas de crecimiento postnatal, y esta expresión se induce en las arterias nacientes y en remodelación en el ratón adulto durante el proceso angiogénico tras un daño vascular o por tumorigénesis (Seki *et al.*, 2003).

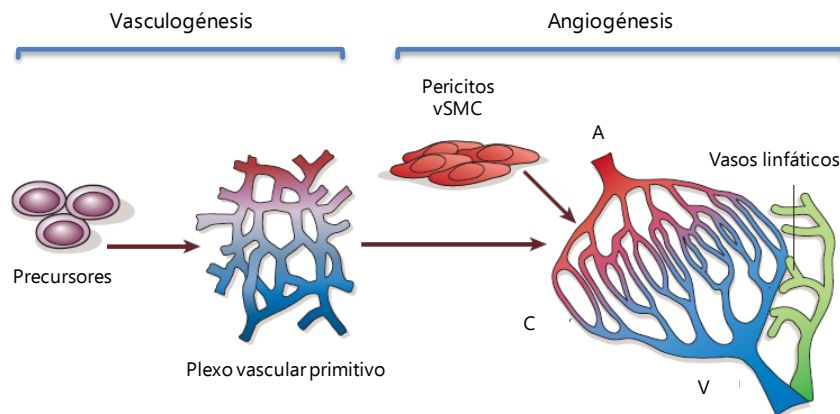
## 2 Modelos animales en HHT

Los modelos animales son de gran utilidad en investigación clínica ya que pueden presentar características físicas o desarrollar enfermedades similares a las que presentan los seres humanos, permitiendo así realizar comparaciones entre la fisiología animal y la humana. Los modelos pueden ser espontáneos, cuando un animal tiene características naturales como las de los humanos o una enfermedad humana, o inducidos, cuando el animal ha sido alterado, por ejemplo, mediante una cirugía o manipulación genética (animales transgénicos). Los

modelos inducidos son útiles para estudiar las causas subyacentes de una enfermedad y en el caso de la HHT no se trata de una excepción. Varios modelos murinos transgénicos en los que se ha eliminado la expresión de varios miembros de la superfamilia del TGF- $\beta$ , así como sus receptores y moléculas de señalización han sido desarrollados (Tual-Chalot *et al.*, 2015; ten Dijke *et al.*, 2007; Goumans *et al.*, 2000) pero nos centraremos en los modelos animales que se han desarrollado para estudiar los dos tipos principales existentes de HHT. HHT1 y HHT2 representan más del 90% de los casos HHT, por lo que mucha de la investigación realizada para descifrar las bases de este síndrome se ha centrado en el papel de *ENG* y *ACVRL1* y por tanto los modelos animales llevando alteraciones en *eng* o *Acvrl1* son los que más se han desarrollado.

### 2.1 Modelos deficientes en endogлина

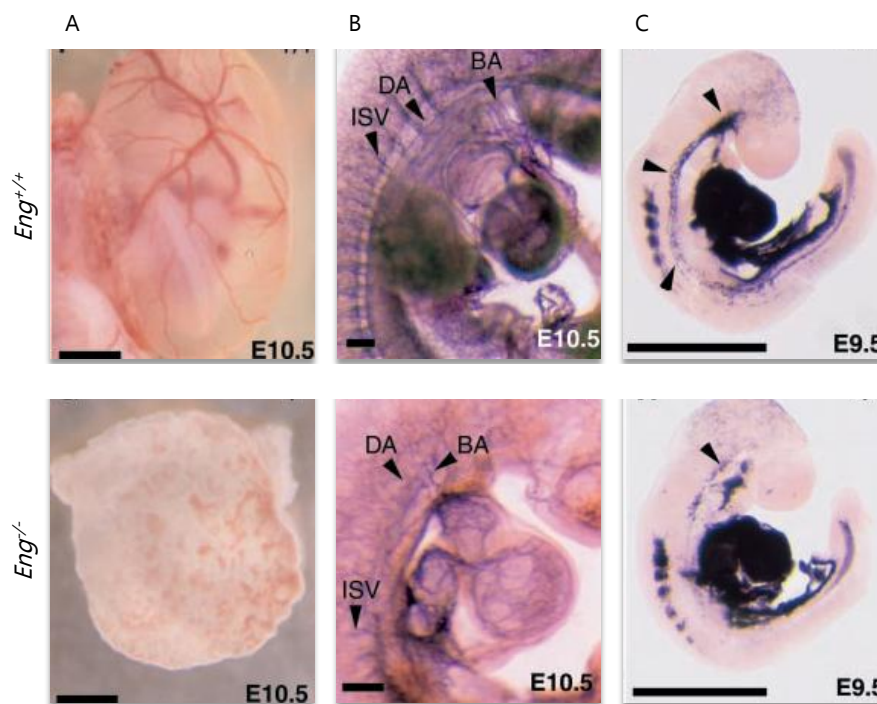
Tras el descubrimiento que mutaciones en *ENG* eran las causantes del síndrome de HHT tipo 1 (Mc Allister *et al.*, 1994), diversos grupos desarrollaron modelos de ratón con *knock-out* de endogлина en diferentes fondos genéticos. Todos los ratones deficientes en endogлина son letales embrionarios debido a un defecto vascular en el desarrollo (Li *et al.*, 1999; Arthur *et al.*, 2000; Bordeau *et al.*, 1999), sin embargo, los heterocigotos presentan una esperanza de vida, fertilidad y apariencia normal. La pérdida de expresión de endogлина da lugar a defectos cardiovasculares y una muerte letal embrionaria a media gestación. La vasculogénesis no parece verse afectada, sugiriendo que endogлина no es necesaria para la diferenciación inicial de las células endoteliales o para la formación de los plexos vasculares primitivos. Son los procesos de angiogénesis donde la deficiencia de endogлина es clave. Tanto vasculogénesis como angiogénesis son las responsables de la formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario. La vasculogénesis consiste en la primera diferenciación endotelial a partir de los precursores derivados del mesodermo, y su organización en plexos capilares primarios. La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya preexistentes en un proceso conocido como *sprouting* (Risau, 1997; Pardali *et al.*, 2010) (Figura 8).



**Figura 8. Desarrollo del sistema vascular.** Durante la vasculogénesis, los precusores endoteliales se asocian para dar lugar a un primitivo plexo vascular consistente en una red de arterias y venas. Durante los procesos posteriores tiene lugar la angiogénesis, aquí la red se expande, los pericitos y las células vasculares de musculatura lisa (vSMC) recubren los vasos endoteliales nacientes y, se forma la red vascular con su arquitectura normal compuesta por arterias (A) y venas (V) conectadas por capilares (C). Los vasos linfáticos se generan por transdiferenciación de las venas. La activación de las células endoteliales se caracteriza por un aumento de la expresión de endoglina y Alk1 en endotelio. Adaptado de Carmeliet, 2005.

Los embriones deficientes en endoglina mueren alrededor del día de gestación E11,5 y presentan una desorganización vascular y un fallo en la formación de vasos sanguíneos en el saco vitelino. Aunque la alteración de la organización endotelial tiene lugar entre los días E9,5-E10,5, se observa un desarrollo pobre de las células vasculares de musculatura lisa (vSMC) en el saco vitelino alrededor del día E8,5. La presencia de plexos vasculares perineurales inmaduros alrededor del día E10,5 es indicativo de un fallo en el remodelado endotelial no sólo en el saco vitelino, sino también el embrión propiamente dicho (Li *et al.*, 1999). Cuando los embriones se tiñeron con un anticuerpo que reconoce la  $\alpha$ -actina de las células musculares lisas ( $\alpha$ -smooth muscle cell actin), eran evidentes las diferencias en el desarrollo de vSMCs en el día E9,5 entre los ratones *endoglina*<sup>-/-</sup> y los ratones salvajes, observándose que la mayor parte de vasos sanguíneos no estaban recubiertos de vSMC en los embriones deficientes en endoglina. Así que el defecto en la diferenciación de las vSMC precede al defecto en el remodelado endotelial (Li *et al.*, 1999)(Figura 9). Un estudio realizado sobre los vasos presentes en el saco vitelino, demostró que el TGF- $\beta$ 1 secretado por las células endoteliales es crítico para la diferenciación y maduración de las vSMCs. En ausencia de endoglina, se produce una señalización molecular insuficiente (menor secreción de TGF- $\beta$ 1) que permite una comunicación entre las células endoteliales y sus vecinas las células mesoteliales para promover la maduración de las células de musculatura lisa y mantener la integridad de la pared vascular (Carvalho *et al.*, 2004). Este fenotipo, una disminución en la maduración vascular, también se ha observado aunque en un modo menos dramático, en los ratones heterocigotos para endoglina (*Eng*<sup>+/-</sup>). Todos estos hallazgos ponen de manifiesto la relevancia

de endoglina en los procesos de angiogenesis. Además de un defecto en angiogénesis, los embriones deficientes en endoglina también presentan una reducción en los niveles de hematopoyesis en el saco vitelino y un desarrollo cardíaco anormal (Arthur *et al.*, 2000), por lo que endoglina juega también un papel fundamental en el mantenimiento de una arquitectura vascular normal.

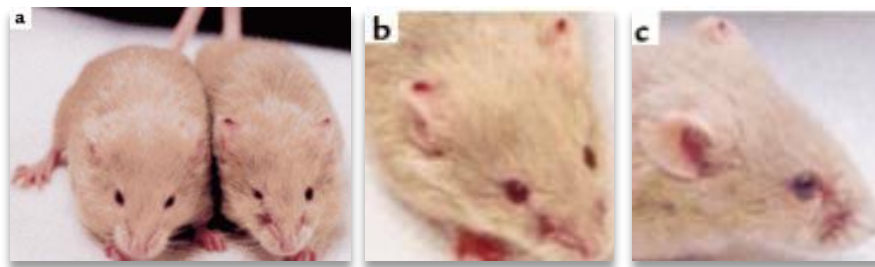


**Figura 9. Alteraciones vasculares en ratones deficientes para endoglina. (A)** Fotomicrografías de los sacos vitelinos en el día de gestación E10,5. La vasculatura de los ratones *Eng*<sup>+/+</sup> está bien definida, mientras que en el saco vitelino de los ratones *Eng*<sup>-/-</sup> se observan agrupaciones de eritrocitos y no se distingue ningún vaso. **(B)** En la imagen se observa una maduración de la organización de las células endoteliales en el embrión *Eng*<sup>+/+</sup> que no se presenta en los embriones *Eng*<sup>-/-</sup>. Las grandes arterias como la carótida (BA), la arteria dorsal (DA) y los vasos intersomíticos (ISV) no están ramificados en redes vasculares en los embriones *Eng*<sup>-/-</sup>. Inmunohistoquímica con tinción de PECAM. **(C)** En la imagen superior se puede observar la formación de las células vasculares de la musculatura lisa (vSMC) en el embrión *Eng*<sup>+/+</sup> que se extienden caudalmente en la arteria dorsal y en dirección al rostro hacia la arteria carótida (flechas). El desarrollo de las vSMCs en los embriones *Eng*<sup>-/-</sup> fracasa entre el día de gestación E8,5 – E9,5. Inmunohistoquímica con marcaje de  $\alpha$ -actina de SMCs. Adaptado de Li *et al.*, 1999.

Sin embargo, el heterocigoto (*Eng*<sup>+/-</sup>) no desarrolla la sintomatología clínica de la HHT observada en humanos. Esto es así para los ratones transgénicos desarrollados en el fondo genético C57Bl/6 o CD1, pero Bourdeau y colaboradores generaron un ratón transgénico utilizando una mezcla de fondos genéticos; C57Bl/6 con 129/Ola, y la F1 la cruzaron con ratones CD1. Los ratones C57Bl/6-129/Ola mostraron sintomatología HHT (telangiectasias y epistaxis) mientras que los que presentaban fondo CD1 no. También generaron la transgénesis en ratones 129/Ola puros. Los ratones heterocigotos para *eng* generados en el fondo 129/Ola presentaban de nuevo un fenotipo similar al de los pacientes HHT, caracterizado por la presencia de vasos sanguíneos dilatados con paredes débiles, que daban lugar a sangrados



nasales y telangiectasias cutáneas sobre todo visibles en las orejas (Bourdeau *et al.*, 1999) (Figura 10). Estas manifestaciones se desarrollaban entre los 3 meses y los 2 años, afectando aproximadamente al 40-50% de los animales *Eng*<sup>+/-</sup>. La mayor frecuencia de alteraciones vasculares en la cepa 129/Ola en comparación con los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> C57Bl/6-129/Ola, asocia el fondo genético 129/Ola con el síndrome HHT. Estos ratones también presentaban un menor recubrimiento de la pared vascular por células musculares lisas de las vénulas postcapilares (Torsney *et al.*, 2003). La diferente penetrancia de síntomas clásicos HHT entre cepas, sugería la existencia de otros genes (genes modificadores) que contribuyesen a la severidad y heterogeneidad de la clínica en HHT. De nuevo, Bourdeau y colaboradores (2001) demostraron la existencia de genes modificadores implicados en la regulación de la expresión de TGF-β1 ya que los niveles circulantes de TGF-β1 eran significativamente menores en el plasma de ratones 129/Ola que en el plasma de aquellos ratones pertenecientes a la cepa C57BL/6 (Bourdeau *et al.*, 2001).



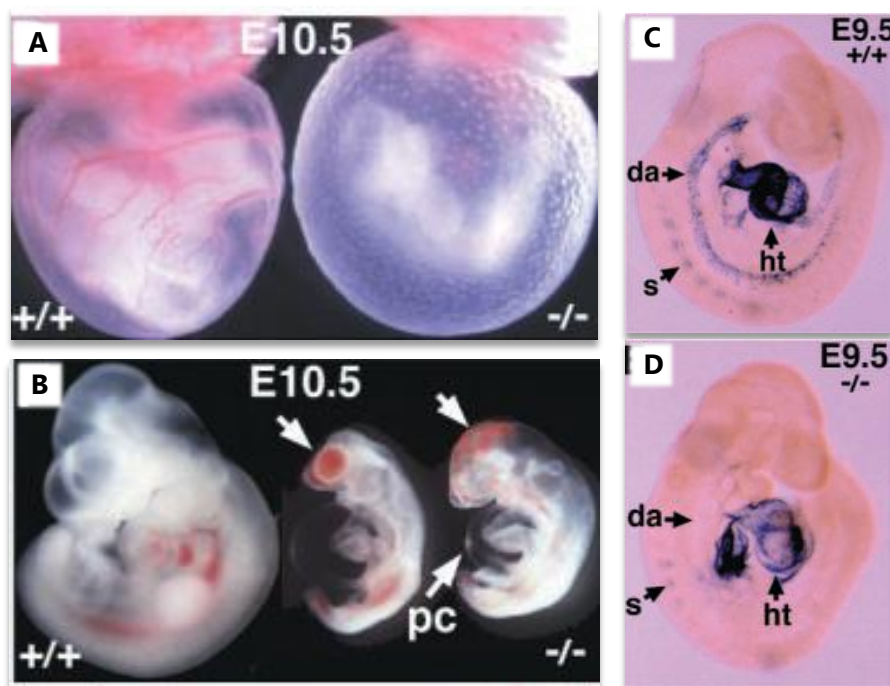
**Figura 10. Fenotipo similar a HHT1 en ratones *Eng*<sup>+/-</sup> 129/Ola.** Los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> 129/Ola presentan sangrados nasales y telangiectasias características de HHT. **(A)** Se muestra un macho 129/Ola *Eng*<sup>+/-</sup> con sangrados nasales recurrentes a la derecha de una hembra de camada sin manifestaciones de la enfermedad. **(B)** Las telangiectasias se presentan en la parte superior de ambas orejas. **(C)** En la imagen lateral se puede observar mejor la zona afectada de la nariz. Adaptado de Bourdeau *et al.*, 1999.

Si bien los ratones heterocigotos para la expresión de endogлина en el fondo C57Bl/6, no presentan la sintomatología clínica observada en HHT1, sí han sido de utilidad para estudiar los procesos angiogénicos ante una haploinsuficiencia de endogлина. Por ejemplo, cultivos primarios de células endoteliales aisladas de ratones *Eng*<sup>+/-</sup> en comparación con aquellas aisladas de los ratones control (*Eng*<sup>+/+</sup>) mostraron una menor proliferación y migración celular al igual que una menor capacidad de formar estructuras tubulares *in vitro*. Estos resultados se correspondían con un retraso en la reperfusión tras una isquemia provocada en la pata posterior (Jerkic *et al.*, 2006). Estos datos ponen de manifiesto que aunque el desarrollo vascular es normal en los ratones *Eng*<sup>+/-</sup>, sí se observan anomalías angiogénicas en el individuo

adulto y sus células endoteliales, porque son necesarios niveles normales de endogлина para una actividad angiogénica completa.

## 2.2 Ratones deficientes en ALK1

De igual forma que los modelos knockout para endogлина, el ratón deficiente en ALK-1 también es letal embrionario. Los embriones mueren alrededor del día E10.5-11.5 por defectos muy similares a la deficiencia en endogлина: defectos en angiogénesis y diferenciación de vSMCs (Oh *et al.*, 2000). De nuevo, la vasculogénesis parece desarrollarse de forma normal sugiriendo que *Acvrl1* es requerido para la angiogénesis, pero no para la inicial formación del plexo vascular primitivo. A partir del día E9,5-E10,5, los embriones deficientes en ALK-1 presentan claros defectos como desarrollo posterior del embrión anormal, ausencia de vasos sanguíneos maduros en el saco vitelino, agrupaciones de células sanguíneas y efusión pericárdica (Figura 11). El embrión en sí presenta una fusión excesiva de la red capilar alrededor del día E9,5, no observada en los ratones deficientes en endogлина y una dilatación de los vasos de mayor tamaño. Al igual que en los embriones deficientes en endogлина, también se ha observado un retraso en la diferenciación de vSMC y por consiguiente un disminución de la localización de estas células a nivel perivascular, rodeando el endotelio.



**Figura 11. Alteraciones vasculares en ratones deficientes para ALK1.** (A) Morfología macroscópica del saco vitelino en el estadio de gestación 10,5 en embriones *wildtype* (izquierda) y deficientes en ALK1 (derecha). En los embriones *Acvrl1*<sup>+/+</sup> se observa una vasculatura bien definida que es ausente en los embriones mutantes. (B) Aspecto macroscópico del embrión en el estadio de gestación 10,5 en el embrión *wild-type* (*Acvrl1*<sup>+/+</sup>) y dos embriones *Acvrl1*<sup>-/-</sup>. El embrión *Acvrl1*<sup>-/-</sup> presenta un aspecto morfológico afectado con un retraso en el crecimiento, un saco vitelino sin vasculatura, acúmulos de eritrocitos y, un pericardio agrandado (C, D) Retraso en la diferenciación de las células de musculatura lisa en la vasculatura de embriones *Acvrl1*<sup>-/-</sup>. En la imagen se observa en azul la tinción la

expresión del marcadores de células musculares SM22 $\alpha$  en embriones en el estadio de gestación 9,5. En los embriones *Acvr11*<sup>+/-</sup> la expresión de SM22 $\alpha$  se detecta en corazón, débilmente en los somitas y no se detecta en la arterial dorsal. PC = pericardio, da =arteria dorsal, cc = vena cardenal, s = somita, ht = corazón. Adaptado de Oh *et al.*, 1999.

Los ratones *Acvr11*<sup>+/-</sup> presentan vasos dilatados y lesiones vasculares como las observadas en pacientes HHT, en hígado, lúnula, intestino o piel que se desarrollan entre los 7 y 20 meses de vida (Srinivasan *et al.*, 2003). Dichas lesiones aparecen en alrededor del 40% de los ratones *Acvr11*<sup>+/-</sup> y de una forma no predecible.

### 2.3 Modelos condicionales y específicos.

Como hemos podido comprobar por los modelos descritos anteriormente, los heterocigotos *Eng*<sup>+/-</sup> y *Acvr11*<sup>+/-</sup> presentan un desarrollo relativamente normal de los vasos sanguíneos sugiriendo que no se producen defectos importantes en la vasculatura durante la angiogenesis embrionaria. Esto está en concordancia con el hecho de que la mayor parte de los vasos sanguíneos en pacientes HHT funciona de forma normal mientras que las lesiones están localizadas y son esporádicas. Sin embargo, una angiogénesis reducida se ha descrito en ratones adultos *Eng*<sup>+/-</sup> ante eventos concretos como la ligación de la vena femoral (Jerkic *et al.*, 2006), infarto de miocardio (van Laake *et al.*, 2006), o un accidente cerebrovascular o ictus (Shen *et al.*, 2014). En una serie de estudios centrados en el SNC se observó que un estímulo proangiogénico conseguido mediante la inyección de partículas adenovirales que expresan VEGF daba lugar a una displasia vascular pero no a la formación de MAVs (Xu *et al.*, 2004) en ratones *Eng*<sup>+/-</sup>. Asimismo, la inyección intracraneal de adenovirus que expresan VEGF daba lugar a una displasia vascular tanto en ratones *Eng*<sup>+/-</sup> como en *Acvr11*<sup>+/-</sup>, mucho más marcada en los ratones heterocigotos para endogлина (Hao *et al.*, 2010). Estos estudios sugieren que un estímulo angiogénico es necesario para el desarrollo de una displasia vascular en los modelos heterocigotos, es decir, niveles normales de endogлина y Alk1 son requeridos para una respuesta angiogénica adecuada.

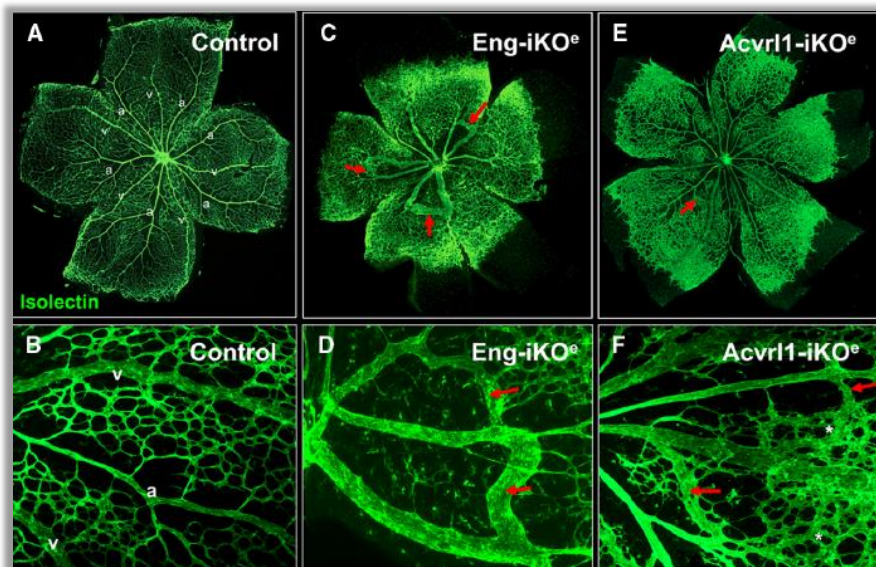
La tecnología Cre-lox ha permitido desarrollar modelos en los que se ha eliminado casi por completo la expresión de *Eng* o *Acvr11* en un momento determinado o en un tipo celular específico. Esto ha permitido evaluar el efecto de la pérdida de expresión de endogлина y Alk1 restante presente en los heterocigotos con el fin de obtener un modelo murino más acorde con la sintomatología clínica presente en HHT. Por ejemplo, la pérdida total de la expresión de *Acvr11* en el individuo adulto, tras la realización de unas heridas en la piel, conlleva a la formación de MAVs en la zona dónde se ha realizado la herida (Park *et al.*, 2009). Estas malformaciones derivadas de un daño tisular también se han observado en ratones deficientes para endogлина (Choi *et al.*, 2014; Garrido-Martín *et al.*, 2014). En la misma línea, otros

estudios han demostrado que en ratones adultos deficientes para endogлина o Alk1, la aplicación de un estímulo angiogénico (como el VEGF) o inflamatorio (como el LPS) conlleva la aparición de MAVs en la zona de la piel donde han sido aplicados (Han *et al.*, 2014). Todos estos estudios sugieren que para la formación de MAVs se requieren tanto factores genéticos como ambientales.

Con el fin de determinar en qué tipos celulares endogлина y Alk1 desempeñan un papel esencial para el desarrollo de la vasculatura y su homeostasis, se han desarrollado diferentes tipos de líneas transgénicas Cre para deleccionar *Eng* o *Acvrl1* en diferentes tipos celulares. De este modo, el remodelado vascular en respuesta a estímulos proangiogénicos o inflamatorios puede ser evaluado en la línea murina de interés. El efecto de la deleción de endogлина en células endoteliales fue examinada en detalle en 2010 en la retina de ratones neonatos (Mahmoud *et al.*, 2010). La retina de las crías de ratón es un excelente medio para observar el proceso de angiogénesis. Durante la primera semana de vida de los ratones, en la retina tiene lugar un proceso de desarrollo de vasos sanguíneos muy bien caracterizado en el cual los vasos sanguíneos del centro de la retina presentes en el día postnatal (P1) desarrollan una angiogénesis gradual que crece desde el disco óptico hacia la periferia, llegando a formar un plexo vascular de alta organización que alcanza la periferia de la retina en P8. La vasculatura de la retina de ratón neonatal forma un patrón de arterias y venas interconectados por un lecho capilar en un plexo vascular muy sencillo en dos dimensiones (Figura 12 A-B). La deleción de endogлина en células endoteliales da lugar a un retraso en el remodelado del plexo capilar que da lugar a un fenotipo claro de MAV en la vasculatura de la retina que es reminiscente a las malformaciones vasculares presentes en HHT (Mahmoud *et al.*, 2010)(Figura 12 C-D). Las conexiones arteriovenosas presentan un fenotipo venoso siendo más muscularizadas con el tiempo, probablemente en respuesta al incremento del flujo sanguíneo. Las conexiones arteriovenosas presentan un fenotipo venoso adquiriendo una estructura muscularizada (incrementando en número de capas de vSMC que rodean la vena), probablemente en respuesta al incremento del flujo sanguíneo. Este fenotipo venoso, con más capas musculares, sería similar al descrito en MAVs dérmicas por Braverman y colaboradores en 1990 (Figura 2). Un dato a resaltar es que no se observan MAVs cuando endogлина se delecciona en células endoteliales de un individuo adulto, sugiriendo de nuevo que la angiogénesis durante el desarrollo es un estímulo esencial para la aparición de las mismas.

Un modelo similar inducible y específico de endotelio también se ha desarrollado para *Acvrl1* comprobando que los efectos sobre la retina neonatal de ratón son similares a los hallados en el modelo inducible de endogлина (Tual-Chalot *et al.* 2014). Las características

comunes son dilatación de venas, aumento de la proliferación de células endoteliales y desarrollo de MAVs (Figura 12 E-F).



**Figura 12. Formación de MAVs en retina de ratón neonato tras la pérdida de expresión de *Eng* o *Acvrl1* en células endoteliales.** En las imágenes las células endoteliales se muestran mediante tinción con isolectina. La arquitectura normal en dos dimensiones del plexo vascular se puede observar en (A) y a mayor resolución en (B). Es fácilmente distinguible una organización regular de arterias (a) y venas (v) conectadas por redes capilares. Las arterias se diferencian de las venas por las zonas libres de capilares que hay alrededor de ellas (A,B). Tras la anulación de la expresión de endogлина específica de endotelio (tratamiento con tamoxifen en neonatos de la línea *Eng<sup>f/f</sup>Cdh5-Cre<sup>ERT2</sup>*) se observa que los vasos de las retinas a P7 presentan una ralentización del crecimiento del plexo vascular hacia la periferia de la retina así como una conexión anormal entre arterias y venas que dan lugar a múltiples MAVs (flechas rojas en (C), mostradas a mayor resolución en (D)). La pérdida específica de *Acvrl1* en endotelio da lugar a la formación de AVMs (flechas rojas en E,F), hiper-ramificación, asteriscos en (F) y ensanchamiento de las venas. Adaptado de Tual-Chalot et al., 2015.

La delección condicional de *Acvrl1* en vSMCs y una subpoblación de células endoteliales usando el transgen SM22 $\alpha$ -Cre da lugar a individuos con MAVs en cerebro y espina dorsal. Estos animales mueren entre las 10-15 semanas de vida y presentan parálisis y hemorragias internas, aunque algunos individuos sobreviven presentando múltiples MAVs (Milton et al., 2012). Un estudio posterior realizado utilizando el transgen Scl-CreER, específico de endotelio, demostró que tanto en los individuos *Eng-iKO<sup>e</sup>* como en los *Acvrl1-iKO<sup>e</sup>* se formaban MAVs dérmicas tras utilizar el modelo de daño tisular mediante heridas (Garrido-Martin et al., 2014). Cabe destacar que en los ratones *Scl-CreER*, se detecta una mínima actividad Cre recombinasa en células derivadas de médula ósea en el ratón adulto (Gothert et al., 2004 Blood; Garrido-Martin et al. 2014), lo que sugiere que las MAV que se forman son debidas a la delección de *Eng* y *Acvrl1* en la célula endotelial. De todos modos sería interesante discernir hasta qué punto las células madre hematopoyéticas pueden contribuir a la patología HHT, debido a que también se ha observado que el trasplante de células de MOR de ratones

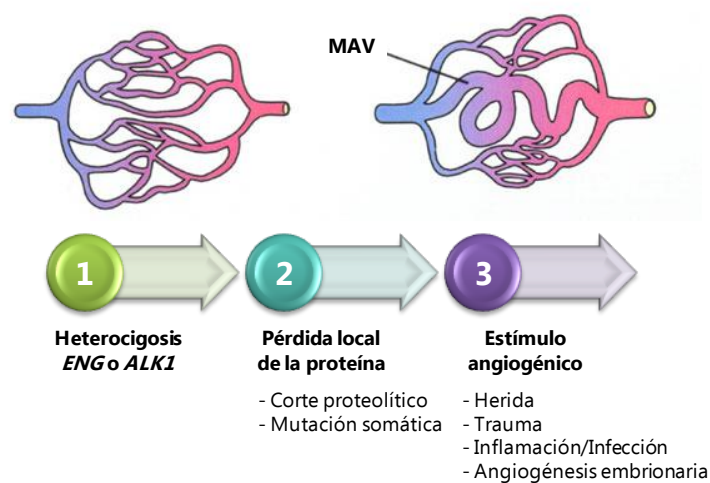
*Eng*<sup>+/-</sup> era suficiente para causar displasia vascular cerebral tras estimulación con VEGF (Choi *et al.*, 2013) y las células madre hematopoyéticas colaboran en la maduración de la vasculatura (Goossens *et al.*, 2011). La línea Cre utilizada para deleccionar endogлина en el macrófagos (*LysM*), *per se* no ha inducido la formación de MAVs en el cerebro tras aplicar un estímulo angiogénico (Choi *et al.*, 2014). Sin embargo, este hecho no descarta que los macrófagos contribuyan a la formación de MAVs puesto que tanto monocitos como macrófagos están asociados a MAV epiteliales en HHT (Braverman *et al.*, 1990), pudiendo aportar además importantes señales pro-angiogénicas. Un tipo celular clave en la arquitectura vascular son las vSMCs y de nuevo en este tipo celular, tanto la anulación de la expresión de *endogлина* como de *Acvrl1* no afecta a los vasos sanguíneos (Garrido-Martin *et al.*, 2014). Tampoco se observó dicho efecto tras eliminar la expresión de *Alk1* en pericitos (Chen *et al.* 2014). Todos estos modelos refuerzan la teoría en la que se afirma que la haploinsuficiencia de endogлина o *Alk1* en la célula endotelial es un prerrequisito indispensable para la formación de MAVs en pacientes HHT. Pero de momento no puede descartarse que otros tipos celulares relacionados con la fisiología vascular no puedan contribuir a su formación.

#### 2.4 Formación de MAVs: teoría de los tres eventos.

De los principales estudios en modelos *Knock-out* condicionales y específicos para HHT, se ha concluido que el tipo celular crítico que se encuentra en la base del fenotipo HHT, es la célula endotelial. Dicho de otro modo, la expresión de *Eng* y *Acvrl1* en endotelio protegen frente a la formación de MAVs y eventuales hemorragias derivadas de las mismas, mientras que la pérdida de expresión de *Eng* o *Acvrl1* en vSMCs, pericitos o macrófagos no dan lugar a la aparición de síntomas HHT. En estos modelos, cabe destacar que la pérdida de expresión de *Eng* o *Acvrl1* en las células endoteliales no tiene lugar en todas las células endoteliales presentes en la MAV y probablemente nos encontramos frente a un mosaicismo. Además de esto, se requiere de un cierto tiempo para que una MAV se forme en estos modelos animales; tanto MAVs dérmicas como las de retina aparecen a lo largo de varios días y posteriormente se van dilatando con el tiempo (Tual-Chalot *et al.*, 2015).

Los datos obtenidos de modelos animales han dado lugar a una nueva teoría de formación de MAVs conocida como “La teoría de los tres eventos para la formación de MAVs”. En esta teoría se cree que son necesarios tres eventos para que una MAV tenga lugar en un paciente HHT. En primer lugar está la condición de heterozigosis para *ENG* o *ACVRL1*, por tanto deben presentar una mutación patológica en uno de los dos alelos. En segundo lugar nos encontramos con la pérdida de heterozigosis. Esta última condición puede tener lugar por la adquisición de una nueva mutación somática (pérdida total de la función génica de *ENG* o

*ACVRL1*) o bien por la acción de proteólisis que conlleve a la pérdida de expresión de la proteína en membrana (esta última sólo en el caso de endogлина). Y por último, se necesita un estímulo proangiogénico, bien sea por angiogénesis durante el desarrollo embrionario y crecimiento postnatal o la activación endotelial mediada por inflamación/infección, herida o trauma en el individuo adulto, que será el desencadenante de la formación de MAVs (Tual-Chalot *et al.* 2015) (Figura 13). En definitiva, la heterocigosis en *ENG* o *ACVRL1* en pacientes HHT1 y HHT2 respectivamente, es necesaria pero no suficiente para el desarrollo de MAVs. Pero hasta la fecha no se ha podido confirmar la pérdida de heterocigosis en las malformaciones arteriovenosas, por tanto es una tarea pendiente de corroborar.

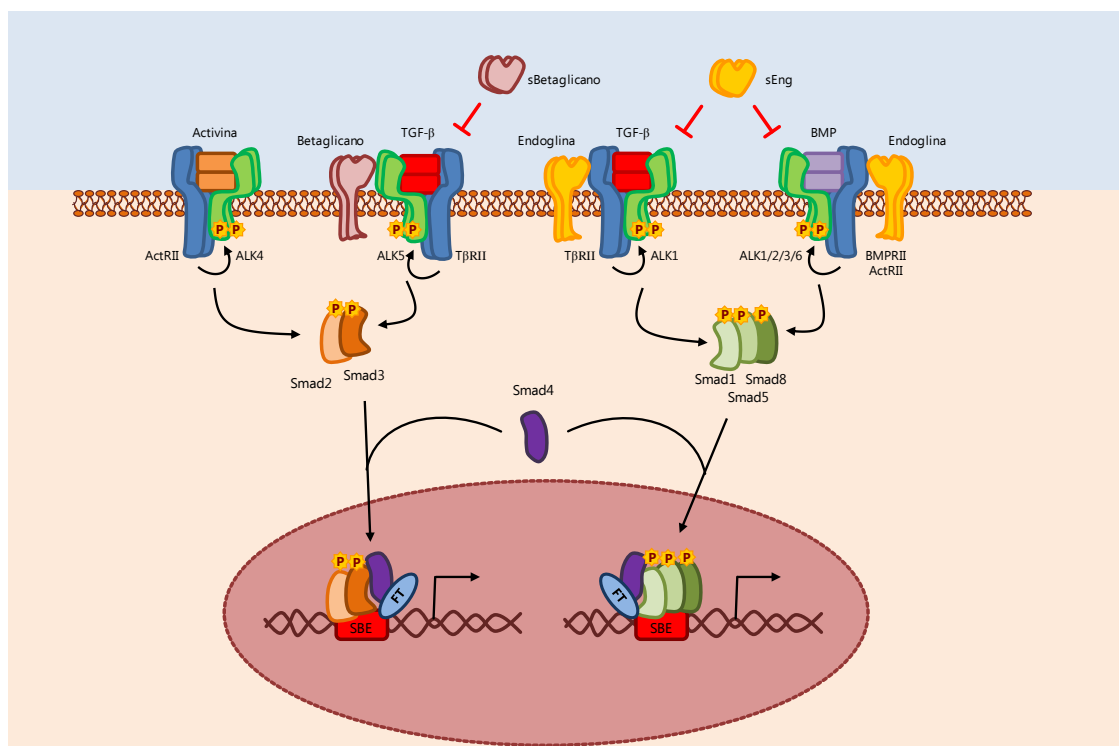


**Figura 13. Formación de MAVs en HHT: teoría de los 3 eventos.** Células endoteliales individuales en los pacientes HHT pueden sufrir una pérdida de proteína endogлина o ALK1 debido a un corte proteolítico o una mutación somática. Si los vasos que contienen esas células nulas para endogлина o ALK1 de forma transitoria o permanente se someten a un estímulo proangiogénico, éstas células experimentarían una mayor progresión y contribuirían al ensanchamiento de los vasos. Una vez la presión sanguínea haya aumentado en estos vasos, esto actuará como un refuerzo positivo que potenciará mayor proliferación celular y mayor ensanchamiento de los vasos. Teoría desarrollada por Tual-Chalot *et al.*, 2015.

### 3 Sistema de señalización TGF- $\beta$ .

La familia del TGF- $\beta$  está constituida por una familia de moléculas con efectos pleiotrópicos en la proliferación celular, la diferenciación, la migración y la supervivencia, así como la producción de la matriz extracelular y su deposición (Massague *et al.*, 2000; Massague, 2000). Estas funciones afectan a múltiples procesos biológicos incluyendo desarrollo, carcinogénesis, fibrosis, reparación (*wound healing*) y la respuesta inmune (Blobe *et al.*, 2000). Este grupo de factores de crecimiento incluyen TGF- $\beta$ s, activinas y BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*). La superfamilia del TGF- $\beta$  media sus funciones biológicas a través de su unión a los receptores transmembrana serina/treonina quinasa tipo I y II. Aunque se han identificado más de 35 miembros pertenecientes a la familia del TGF- $\beta$ , sólo se han

identificado 5 receptores tipo I (activin receptor like kinase, ALK family) y 7 receptores tipo II (Chang *et al.*, 2002). En concreto, los miembros de la familia del TGF- $\beta$  inician sus actividades sobre la superficie celular uniéndose a un complejo receptor heterodimérico constituido por un receptor serina/treonina quinasa tipo I y un receptor tipo II. Cada uno de los ligandos de la superfamilia del TGF- $\beta$  presenta un complejo específico de receptores tipo II y tipo I con los que interacciona. Los receptores de señalización para el TGF- $\beta$ 1 son el receptor tipo II conocido como T $\beta$ RII y los receptores tipo I ALK5 (también denominado T $\beta$ RI) y ALK1 (Lux *et al.*, 1999; Goumans *et al.*, 2002). ALK1 en colaboración con T $\beta$ RII es capaz de unir TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 (Lux *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2000). También presenta la capacidad de unir otros ligandos de la superfamilia del TGF- $\beta$  como son BMP9 y BMP10. Ambos ligandos están implicados en migración y crecimiento celular, y presentan una mayor afinidad por ALK1, induciendo una respuesta específica y sostenida en el tiempo (David *et al.*, 2007; Scharpfenecker *et al.*, 2007). Las activinas señalizan vía su receptor tipo II o ActRII y ALK4, y los BMPs transducen sus efectos vía el receptor tipo II de BMPs (BMPRII) y el ActRIIs y los receptores tipo I ALK1-2-3 y -6. (ten Dijke *et al.*, 2008) (Figura 14).



**Figura 14. Señalización de la superfamilia del TGF- $\beta$  en células endoteliales.** La señalización de los miembros de la familia del TGF- $\beta$ , que incluye TGF- $\beta$ s, activinas y BMPs, tiene lugar a través de sus receptores específicos tipo I y tipo II que presentan una actividad serina/treonina quinasa. Los correceptores (o receptores accesorios) betaglicano y endoglina actúan modulando la señalización de la familia del TGF- $\beta$ . La endoglina soluble (sEng) o el betaglicano soluble (sBetaglicano), pueden secuestrar al ligando y por tanto inhibir su unión al receptor. En muchas células la señalización del TGF- $\beta$  funciona vía T $\beta$ RII y ALK5. En las células endoteliales también señaliza a través de otro receptor tipo I, el ALK1. Las activinas señalizan vía ActRII y los receptores tipo I ALK1, ALK2, ALK3 y ALK6. Los receptores tipo I actúan tras la acción de los receptores tipo II y determinan la señalización específica del complejo receptor. Los receptores tipo I activados inician la señalización intracelular fosforilando a R-Smads. La activación de



ALK1, ALK2, ALK3 y ALK6 da lugar a la fosforilación de Smad1, Smad5 y Smad8. La activación de los receptores tipo I ALK4, ALK5 y ALK7 fosforila a Smad2 y Smad3. Las R-Smads activas se acoplan a Smad4 formando un complejo heteromérico que se transloca a núcleo. Los complejos heteroméricos de las proteínas Smad en núcleo, regulan la expresión de genes específicos junto a la acción de otros factores de transcripción de unión a ADN. ActR, receptor activina; BMP, *bone morphogenetic protein*; BMPR, receptor de BMP; sEng, endogлина soluble; sBetaglicano, betaglicano soluble; T $\beta$ R, receptor de TGF- $\beta$ ; FT, factor de transcripción. Adaptado de Ten Dijke *et al.*, 2008.

La unión del ligando al receptor tipo II induce el reclutamiento del receptor tipo I que es fosforilado y a su vez fosforilará a los miembros de la familia de proteínas Smad<sup>7</sup>. Una vez las proteínas Smad han sido activadas, éstas se traslocan al núcleo y regulan la expresión de genes diana junto a factores de transcripción (Heldin *et al.*, 1997; Schmierer *et Hill*, 2007). El receptor tipo II está constitutivamente activo y fosforila al receptor tipo I en unos residuos serina y treonina localizados en su región juxtamembrana (Wrana *et al.*, 1994). El receptor tipo I propaga la señal en la célula mediante la fosforilación de unos receptores específicos reguladores conocidos como (R-) Smads en dos residuos serina carboxiterminales (Abdollah *et al.*, 1997; Souchelnytskyi *et al.*, 1997). Mientras que el TGF- $\beta$  y las activinas mayoritariamente señalizan vía R-Smad2 y Smad3, las BMPs activan las R-Smad1, Smad5 y Smad8 (Hoodless *et al.*, 1997; Eppert *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996; Lagna *et al.* 1996). Las R-Smads activadas, forman un complejo heteromérico con un mediador común o Co-Smad, que en mamíferos es Smad4. Este complejo heteromérico se trasloca a núcleo y allí actúa como factor de transcripción junto a otros complejos y co-activadores o co-represores (Lagna *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1997; Feng *et al.*, 1998).

Debido al papel que los miembros de esta familia juegan en proliferación, diferenciación y migración celular, no es de sorprender que la alteración o desregulación del sistema de señalización de los miembros de la familia del TGF- $\beta$  esté relacionada con una gran variedad de enfermedades humanas como el cáncer, fibrosis, y enfermedades autoinmunes y vasculares (Blobe *et al.*, 2000; ten Dijke *et Arthur*, 2007). Por ejemplo, las mutaciones en *ENG* y *ACVRL1* dan lugar a la HHT1 y HHT2 respectivamente. No es de extrañar que ambos tipos de HHT muestren el mismo cuadro clínico ya que ambas proteínas intervienen en la misma ruta de señalización (Berg *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1996; McAllister *et al.*, 1994).

### 3.1 TGF- $\beta$ 1 en el sistema endotelial

La importancia del sistema de señalización del TGF- $\beta$  en la morfogénesis vascular quedó patente por la inactivación de diversos componentes de la vía de señalización de TGF- $\beta$  en modelos animales de ratón, donde la inactivación de algunos componentes se traduce en una

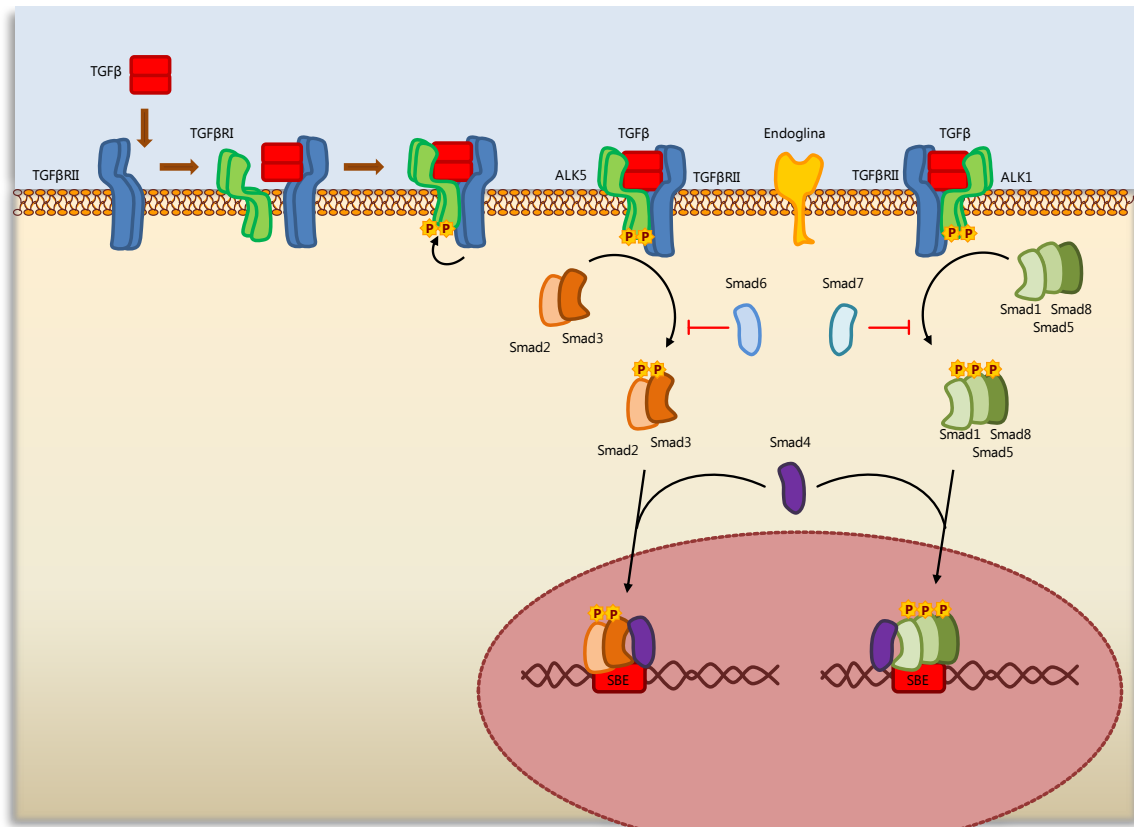
---

<sup>7</sup> Las proteínas Smad reciben su nombre por una fusión de las primeras proteínas identificadas de su clase de efectores de señalización. Las primeras proteínas se identificaron en *C. elegans* conocidas como Sma y en *Drosophila*, conocidas como Mad. De ahí la unificación del nombre a Smad.

muerte embrionaria a media gestación debido a una deficiencia en la vasculogénesis del saco vitelino (ten Dijke *et al.*, 2007; véase apartado 2 de introducción). El TGF- $\beta$ 1 es una citoquina multifuncional que pertenece a la superfamilia del TGF- $\beta$ , e inhibe la replicación de células endoteliales y además reduce la proteólisis extracelular *in vitro* (RayChaudhury *et al.*, 1991). Algunos autores han descrito que TGF- $\beta$ 1 promueve la formación de estructuras tubulares (tube-like structures) en geles de colágeno (Madri *et al.*, 1988; Merwin *et al.*, 1990), mientras que otros estudios demuestran que TGF- $\beta$ 1 inhibe la invasión y formación de tubos en células endoteliales (Muller *et al.*, 1987; Pepper *et al.*, 1990; Mignatti *et al.*, 1989). Posteriormente, estos resultados contradictorios encontraron un consenso en un trabajo en el que se mostró que TGF- $\beta$ 1 presenta un comportamiento bifásico en la angiogénesis dependiendo de su concentración (Pepper *et al.*, 1993). A elevadas concentraciones, TGF- $\beta$ 1 inhibe la invasión celular y la formación de capilares en células endoteliales inducida por VEGF, mientras que concentraciones bajas de TGF- $\beta$ 1 potencia la actividad del VEGF. Este comportamiento bifásico es debido a la presencia de dos receptores tipo I diferentes en las células endoteliales, ALK1 y ALK5. La señalización a bajas concentraciones de TGF- $\beta$ 1 está mediada por ALK1 y a elevadas concentraciones por ALK5 (Goumans *et al.*, 2002). De este modo, el TGF- $\beta$ 1 presenta un efecto bifásico en angiogénesis mediado por sus receptores tipo I. Así, la señalización del TGF- $\beta$  vía ALK1 da lugar a la estimulación de la migración y proliferación de las células endoteliales, mientras que la señalización del TGF- $\beta$  vía ALK5 inhibe dichas respuestas biológicas (Goumans (a) *et al.*, 2003). Además de esto, la vía ALK5/Smad2/3 inhibe la señalización vía ALK1-Smad1/5 y viceversa, siendo ALK5 requerido para una eficiente señalización TGF $\beta$ /ALK1 (Goumans (b) *et al.*, 2003).

Los co-receptores o receptores auxiliares del TGF- $\beta$ , también conocidos como receptores tipo III, tales como el betaglicano y la endogлина, a través de otros mecanismos son capaces de regular la especificidad de la señalización de los miembros de la familia del TGF- $\beta$ . De este modo, el TGF- $\beta$ 2 requiere la presencia del betaglicano para llevar a cabo una señalización eficiente puesto que presenta una baja afinidad por el TGFBR2 (Sankar *et al.*, 1995). Endogлина es capaz de unirse a los componentes del complejo receptor TGF- $\beta$ , que modula multitud de respuestas celulares, entre ellas la angiogénesis y los procesos de diferenciación. De hecho, endogлина se une a TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 con alta afinidad ( $\kappa_D=50$  pM) en células endoteliales humanas (Cheifetz *et al.*, 1992). La presencia de endogлина es requerida para una eficiente señalización vía ALK1 (Lebrin *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2005). La sobreexpresión de endogлина inhibe la señalización de TGF $\beta$ /ALK5 (Guo *et al.*, 2004; Scherner *et al.*, 2007) y la inhibición del crecimiento inducida por TGF- $\beta$  (Letamendía *et al.*, 1998; Lastres

*et al.*, 1992; Lebrin *et al.*, 2004) (Figura 15). En concordancia con ello, se ha comprobado que el silenciamiento de la expresión de endogлина o el tratamiento con anticuerpos neutralizadores, se traduce en una inhibición de la señalización vía TGF $\beta$ /ALK1, y se potencia la señalización vía TGF $\beta$ /ALK5 (Lebrin *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2000; Blanco *et al.*, 2005; She *et al.* 2004).



**Figura 15. Endogлина modula la señalización de TGF- $\beta$ 1 en la célula endotelial.** Cuando el ligando TGF- $\beta$  se une a T $\beta$ RII, transmite la señal al T $\beta$ RI y recluta al receptor auxiliar o modulador de la señal, Endogлина. T $\beta$ RI se fosforila, formándose el complejo receptor de TGF- $\beta$ . En las células endoteliales existen dos tipos distintos de complejos receptores según el T $\beta$ RI que lo forme, ALK1 o ALK5. Cuando el dímero de ALK1 se fosforila, éste fosforila a su vez a los factores de transcripción Smad1/5/8 que tras unirse a Smad4 y traslocarse al núcleo, se asocian a la maquinaria de transcripción (MT) y promoverán la expresión de genes implicados en la activación de la angiogénesis, mientras que si se fosforila ALK5, se activará la expresión de genes implicados en la resolución de los vasos, promovido por las Smad2/3. El TGF- $\beta$  regula el estado del endotelio mediante un equilibrio entre ambas rutas de señalización. La relación entre ellas determinará si el TGF- $\beta$  tiene un efecto proangiogénico o antiangiogénico.

### 3.2 Alteraciones del sistema de señalización de TGF- $\beta$ en HHT

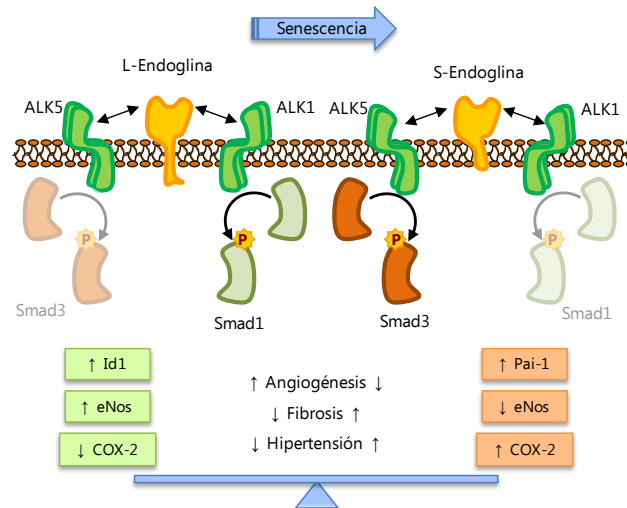
El papel dual del TGF- $\beta$  en el sistema endotelial está tras la causa de la aparición de la HHT tipo 1 y tipo 2. En esta situación, debido a la haploinsuficiencia en *ENG* o *ACVRL1*, la señalización vía TGF- $\beta$ /ALK1 estaría atenuada y potenciada la vía de señalización TGF- $\beta$ /ALK5. De este modo los procesos de activación de la angiogénesis como proliferación y migración celular se ven afectados promoviendo la aparición de MAVs (Fernandez-L *et al.*, 2006). Estas deficiencias en proliferación y migración celular se han podido observar tanto en cultivos primarios de células endoteliales de ratones *Eng*<sup>+/-</sup> así como en células endoteliales aisladas de

los precursores de células endoteliales circulantes en sangre periférica de pacientes HHT (Lebrin F *et al.*, 2004; Fernandez-L *et al.*, 2005).

Por otro lado, saber si los pacientes presentan mutaciones en *ENG* o *ACVRL1*, no predice la evolución de la HHT ya que la sintomatología es similar en ambos tipos de HHT. Sin embargo, el diferente patrón en la manifestación de la enfermedad en miembros de una misma familia tanto en el hombre como en los modelos animales, sugiere que otros factores genéticos o ambientales modulan el fenotipo HHT. Conocer y entender esos agentes modificadores, sería crucial para entender el desarrollo de las lesiones vasculares en HHT, y ayudará a comprender a través de qué vías se mantiene la integridad de una vasculatura normal.

En rara ocasión los pacientes HHT presentan sangrados nasales o gastrointestinales en la infancia. En la mayoría de los casos, el desarrollo de la sintomatología es dependiente de la edad y el diagnóstico no se sospecha hasta la adolescencia o edades adultas, cuando se hacen claramente visibles las telangiectasias y el aumento de las epistaxis (McDonald *et al.*, 2000). La penetrancia de la enfermedad aumenta con la edad, principalmente en lo que se refiere a sangrados en mucosas como la nasal y la gástrica. Este fenómeno puede explicarse por la senescencia de las células endoteliales, donde los procesos vasculares como la angiogénesis, el tráfico de nutrientes, la reparación vascular y la homeostasis están afectados por la atenuación de la proliferación, migración y las repuestas de dilatación de las células endoteliales (Brandes *et al.*, 2005). En el contexto endotelial coexisten dos isoformas de endoglina, la isoforma larga (L-endoglina) y la isoforma corta (S-endoglina), denominadas así por sus diferencias en la longitud del tallo citoplásmico (Figura 6). La isoforma mayoritaria es L-endoglina, de tal modo que cuando se hace referencia a endoglina sin especificar la isoforma, se está haciendo referencia a la isoforma mayoritaria, la L-endoglina. Sin embargo, durante el proceso de senescencia endotelial *in vitro* y el envejecimiento en ratones, los niveles de S-endoglina aumentan, incrementando la ratio S/L de las isoformas de endoglina (Blanco *et al.*, 2008). S-endoglina se genera por un mecanismo de *splicing* alternativo consistente en la retención del último intrón de *ENG* en el ARNm (Blanco *et al.*, 2011). El efecto de S-endoglina sobre el sistema de señalización de TGF- $\beta$  es opuesto al ejercido por L-endoglina. S-endoglina es capaz de interactuar con ambos tipos de receptor tipo I de TGF- $\beta$ , ALK5 y ALK1, pero la interacción con ALK5 es más potente que con ALK1. De este modo, S-endoglina potencia la vía de señalización de ALK5, dando lugar a un aumento de PAI-1, mientras que inhibe la ruta de ALK1 que se traduce en la disminución de la expresión de Id1 (Figura 16). Pai-1 e Id1 son específicamente dependientes de la señalización TGF- $\beta$ /ALK5 o TGF- $\beta$ /ALK1, respectivamente

(Lebrin *et al.*, 2004; Ota *et al.*, 2002). S-endoglina está asociada a una menor tasa de proliferación de las células endoteliales y a una deficiencia de la homeostasis vascular dependiente de óxido nítrico. Estos datos sugieren que la isoforma corta de endoglina contribuye a la patología vascular dependiente de la edad (Blanco *et al.*, 2008).



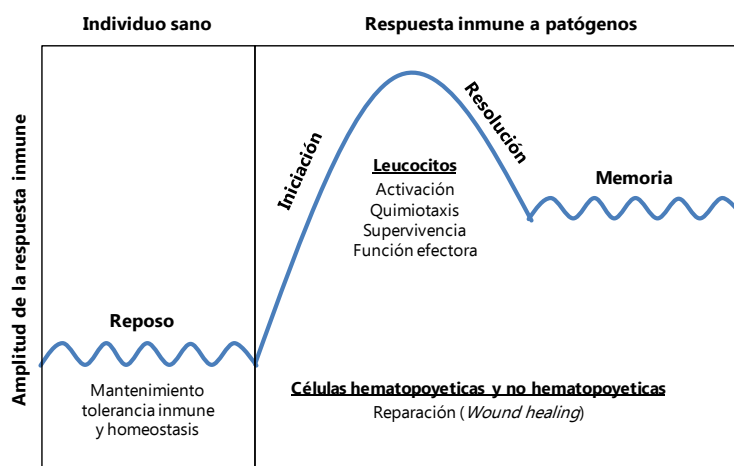
**Figura 16. Modelo de acción de S-endoglina durante la senescencia endotelial.** En condiciones de normalidad, la respuesta de las células al TGF- $\beta$  está modulada por L-endoglina, pero en las células senescentes, S-endoglina se induce, interaccionando con el complejo receptor de TGF- $\beta$  que contiene ALK1 y ALK5. Como consecuencia de esta interacción, S-endoglina regula la expresión de diferentes genes diana del TGF- $\beta$  como *Pai-1*, *Id1*, *eNOS* y *COX-2*. De este modo, S-endoglina estaría potenciando un cuadro de patología vascular mediante: i) inducción de *Pai-1* y por tanto la síntesis de matriz extracelular que daría lugar a un aumento de fibrosis, ii) represión de *Id1* que estaría asociado a una deficiencia en angiogénesis y, iii) represión de *eNOS* e inducción de *COX-2* promoviendo un cuadro de hipertensión. El papel de  $\beta$ RII, TGF- $\beta$  y los dímeros S-endoglina/L-endoglina han sido omitidos para simplificar la figura. Adaptado de Blanco *et al.*, 2008.

El aumento de la penetrancia de la sintomatología HHT con la edad estaría asociado a los procesos de envejecimiento fisiológico de las células endoteliales. Si bien, cabe destacar que el aumento de la ratio S/L de las isoformas de endoglina, en el paciente HHT contribuirá a que la sintomatología HHT aparezca con anterioridad a los patologías vasculares asociadas con la edad. Tanto en pacientes HHT1 como HHT2, la vía de señalización TGF- $\beta$ /ALK1 sufrirá un mayor detrimento en tanto en cuanto la ratio S/L de endoglina aumente, este fenómeno contribuirá así a la ya deficiente vía de señalización de TGF- $\beta$ /ALK1 en el paciente HHT debido a la haploinsuficiencia en endoglina o ALK1, precipitando así las deficiencias ya presentes en los procesos de angiogénesis.

### 3.3 Papel de TGF- $\beta$ en el sistema inmunológico.

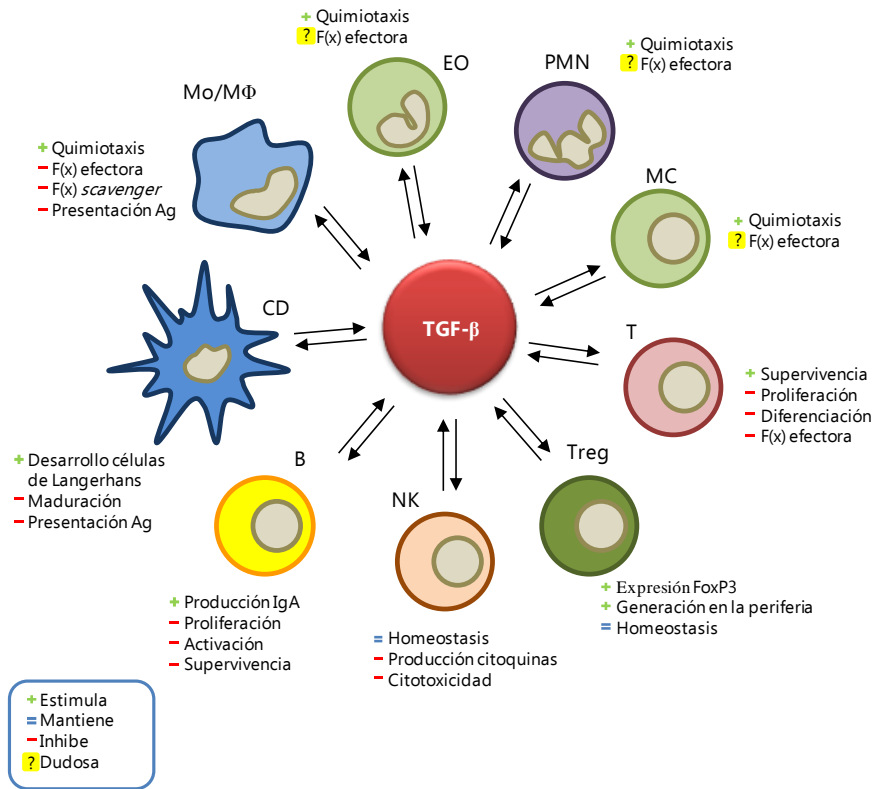
El papel clave del TGF- $\beta$  en el sistema inmune es mantener la tolerancia mediante la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de linfocitos. Siendo además una pieza clave en el control del inicio y la resolución de las respuestas inflamatorias a través de la regulación de la quimiotaxis, proliferación y supervivencia de linfocitos, células NK (*Natural*

Killer), células dendríticas, macrófagos, mastocitos y granulocitos. La actividad reguladora del TGF- $\beta$  está modulada por el estado de diferenciación celular y por la presencia de citoquinas inflamatorias y moléculas coestimuladoras (Li *et al.*, 2006). Todas estas funciones otorgan al TGF- $\beta$  la capacidad de prevenir el desarrollo de inmunopatologías hacia antígenos propios o no patógenos, sin comprometer la respuesta inmune a patógenos. Dicho de otra manera, el papel principal del TGF- $\beta$  en el sistema inmune es inducir tolerancia, al igual que contener y resolver la inflamación (Figura 17).



**Figura 17. Regulación de la tolerancia y la inmunidad por el TGF- $\beta$ .** La señalización del TGF- $\beta$  está acoplada a otros cambios ambientales, permitiéndole así de actuar sobre el mantenimiento de la tolerancia periférica y la homeostasis inmune durante el estado de reposo en un individuo sano. El TGF- $\beta$  es esencial para la iniciación de la respuesta inmune que protegerá al individuo frente a patógenos, siendo a su vez clave en la regulación de la respuesta inmune ya que controla el umbral de activación de las células efectoras y contribuye a los procesos de quimiotaxis. Regulando la función y supervivencia de los leucocitos activados y el proceso de reparación, TGF- $\beta$  contribuye a resolver la respuesta inmune. La respuesta inmune puede dar lugar al desarrollo de una memoria inmunológica que proporciona protección a largo plazo. El papel del TGF- $\beta$  en la generación y el mantenimiento de las células de memoria aún requiere más investigación. Algunos de los procesos regulados por el TGF- $\beta$  durante cada fase de la respuesta inmune son mostrados. Adaptado de Li *et al.*, 2006.

La primera observación del papel regulador del TGF- $\beta$  sobre las funciones celulares inmunológicas tuvo lugar hace 3 décadas (Kehrl *et al.*, 1986) pero fue en la década de los 90s, cuando la generación de un modelo de ratón KO para el TGF- $\beta$ 1 estableció el papel central de esta citoquina en la inhibición de los procesos inflamatorios y el desarrollo de enfermedades autoinmunes (Shull *et al.*, 1992; Kulkarni *et al.*, 1993). Los ratones deficientes en TGF- $\beta$ 1 presentaban un desarrollo embrionario normal, pero a partir de los 20 días de edad desarrollaban una enfermedad inflamatoria multifocal, donde se observaba un infiltrado masivo de linfocitos y macrófagos en multitud de órganos y una necrosis de tejidos, lo que daba lugar a la muerte del individuo debido a un fallo multiorgánico. En la actualidad, el TGF- $\beta$  es conocido por sus actividades sobre todos los linajes leucocitarios (Figura 18).



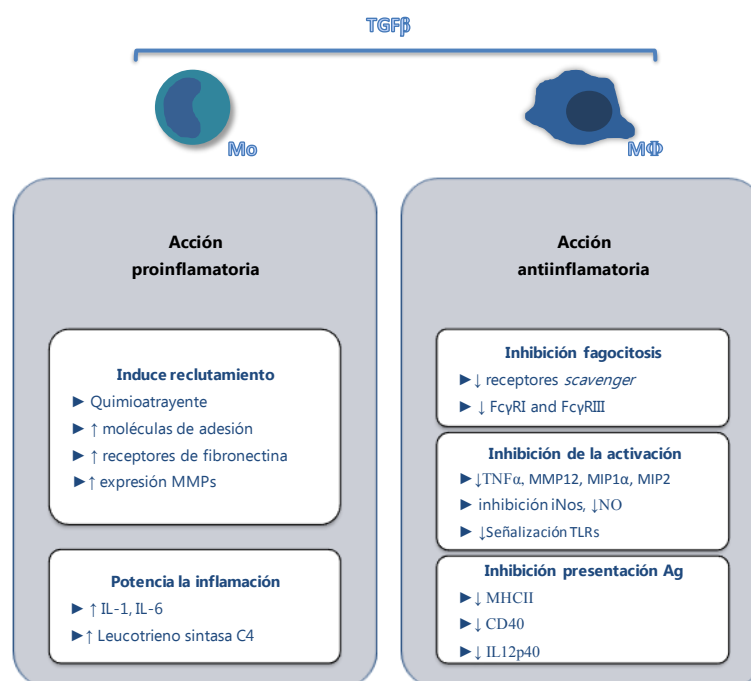
**Figura 18. Efectos pleiotrópicos del TGF-β sobre los leucocitos.** Todos los leucocitos producen y responden a TGF-β. El símbolo yin-yang ilustra que el TGF-β ejerce tanto efectos estimulatorios como inhibitorios en las células del sistema inmune. (MC, mastocitos; EO, eosinófilos; MO/Mφ, monocito/macrófago; F(x), función).

Existen tres isoformas del TGF-β presentes en mamíferos; TGF-β1, TGF-β2 y TGF-β3, todas ellas codificadas en genes diferentes (Govinden *et al.*, 2003). La isoforma TGF-β1 es la predominante en el sistema inmune, pero cabe destacar que las tres isoformas muestran las mismas propiedades *in vitro*.

Como ya se ha expuesto en apartados anteriores, la forma activa del TGF-β ejerce sus funciones uniéndose al TGFBR2 para posteriormente reclutar el TGFBR1. Tanto TGF-β1 como TGF-β3 se unen con alta afinidad al TGFBR2, sin embargo una unión estable de la isoforma TGF-β2, únicamente tendrá lugar en presencia del betaglicano unido a membrana, también conocido como TGFBR3 (Brown *et al.*, 1999). En el sistema inmunológico, TGF-β media su señalización o funciones principalmente vía ALK5, un TGFBR1. Aunque ALK5 no es requerido para la unión inicial del TGF-β, sí que es necesario para la señalización. El dímero activo de TGF-β unido al complejo receptor tetramérico compuesto por ALK5 y TGFBR2 constituyen el inicio de la señalización celular (Massague, 1998). En las células endoteliales, TGF-β dispone de un receptor tipo I alternativo para la señalización conocido como ALK1, sin embargo, su implicación en las funciones celulares inmunológicas es desconocida (ten Dijke *et al.* Hill, 2004; Blanco *et al.*, 2005).

### 3.4 Acción del TGF- $\beta$ sobre el monocito/macrófago

Los macrófagos son fagocitadores profesionales que tienen un papel principal en la eliminación de células apoptóticas y restos celulares (Gregory *et Devitt*, 2004). Además de esto, también fagocitan microbios y producen mediadores inflamatorios ante una invasión microbiana. Otro punto no menos importante y clave para la respuesta inmunitaria, es que los macrófagos realizan la presentación de antígeno a las células T regulando así la respuesta inmune adaptativa. El TGF- $\beta$  también juega un papel clave en la regulación de las funciones del linaje monocito/macrófago. Este papel parece depender del estado de diferenciación celular; a *grosso modo*, el TGF- $\beta$  estimularía células en el estado de quiescencia o reposo (monocitos), mientras que las células activadas, es decir los macrófagos, serían inhibidos por el TGF- $\beta$  (Ashcroft *et al.*, 1999) (Figura 19).



**Figura 19. Acción del TGF- $\beta$  sobre el monocito y macrófago.** El TGF- $\beta$  juega un papel clave en la regulación de las funciones del monocito (Mo) y el macrófago (M $\Phi$ ). Este papel parece depender del estado de diferenciación celular; generalmente, el TGF- $\beta$  estimularía células en el estado de quiescencia o reposo (Mo), mientras que las células activadas, en este caso el M $\Phi$ , serían inhibidos por el TGF- $\beta$ . En la figura se muestran algunos de los mecanismos a través de los cuales el TGF- $\beta$  ejerce su papel regulador sobre estas células.

#### 3.4.1 Acción del TGF- $\beta$ sobre el monocito.

Uno de los papeles claves del TGF- $\beta$  sobre el monocitos es su capacidad de reclutar este tipo celular hacia los lugares de daño tisular o inflamación mediante múltiples mecanismos. En primer lugar, TGF- $\beta$  actúa como un quimioatrayente para los monocitos (Wahl *et al.*, 1987; Wiseman *et al.*, 1988; Allen *et al.*, 1990). Además, favorece su trans migración induciendo la expresión de moléculas de adhesión como LFA-1 y el receptor de fibronectina, permitiendo así



su unión a la matriz extracelular (Wahl *et al.*, 1993; Bauvois *et al.*, 1992), e induce metaloproteasas de matriz (MMPs) que ayudan a disolver la membrana vascular (Wahl *et al.*, 1993). TGF- $\beta$  potencia la inflamación mediada por el monocito induciendo la síntesis de IL-1, IL-6 y el leucotrieno C4 (Wahl *et al.*, 1987; Turner *et al.*, 1990; Riddick *et al.*, 1999). Este conjunto de observaciones revelan una función proinflamatoria del TGF- $\beta$  sobre los monocitos.

### 3.4.2 Acción del TGF- $\beta$ sobre el macrófago

Entre otras funciones características del macrófago, el TGF $\beta$  actúa inhibiendo su capacidad fagocítica. En células mieloides murinas y en la línea humana THP-1 se comprobó que TGF- $\beta$ 1 reprime la expresión de receptores *scavenger* tales como CD36 y SR-A (Bottalico *et al.*, 1991; Han *et al.*, 2000) y, disminuye la expresión de Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RIII, dos de los receptores de IgGs. En este último caso se ve afectada la fagocitosis de partículas opsonizadas con IgG (Tridandapani *et al.*, 2003), hecho que afecta en gran medida la eficiencia fagocítica del macrófago puesto que la opsonización de los microorganismos potencia en gran medida esta función.

El TGF- $\beta$  inhibe la expresión de diversos mediadores inflamatorios producidos por el macrófago tras estimulación con LPS, tales como TNF $\alpha$  y MMP12, al igual que quimioquinas como MIP1- $\alpha$  y MIP-2 (Bogdan *et al.*, 1992; Werner *et al.*, 2000). También reprime la expresión de la producción de óxido nítrico (NO) y el ion superóxido e inhibe la expresión de la NO sintasa inducible (iNOS) en macrófagos activados (Vodovotz *et al.*, 1993; Tsunawaki *et al.*, 1988; Werner *et al.*, 2000), por lo que se afecta directamente la capacidad de eliminar microorganismos invasores. Este efecto también se vería agravado por la capacidad del TGF- $\beta$  de inhibir la señalización de los receptores *Toll-like* (TLRs), receptores de la respuesta inmune innata implicados en el reconocimiento de microorganismos (Janeway *et Medzhitov*, 2002). Por ejemplo, se ha observado que TGF- $\beta$  inhibe la expresión de CD14 en macrófagos estimulados con LPS por lo que se deduce que éste atenuará la señalización del reconocimiento del LPS por su receptor TLR4, ya que se realiza mediante la cooperación de CD14 (Imai *et al.*, 2000). Otros autores han confirmado que TGF- $\beta$  promueve la degradación de MyD88, un adaptador de la señalización de los TLRs (Naiki *et al.*, 2005). Por lo que, en su conjunto, podemos comprobar que son varios los mecanismos utilizados por el TGF- $\beta$  para inhibir la señalización del macrófago frente a un estímulo microbiano.

Se han descrito diversos mecanismos a través de los cuales el TGF- $\beta$  inhibe la presentación de antígeno por el macrófago. Por un lado, inhibe la expresión del MHC clase II inducida por IFN $\gamma$  mediante la atenuación de CIITA (Nandan *et Reiner*, 1997). Otro punto clave,

es la capacidad de inhibir tanto la molécula coestimuladora CD40 así como la citoquina inflamatoria IL-12p40, resultando en su conjunto en la inhibición de las funciones presentadoras de antígeno en el macrófago (Takeuchi *et al.*, 1998; Du *et Sriram*, 1998). Esta inhibición juega un papel clave en la resolución de una respuesta inmune ya que actúa disminuyendo la estimulación de las células T en el lugar de infección.

## 4 El macrófago

### 4.1 Respuesta inmune innata.

La defensa frente a los microorganismos está mediada por las reacciones tempranas de la inmunidad innata y las respuestas tardías de la inmunidad adaptativa. El sistema inmunitario innato comprende los mecanismos de defensa bioquímicos y celulares presentes incluso antes de que se produzca la infección y dichos mecanismos están preparados para responder con rapidez. Los mecanismos de la inmunidad innata son específicos frente a estructuras que son comunes a grupos de microorganismos relacionados y pueden ser incapaces de distinguir diferencias sutiles entre sustancias extrañas. Es por ello que la respuesta inmune innata se realiza de forma no específica, es decir, las células del sistema innato reconocen, y responden a patógenos de forma genérica y, a diferencia del sistema inmunitario adaptativo, no confiere inmunidad a largo plazo (Abbas *et Lichtman*, 2004).

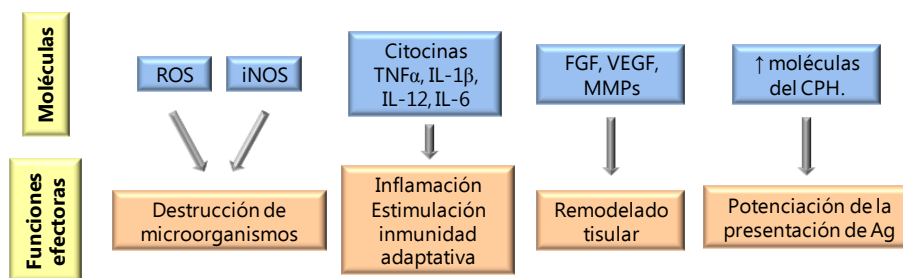
Las funciones principales del sistema inmunitario innato son i) el reclutamiento de leucocitos a los lugares de infección y de inflamación mediante la producción de citoquinas, ii) la activación de la cascada del sistema del complemento para identificar bacterias, activar las células fagocíticas y promover la eliminación de células muertas o de los complejos de anticuerpos, iii) identificación y eliminación de sustancias extrañas por parte de los leucocitos y, iv) activación del sistema inmunitario adaptativo mediante el proceso de presentación de antígeno.

Los principales componentes ante la inmunidad innata consisten en 1) barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias antimicrobianas sintetizadas en las superficies epiteliales; 2) proteínas de la sangre, que influyen componentes del sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación, 3) proteínas que reciben el nombre de citocinas, que regulan y coordinan numerosas actividades de las células de la inmunidad innata, y 4) células efectoras que incluyen: células asesinas naturales o linfocitos citolíticos naturales (células NK, *natural killer*), mastocitos, eosinófilos, basófilos; y las células fagocíticas o fagocitos que incluyen a macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Los fagocitos funcionan dentro del

sistema inmunitario en la identificación y la eliminación de los patógenos que podrían causar infección.

### 4.2 El macrófago: rasgos generales.

Los macrófagos son un tipo celular especializado de fagocitos profesionales que derivan de precursores de la médula ósea roja (MOR) y los Mo de sangre periférica. Los macrófagos ( $M\Phi$ ) son esenciales para el mantenimiento y la defensa de los tejidos del huésped mediante, la detección e identificación, ingestión y destrucción de microorganismos. Pero los  $M\Phi$  activados ejercen otras funciones efectoras como la iniciación de la respuesta inflamatoria y la estimulación de la inmunidad adaptativa mediante la secreción de citoquinas, el remodelado tisular mediante la secreción de factores de crecimiento de fibroblastos, factores angiogénicos y metaloproteasas y potencian la presentación de antígeno mediante el aumento de moléculas del CPH, coestimuladores (Abbas *et al.*, 2004).



**Figura 20. Funciones efectoras de los macrófagos.** Los macrófagos se activan por productos microbianos como el LPS y el IFN- $\gamma$  derivado de los linfocitos NK. El proceso de activación de los macrófagos provoca la activación de factores de transcripción, la transcripción de varios genes y la síntesis de proteínas que median las funciones de estas células.

Los macrófagos expresan una gran variedad de receptores para el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), como los Toll-like receptors, NOD-like receptors, RIG-I family, lecitinas y receptores *scavenger* (Taylor *et al.*, 2005). El reconocimiento de auto-antígenos naturales o alterados así como de microorganismos por estos receptores contribuye a sus funciones básicas de homeostasis, defensa frente a patógenos, mecanismos efectoras de la respuesta inmune innata e inducción de la inmunidad adaptativa.

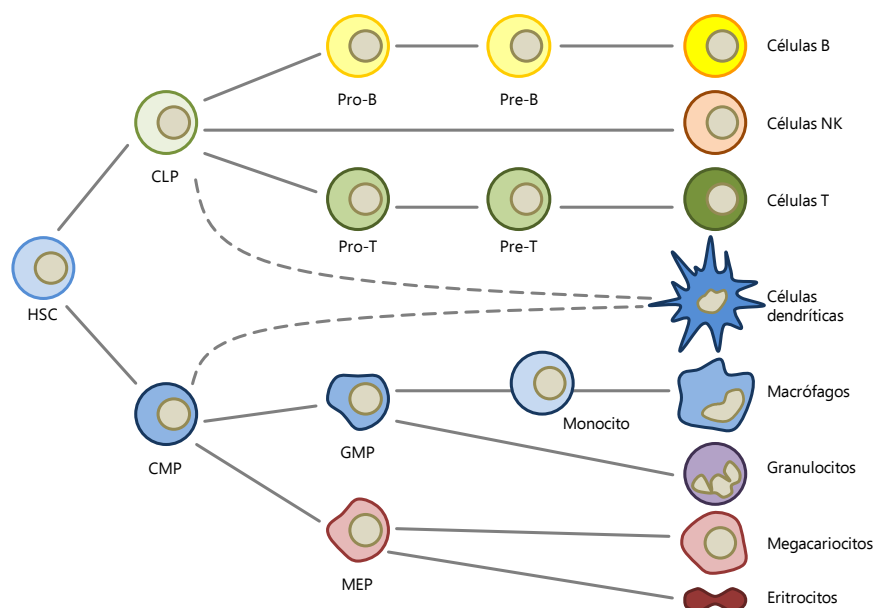
### 4.3 Fenotipo M1/M2

Con frecuencia, los macrófagos han sido clasificados en 2 grupos: el paradigma M1-M2. Este concepto ha sido interpretado en muchas ocasiones como una clasificación rígida de las funciones en el macrófago y no como una simplificación práctica de los rasgos generales del mismo. Los macrófagos M1 o macrófagos de la vía clásica, son aquellos concebidos con un fenotipo inflamatorio y, los macrófagos M2 o de la vía alternativa estarían implicados en el

mantenimiento de la homeostasis además de intervenir en los procesos de angiogénesis (Italiani *et Boraschi*, 2014). La designación M1/M2 es ampliamente usada en el ratón y parece que se conserva en el humano (Martinez *et al.*, 2013). Sin embargo, el tratamiento de monocitos humanos con diversos estímulos da lugar a la adquisición de un espectro de fenotipos de macrófagos cuyos fenotipos estarían entre las definiciones clásicas de M1 y M2. Por tanto la terminología M1/M2 no sería correcta para definir las subpoblaciones de macrófagos humanas *in vivo*. *In vitro*, los macrófagos son polarizados a un fenotipo M1 por la acción de moléculas relacionadas con microorganismos como el LPS y, por citoquinas inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , solas o en combinación. Los macrófagos M1 se caracterizan por la producción de especies reactivas de oxígeno o nitrógeno y de citoquinas inflamatorias. Este fenotipo participa como inductor y célula efectora de la respuesta Th1 y, media la resistencia frente a parásitos intracelulares y tumores (Gordon *et Taylor*, 2005). La polarización al fenotipo M2 *in vitro*, tiene lugar mediante la acción de citoquinas Th2 como IL-4 o IL-13, con la acción simultánea de los receptores Fc $\gamma$  y Toll-like (TLR), complejos inmunes y, moléculas anti-inflamatorias como IL-10, TGF- $\beta$  y glucocorticoides. La expresión de receptores manosa, galactosa y scavenger caracteriza la población M2. Las células M2 forman parte de la respuesta Th2 que está implicada en alergia, eliminación de parásitos, la resolución de la inflamación, el remodelado tisular, angiogénesis, inmunoregulación y la progresión tumoral (Sica *et Mantovani*, 2012). En relación a esta clasificación, los macrófagos tisulares son englobados dentro del tipo M2 debido a su papel durante el desarrollo, el mantenimiento de la homeostasis en el tejido y la resolución de la inflamación (Mantovani *et al.*, 2005; Mantovani *et al.*, 2013). La activación de los macrófagos M2 depende de factores como M-CSF, TGF- $\beta$ , glucocorticoides, IL-4 e IL-13. Los macrófagos tisulares se aproximarían al fenotipo M2 debido a su dependencia del factor de crecimiento M-CSF, implicado en la supervivencia del macrófago ya que es una señal necesaria de auto-renovación para muchas poblaciones de macrófagos embrionarias (Davies *et al.*, 2013). Pero la clasificación en M2 no es del todo correcta puesto que el fenotipo de los macrófagos tisulares va a depender en gran medida del microambiente en el que se encuentran, dando lugar a una gran diversidad y especialización en los macrófagos residentes de tejido. En general, la clasificación M1/M2 es de utilidad para entender la plasticidad de los macrófagos, pero no engloba lo que realmente ocurre en un tejido durante una inflamación. *In vivo*, la secuencia de cambios y escenarios probablemente se traduce en una gran variedad de fenotipos en el macrófago durante el transcurso de la reacción inflamatoria. Por ello, la polarización a M1/M2 debe ser entendida como una simplificación de los diferentes fenotipos que puede adoptar un macrófago, siendo los estados M1 y M2 los extremos de dicha diversidad (Mosser *et Edwards*, 2008).

### 4.4 Origen de los macrófagos: hematopoyesis.

La hematopoyesis, proceso a partir del cual se generan todas las células sanguíneas a partir de los precursores hematopoyéticos presentes en la médula ósea roja (MOR), tradicionalmente se ha dividido en dos campos: la linfopoyesis predominantemente relacionada con el desarrollo de las células linfoides como las células B, T, y las *Natural Killer* (NK); y la mielopoyesis que estudia la formación de células mieloides e incluye monocitos, macrófagos, diferentes subtipos de neutrófilos así como los eritrocitos y las plaquetas (Laiosa *et al.*, 2006). El precursor común de todos los leucocitos son las células madre hematopoyéticas o HSC (*Hematopoietic Stem Cells*) localizadas en la médula ósea. La identificación de las células madres y progenitoras por Weissman y sus colaboradores (Morrison *et al.*, 1995; Morrison *et Weissman*, 1994; Spangrude *et al.*, 1988; Christensen *et Weissman*, 2001; Kondo *et al.*, 1997; Akashi *et al.*, 2000) dio en primer lugar a un árbol de diferenciación hematopoyética caracterizado por una cascada binaria (Figura 21). La diferenciación de las HSC da lugar a dos clases progenitoras diferentes: el precursor común del linaje linfóide o CLP (*common lymphoid precursor*) (Kondo *et al.*, 1997) y el precursor común del linaje mielóide o CMP (*common myeloid precursor*) (Akashi *et al.*, 2000). Los precursores CLP darán lugar a las células pro-B y pro-T, progenitores linfoides todavía no comprometidos en la diferenciación, pero que posteriormente darán lugar a las células maduras B y T (Kondo *et al.*, 1997). Los CLPs también darán lugar al linaje celular NK (*Natural killer*) (Kondo *et al.*, 1997). Sin embargo, los CMPs darán lugar a dos precursores con un potencial de diferenciación aún más restringido: los GMPs, del inglés *granulocyte-macrophage progenitor*, que dará lugar a los neutrófilos polimorfonucleares y monocitos mononucleares y, los MEPs del inglés *megakaryocyte-erythrocyte progenitor*, que son los precursores de megacariocitos y eritrocitos (Figura 21). El *pool* de células mononucleares o sistema de fagocitos mononucleares, puede posteriormente diferenciarse en células dendríticas, macrófagos residentes de tejido y macrófagos reclutados (Geissmann *et al.*, 2010). Sin embargo, existe una peculiaridad en la cascada binaria originalmente propuesta por Weissman y colaboradores: las células dendríticas, ya que pueden tener diferentes orígenes. A *grosso modo* se clasifican en Mac-1/CD11b<sup>+</sup> o células dendríticas “mieloides” y CD8α<sup>+</sup> o células dendríticas “linfoides” (Shortman *et Liu*, 2002). Así es que células dendríticas mieloides y linfoides, funcionalmente equivalentes y fenotípicamente indiferenciables, pueden derivar de ambos precursores; CMPs o CLPs (Traver *et al.*, 2000; Manz *et al.*, 2001). De hecho, los progenitores derivados de los CMPs y los CLPs como los GMPs y las células pro-T (pero no las células pro-B) pueden también dar lugar a estos dos tipos de células dendríticas (Manz *et al.*, 2001).



**Figura 21. Árbol de linajes celulares presentes en la hematopoyesis del individuo adulto.** En la figura se ha representado una modificación del modelo de hematopoyesis en adulto basado en el modelo de Akashi-Kondo-Weissman, con los puntos de ramificación principales entre los linajes linfoides y mieloides.

Algunos factores de transcripción son requeridos por múltiples tipos celulares, al igual que más de un factor de transcripción es requerido para determinar un linaje celular específico. Estos requerimientos sugieren que cada linaje es definido por una combinación específica de factores de transcripción, y por unas interacciones reguladoras específicas que comprometen la red de factores de transcripción (Laiosa *et al.*, 2006). Muchos promotores específicos de macrófagos y granulocitos están regulados por PU.1 y/o C/EBP $\alpha$  (Friedman, 2002). En el proceso de diferenciación de los monocitos está en primer lugar dirigido por el factor de diferenciación de macrófagos o M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) y el factor de diferenciación del granulocito/macrófago o GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) (Lagasse *et Weissman*, 1997). Los factores de transcripción PU.1 y C/EBP $\alpha$  cooperan en la regulación de los genes que codifican los receptores de los factores de crecimiento mieloides como M-CSFR, G-CSFR y GM-CSFR (Tenen, 2003). La diferenciación de los linajes mieloides y linfoides ha sido estudiada principalmente en ratón, y los resultados no son necesariamente extrapolables a humanos.

#### 4.5 El monocito, rasgos generales del precursor del macrófago.

Los monocitos derivados de MOR se clasifican en dos subgrupos en base a los niveles de expresión en superficie del marcador Ly6C (Auffray *et al.*, 2009). Desde la MOR, los monocitos se movilizan a la sangre periférica a través de los receptores de quimioquinas CCR2 y CX<sub>3</sub>CR1 (Combadiere *et al.*, 2008), allí entran en circulación y esperan eventuales señales que los

dirijan a los tejidos. La movilización es un proceso constitutivo, pero puede ser inducida o reprimida en respuesta a estímulos inflamatorios causados por una infección. Estas señales incluyen aquellas señales derivadas del patógeno como son los componentes de la pared celular o, señales endógenas producidas por el huésped, como es la citoquina pro-inflamatoria IFN $\gamma$  o TNF $\alpha$  (Baldrige *et al.*, 2011).

En el ratón, los monocitos circulantes constituyen entre el 1,5 – 4% del total de leucocitos de sangre periférica (Robbins *et Swirski*, 2010). Clásicamente se definen como células que expresan altos niveles de CD11b (o Mac-1), un antígeno implicado en el proceso de quimiotaxis debido a su interacción con el endotelio, y CD115 (el receptor de M-CSF). Los monocitos también pueden expresar el antígeno F4/80, particularmente si se encuentran en el proceso de diferenciación a macrófagos (Sunderkotter *et al.*, 2004). Los monocitos de ratón pueden subdividirse en base a los niveles de expresión de Ly6C (Hume, 2008). Los monocitos Ly6C<sup>alto</sup> son conocidos como monocitos de la vía clásica o monocitos inflamatorios, puesto que son reclutados a los lugares de inflamación donde se activan y actúan como células proinflamatorias. Una vez reclutados a los tejidos periféricos en respuesta a la infección bacteriana, los monocitos Ly6C<sup>alto</sup> secretan mediadores pro-inflamatorios como TNF- $\alpha$ , iNos e interleuquina 12 (IL-12). Los monocitos de la vía alternativa o Ly6C<sup>bajo</sup> parecen estar implicados en la homeostasis de los tejidos. Pueden rodar por largos periodos de tiempo adheridos a la pared endotelial y luego migrar a los tejidos en reposo donde pueden diferenciarse a macrófagos residentes. Aunque su papel exclusivamente homeostático no queda del todo claro puesto que algunos estudios sugieren que también son reclutados mediante un estímulo inflamatorio, caso en el que preceden la llegada de los monocitos Ly6C<sup>alto</sup> en la fase temprana de la respuesta inmune (Verschoor *et al.*, 2012).

Los monocitos humanos que representan aproximadamente el 10% del total de leucocitos de sangre periférica, están menos caracterizados que sus equivalentes en ratón (Auffray *et al.*, 2009). La clasificación convencional de los monocitos humanos se realiza en base a la expresión de CD14, un co-receptor del lipopolisacárido (LPS), y del CD16, un receptor del fragmento Fc gamma. En base a la expresión de CD14/CD16, los tres subtipos principales son: CD14<sup>alto</sup>CD16<sup>neg</sup> (clásicos), CD14<sup>alto</sup>CD16<sup>alto</sup> (intermedios) y, CD14<sup>bajo</sup>CD16<sup>alto</sup> (no clásicos o centinelas). La subclase CD14<sup>alto</sup>CD16<sup>alto</sup> eran conocidos como inflamatorios debido a que las primeras observaciones que los monocitos que expresan CD16 producen TNF- $\alpha$  tras una estimulación con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) como el LPS. Sin embargo, la distinción entre respuestas inflamatorias entre los diferentes monocitos CD14<sup>alto</sup> no es suficiente para diferenciar entre ambas clases de

monocitos CD14<sup>alto</sup>. Es por ello que se ha acuñado el nombre “intermedio” a los monocitos CD14<sup>alto</sup>CD16<sup>alto</sup> ya que parece más apropiado (Verschoor *et al.*, 2009).

Los monocitos humanos y murinos se asemejan en algunos aspectos fenotípicos y funcionales. Por ejemplo, los monocitos CD14<sup>alto</sup> en humanos serían el equivalente a los monocitos Ly6C<sup>alto</sup> en ratón, así como los CD14<sup>bajo</sup> serían el equivalente humano de los Ly6C<sup>bajo</sup> en ratón. Aunque no se ha encontrado el homólogo en humano al Ly6C, los estudios de patrones de expresión entre ambos subtipos (humano vs murino) indican que un elevado número de genes está conservado entre los Ly6C<sup>alto</sup> y los CD14<sup>alto</sup> (Ingersoll *et al.*, 2010). Así como en ratón, la expresión de los receptores de quimioquinas CX<sub>3</sub>CR1 y CCR2 ha sido ampliamente usada para clasificar las subpoblaciones de monocitos humanos. De este modo, los monocitos CD16<sup>neg</sup> son CCR2<sup>alto</sup>, como los monocitos murinos Ly6C<sup>alto</sup>, mientras que los monocitos CD16<sup>alto</sup> son CX<sub>3</sub>CR1<sup>alto</sup> como los murinos Ly6C<sup>bajo</sup> (Verschoor *et al.*, 2012). Además de estos marcadores, la expresión de otros marcadores clave en el inmunofenotipado de las subpoblaciones de monocitos como CD11a, CD11c, CD62L y CD43, se conserva en gran medida entre ambas especies (Ingersoll *et al.*, 2010).

Así como en el ratón, las subclases de monocitos humanos muestran una variedad de respuestas tras una estimulación, aunque la naturaleza del estímulo juega el papel principal en la respuesta. Los monocitos murinos Ly6C<sup>alto</sup> y los humanos CD14<sup>alto</sup> son típicamente clasificados como monocitos proinflamatorios, y por ello tienen una mayor capacidad fagocítica y producen grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias como IL-8 e IL-6 en respuesta a LPS. Dentro de esta clase de monocitos “proinflamatorios”, los monocitos clásicos o CD16<sup>neg</sup> producen grandes cantidades de ROS, mientras que los CD16 “intermedios” segregan grandes cantidades de IL-1β y TNF-α. Sin embargo, los monocitos CD14<sup>bajo</sup> “no-clásicos” juegan un papel principal en la supervivencia local de los tejidos durante el estado de reposo o *steady-state*, de igual forma que sus equivalentes murinos Ly6C<sup>bajo</sup>. Estas células tienen la capacidad de rodar por la pared endotelial actuando como vigías o centinelas y, secretan citoquinas pro-inflamatorias como IL-1β, TNF-α en respuesta a daño tisular/células apoptóticas o agentes virales (Verschoor *et al.*, 2012).

#### 4.6 Origen de los macrófagos tisulares: auto-renovación

Tradicionalmente, el desarrollo de los macrófagos se ha concebido como un proceso de diferenciación lineal, en el que a partir de los precursores en MOR, éstos se diferencian a monocitos que saldrán a la circulación sanguínea para posteriormente diferenciarse a macrófagos tras ser reclutados a diferentes tejidos. Este modelo ha sido discutido en los



últimos años debido a varias evidencias como: una proliferación de macrófagos dentro de un mismo tejido, la constancia de los macrófagos tisulares y la presencia de poblaciones de macrófagos en el saco vitelino antes de que tenga lugar la hematopoyesis primitiva (Davies *et al.*, 2013). Dos fases principales de hematopoyesis embrionaria (primitiva) han sido descritas en el ratón: 1) la hematopoyesis primitiva que tiene lugar en el saco vitelino y produce macrófagos en ausencia de un progenitor monocítico y 2) la hematopoyesis que tiene lugar en el hígado fetal, que se inicia a partir de los progenitores hematopoyéticos de saco vitelino (Italiani *et Boraschi*, 2015). Los macrófagos derivados del saco vitelino o el hígado fetal habían sido considerados de un origen diferente, pero un trabajo reciente ha identificado un precursor eritroide-mieloide común que se origina en el saco vitelino y después migra al hígado (Gómez Perdiguero *et al.*, 2015). Durante la embriogénesis, todos los linajes hematopoyéticos derivan de la hematopoyesis hepática, incluyendo los monocitos circulantes. Los monocitos derivados del hígado fetal colonizan muchos tejidos periféricos (pulmón, bazo, piel, hígado), excepto el cerebro, y dan lugar a la generación de los macrófagos residentes de tejidos, que generalmente coexisten, aunque pueden desplazarlos progresivamente, con los macrófagos tisulares derivados del saco vitelino. Después del nacimiento, tras la formación del hueso, la hematopoyesis deja de realizarse en el hígado y tiene lugar en MOR. Es entonces cuando los monocitos de sangre periférica derivan de los precursores de MOR que eventualmente pueden diferenciarse en macrófagos tisulares en algunos órganos como la dermis y el intestino (Italiani *et Boraschi*, 2015). Los macrófagos que prenatalmente han llegado a los tejidos, proliferan y repoblan los tejidos en expansión con macrófagos residentes de tejido. Gracias a recientes estudios, hoy está aceptado que el origen de varios macrófagos tisulares como microglia, células de Kupffer, macrófagos de la pulpa roja del bazo, macrófagos alveolares y macrófagos peritoneales se originan a partir de precursores embrionarios y proliferan por autorenovación. Los monocitos hepáticos fetales o macrófagos primitivos localizados en el saco vitelino, un tejido extraembrionario, son los precursores de gran parte de los macrófagos residentes de tejido en el individuo adulto. Los macrófagos del saco vitelino se generan a partir de los progenitores eritro-mieloides o EMP (*erythro-myeloid progenitors*) y son claves para la generación de macrófagos durante la gestación, sin embargo, en la edad adulta sólo la microglia se mantiene a partir de estos precursores embrionarios (Hoeffel *et al.*, 2015). Los monocitos fetales que derivan de los EMPs, dan lugar a los macrófagos residentes de hígado, pulmón, piel, riñón, bazo y macrófagos F4/80<sup>alto</sup> de la cavidad peritoneal presentes en el adulto (Hoeffel *et al.*, 2015; Ghosn *et al.*, 2010). Por tanto, el origen de gran parte de los macrófagos residentes de tejido es prenatal y no dependen de los monocitos en circulación para su renovación, al menos en condiciones de reposo (*steady-state*), en ausencia de

infección o un proceso inflamatorio (Yona *et al.*, 2013). Una excepción es el tracto gastrointestinal que contiene grandes poblaciones de macrófagos residentes y todos ellos derivan de los monocitos de sangre periférica en un estado de reposo (Bain *et al.*, 2013). Aún así, a grandes rasgos lo que observaremos en muchos tejidos es que contienen diferentes poblaciones de macrófagos con ambos orígenes, auto-renovación local de las células residentes y diferenciación a partir de monocitos de sangre periférica.

#### 4.7 Macrófagos tisulares.

La microglia está constituida por los macrófagos residentes del sistema nervioso central. El origen de la microglia es en su totalidad de macrófagos del saco vitelino. Tras el nacimiento tiene lugar una proliferación masiva inducida por M-CSF y la IL-34, sin la participación de los monocitos. La microglia se encarga de supervisar la respuesta inmune y eliminar restos celulares, matriz y depósitos de proteínas como la  $\beta$ -amiloide. Para mantener la homeostasis produce factores de crecimiento que promueven la integridad neuronal y, puede alterar el circuito neuronal mediante la ingestión de sinapsis neuronales y la fagocitosis de neuronas apoptóticas. Aunque también promueve el reclutamiento de macrófagos inflamatorios para resolver el daño tisular (Davies *et al.*, 2013, Epelman *et al.*, 2014). Las células de la microglia son positivas para F4/80 e Iba 1.

Estudios realizados con el anticuerpo monoclonal F4/80 en la MOR del ratón, revelaron que existen diferentes poblaciones de macrófagos maduros: las células esteladas F4/80<sup>+</sup> que se localizan en el centro de agrupaciones de células hematopoyéticas y, los osteoclastos (F4/80<sup>-</sup>) que se localizan en la superficie medular y las células F4/80<sup>+</sup> que se localizan en el músculo y tendón (Gordon *et al.*, 2014). Todas estas células aquí referidas expresan CD68 y receptores Fc $\gamma$ . Los macrófagos estromales se asocian a eritroblastos y mieloblastos mientras fagocitan el núcleo eritroide expulsado durante la última fase de la eritropoyesis (Davies *et al.*, 2013). Los osteoclastos son células gigantes multinucleadas que también se localizan en MOR, aunque se encuentran en cualquier parte del hueso. Los osteoclastos colaboran junto a los osteoblastos en la producción del hueso y su reabsorción. Además de ser capaces de reabsorber el hueso, regulan la diferenciación de los precursores de osteoblastos, la movilización de las HSC desde la MOR hasta la sangre periférica y realizan sus funciones típicas de la respuesta inmune (Gordon *et al.*, 2014).

El corazón contiene macrófagos estelados entre las fibras musculares y el pericardio. Los macrófagos cardíacos derivan de progenitores embrionarios, incluyendo la contribución de los macrófagos procedentes del saco vitelino y de los precursores del hígado fetal. Sin embargo, el

infarto de miocardio da lugar a un reclutamiento inflamatorio agudo y crónico (Gordon *et al.*, 2014) por lo que los macrófagos de origen embrionario son reemplazados por los monocitos de sangre periférica. Los macrófagos del corazón participan en la eliminación de cardiomiocitos apoptóticos, vasculogenesis y angiogénesis durante el desarrollo y, coordinan la inflamación, la reparación y la neoplasia. En humanos no se conoce mucho de los macrófagos cardíacos a no ser por la expresión de CD68<sup>+</sup> (Davies *et al.*, 2013).

El bazo es un órgano hematopoyético que sirve como ejemplo para mostrar la diversidad fenotípica de macrófagos. En el bazo encontramos los macrófagos de la pulpa roja, de la pulpa blanca y los macrófagos de la zona marginal (aquí se encuentran dos clases; los metalofílicos que se encuentran alrededor de los sinusoides y los macrófagos de la zona marginal propiamente dichos). Los macrófagos de la pulpa roja son F4/80<sup>+</sup>, mientras que los de la pulpa blanca no lo expresan pero sí altos niveles de CD68 (Gordon *et al.*, 2014). Los macrófagos de la pulpa roja, expresan grandes niveles del receptor de manosa (CD206). A la pulpa roja la sangre llega en un sistema abierto, sin el recubrimiento endotelial y luego recircula a través de los sinusoides venosos (Davies *et al.*, 2013). Los macrófagos de la pulpa roja se encargan principalmente del reciclado del hierro al fagocitar eritrocitos envejecidos o dañados. Los macrófagos de la zona marginal son F4/80<sup>-</sup> y se localizan en la interfaz entre la circulación y células linfoides residentes. De este modo, se encargan de controlar las infecciones que provienen de la sangre y de presentar antígenos a los linfocitos B y T (Epelman *et al.*, 2014; Davies *et al.*, 2013). Los macrófagos de la zona marginal expresan CD169, mientras que los macrófagos metalofílicos expresan DC-SIGN/SIGNR1 y el receptor *scavenger*. Tanto los macrófagos de la zona marginal como los metalofílicos que se encuentran en el centro germinal, están implicados en el control de la respuesta inmune y están colocados de forma estratégica para captar patógenos presentes en la sangre y regular las subsiguientes respuestas adaptativas (Davies *et al.*, 2013). Los macrófagos del centro germinal o pulpa blanca se encargan de eliminar los linfocitos que reconocen antígenos propios.

En el hígado durante el desarrollo embrionario, los macrófagos sostienen el proceso de eritropoyesis fagocitando el núcleo expelido por las células eritroides antes de diferenciarse a eritrocitos anucleados (Davies *et al.*, 2013). Los macrófagos presentes en el hígado (células de Kupffer), al igual que los macrófagos de la pulpa roja en el bazo, son indispensables en la homeostasis del hierro porque reciclan el hierro obtenido de la hemoglobina. Las células de Kupffer se localizan en los sinusoides hepáticos y se encuentran en contacto directo con la circulación portal y los hepatocitos. Los eritrocitos senescentes o dañados son fagocitados liberando la hemoglobina y con ella el hierro que se encuentra en complejos de ferritina o

exportada vía ferroportina (Davies *et al*, 2013). Las células de Kupffer son claves en la regeneración del tejido tras un daño hepático. Cuando esto sucede, se produce una expansión de macrófagos en el hígado donde un componente significativo proviene de los monocitos de sangre periférica. Tras el daño, las células de Kupffer eliminan los restos de hepatocitos y activan un programa que da lugar a la liberación de ligandos de WNT que dirige la diferenciación de los hepatocitos a partir de sus precursores (Epelman *et al*, 2014). Las células de Kupffer se distinguen con facilidad de las células endoteliales del sinusoides porque tienen una elevada expresión del marcador de macrófagos F4/80 (Gordon *et al*, 2014).

El intestino representa la mayor fuente de macrófagos residentes de tejido del cuerpo. Las células F4/80<sup>+</sup> se localizan a lo largo de toda la lámina propia y, también en el feto. El TGF- $\beta$  y la IL-10 son parte responsable del fenotipo de los macrófagos de la lámina propia. Sin embargo, la abundancia de linfocitos, ILC2, NK y NKT, así como células B, linfocitos T, mastocitos y otras células mieloides, junto a una gran cantidad de microorganismos, representan una gran variedad de productos que modulan el fenotipo de los macrófagos gástricos (Gordon *et al*, 2014). Todos los macrófagos derivan de monocitos de sangre periférica (Bain *et al*, 2013).

Los macrófagos alveolares residen en la superficie epitelial del pulmón, y a diferencia de otros macrófagos residentes, ellos están en contacto directo con el ambiente, que incluye bacterias comensales, partículas inhaladas y factores derivados del epitelio como el surfactante. Los monocitos derivados del hígado en el embrión, colonizan el pulmón tras el nacimiento y se diferencian en macrófagos alveolares bajo el estímulo de GM-CSF (Epelman *et al*, 2014). La auto-renovación de los macrófagos alveolares normalmente es independiente de la población de monocitos de sangre periférica. Una de las funciones esenciales de los macrófagos alveolares es eliminar el exceso de proteína surfactante y prevenir así la proteinosis alveolar (Epelman *et al*, 2014). Los macrófagos alveolares expresan bajos niveles de F4/80 y CD11b y, altos niveles de lectinas como CD206. También expresan altos niveles de los receptores *Scavenger* AI/II y MARCO que están implicados en la ingestión de partículas inhaladas. Estos receptores son importantes frente a la defensa de microorganismos aéreos sobre todo en el contexto alveolar donde hay una ausencia de anticuerpos de opsonización y suficientes proteínas del complemento (Gordon *et al*, 2014).

Las células de Langerhans (los macrófagos tisulares de la piel) son morfológicamente diferenciables de las células F4/80 especializadas que se originan a partir de los precursores del saco vitelino. Los macrófagos F4/80<sup>+</sup> de la dermis están asociados a los folículos pilosos y se

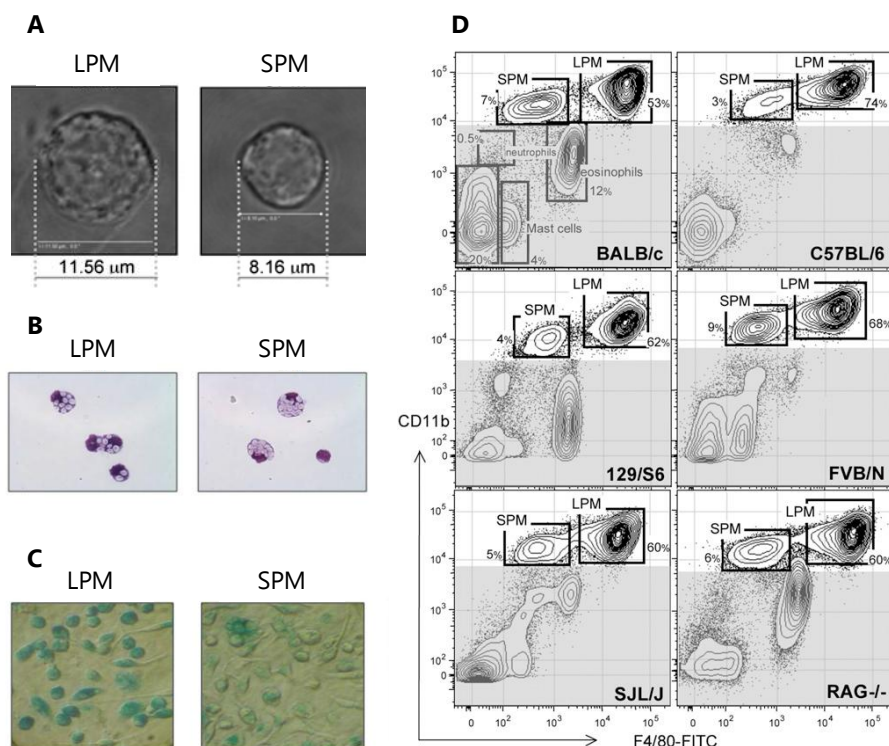
parecen a otros macrófagos de tejidos conectivos (Gordon *et al.*, 2014). Las células de Langerhans pueden ser también identificadas mediante la expresión de su marcador específico Langerin (CD207). Las células de Langerhans pueden ser promovidas a migrar a los nódulos linfáticos por estimulación de antígeno o bien por TNF $\alpha$ .

### 4.7.1 Macrófagos peritoneales.

En muchos trabajos realizados en ratón, las células de la cavidad peritoneal son una fuente de fácil acceso para obtener macrófagos. Otros métodos de amplio uso son la extracción de macrófagos alveolares realizando un lavado broncoalveolar, o bien extraer los precursores de la MOR y diferenciarlos *in vitro*. Es habitual realizar una peritonitis estéril con agentes inflamatorios como el tioglicolato o el Zymosan (*Sacharomyces cerevisiae*) con el fin de aumentar el número de macrófagos obtenidos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que en la cavidad peritoneal del ratón coexisten dos subpoblaciones de macrófagos, que presentan un fenotipo, función y origen diferentes. Estos macrófagos han sido clasificados, de acuerdo con su tamaño en: *large peritoneal macrophages* (LPM) y *small peritoneal macrophages* (SPM) (Ghosn *et al.*, 2010) (Figura 22A). Los LPMs, que son los más abundantes en estado de reposo (*steady-state*) se caracterizan por ser F4/80<sup>alto</sup>MHC-II<sup>bajo</sup>. Los LPM provienen de los precursores embrionarios y la población se mantiene por auto-renovación. Los SPM representan un mínimo porcentaje en la cavidad peritoneal de ratones sin estimular. Presentan un fenotipo F4/80<sup>bajo</sup>MHC-II<sup>alto</sup> y derivan de los precursores de MOR. En respuesta a un estímulo inflamatorio o infeccioso, la composición celular de la cavidad peritoneal cambia drásticamente, de tal modo que los LPM desaparecen y los SPM se convierten en la población predominante junto a sus precursores, los monocitos inflamatorios (Cassado Ados *et al.*, 2015). Los LPM no secretan NO en respuesta a un estímulo mediado por LPS. Sin embargo, los SPM producen grandes cantidades de NO e IL-12 (Cassado Ados *et al.*, 2011). La mayoría de los LPM son células senescentes debido a que presentan una mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa (Cassado Ados *et al.*, 2011) (Figura 22C). Recientemente se ha comprobado que los LPM expresan mayores niveles de S-endoglina que los registrados en los SPM, y que esto se correlaciona con un aumento de la expresión de Pai-1, un marcador de senescencia. Los autores demuestran que el aumento de S-endoglina estaría contribuyendo al proceso general de inmunosenescencia mediante la disminución de migración y proliferación celular y afectando la producción de ROS (Aristorena *et al.*, 2014).

La cavidad peritoneal es un compartimento peculiar dónde residen e interactúan diferentes tipos inmunológicos celulares como macrófagos, neutrófilo, células T, células NK (*natural killer*) y células NKT. La identificación de las células mieloides mediante marcadores de

superficie, es complicado particularmente si hablamos de distinguir LPM, SPM, células dendríticas y monocitos. Es relevante saber que dependiendo de la cepa con la que se trabaje, la composición en células mieloides de la cavidad peritoneal puede variar (Figura 22D).



**Figura 22. Principales características de los macrófagos peritoneales.** (A) Diámetro mostrado por un SPM y un LPM representativo de los macrófagos aislados mediante *FACS-sorting* o *Cell-sorting*. Los LPM presentan un mayor tamaño que los SPM. En base a esta diferencia se ha acuñado el nombre de LPM o *Large Peritoneal Macrophages* y SPM o *Small Peritoneal Macrophages*. (B) Los SPM presentan una mayor actividad fagocítica que los LPM. En la figura se muestran las células aisladas de la cavidad peritoneal tras ser expuestas a Zymosan (30 minutos). Las células fueron seleccionadas por FACS y se tiñeron con H&E. (C) Tinción β-galactosidasa de las células adherentes extraídas mediante un lavado con LPS de la cavidad peritoneal (mayoritariamente LPM) y tras 48 horas de una inflamación mediada por la inyección de *Trypanosoma cruzii*. La gran mayoría de LPM son células senescentes debido a su positividad en la tinción con β-galactosida. (D) La presencia de SPM y LPM en la cavidad peritoneal de distintas cepas de ratón sin estimular, fueron analizadas mediante citometría de flujo en base a la expresión de CD11b y F4/80. Los SPM son típicamente F4/80<sup>bajo</sup>, fácilmente distinguibles de los LPM que se caracterizan por expresar altos niveles de LPM. En todas las cepas se puede observar que los SPM en condiciones de reposo son minoritarios, entre un 3 – 9% del total de células mieloides en PerC. Cabe destacar que en la estirpe C57BL6 prácticamente todas las células de la cavidad peritoneal son macrófagos LPM, siendo la población de SPM la más pequeña representada por un 3% y la población de granulocitos está representada por una pequeña población de eosinófilos, mucho más abundante en otros tipos celulares.



# OBJETIVOS





## II. OBJETIVOS

La HHT es una enfermedad rara caracterizada por una disfunción en los procesos de angiogénesis y la aparición de malformaciones vasculares. Su diagnóstico clínico y/o genético es beneficioso para el seguimiento y tratamiento de los individuos afectados de HHT. Un diagnóstico precoz puede prevenir complicaciones severas para la vida del paciente. No obstante, en ocasiones el diagnóstico clínico no es tan evidente o el diagnóstico genético puede ralentizarse mucho o no identificarse la variante patogénica presente en el paciente. Aunque peor documentado, se ha observado que los pacientes con HHT presentan una notable incidencia de enfermedades infecciosas. Esta observación junto al hecho que endoglin y Alk1 se expresan en el macrófago sugieren que ambas proteínas podrían regular la respuesta inmunitaria. Es por ello, que los objetivos de la presente tesis doctoral son:

1. Análisis de los niveles de sEng y Ang-2 en plasma de pacientes HHT e individuos sanos no-HHT para establecer un diagnóstico molecular.
2. Estudio de procesos infecciosos en la población HHT española.
3. Análisis de la expresión génica diferencial en células mononucleares de pacientes HHT.
4. Análisis de los niveles de expresión de endoglin en macrófagos de ratón.
5. Generación de un modelo murino *knock-out* específico de endoglin en linaje mieloide y su caracterización.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



### III. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1 Características de los donantes incluidos en los análisis.

##### 1.1 Características de los pacientes HHT y donantes sanos incluidos en el estudio.

En el grupo de individuos HHT se incluyeron los pacientes con un diagnóstico genético confirmado o en su defecto con un diagnóstico clínico realizado siguiendo los criterios de Curaçao (Shovlin *et al.*, 2000), considerando a un individuo como enfermo si presentaba al menos tres de estos criterios (Tabla 4, Anexo Tabla 1). El grupo de individuos control estaba constituido por donantes voluntarios que no fueran HHT, que no estuvieran bajo tratamiento con fármacos, que no hubiesen sido intervenidos recientemente quirúrgicamente y que no fueran mujeres embarazadas. En ambos grupos se descartaron los individuos fumadores. Las muestras de sangre fueron recogidas, en su mayor parte, en el Hospital de Sierrallana (Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL), Torrelavega, Santander) o bien en los hospitales comarcales asignados a los pacientes, tras acudir a consulta para solicitar un diagnóstico genético. El Hospital de Sierrallana constituye la Unidad de HHT referencia en España, reconocida como centro de excelencia para el manejo de pacientes HHT por la *HHT Foundation International, Inc.* Las muestras de pacientes HHT están identificadas mediante un código de tres partes: el número de familia, número de paciente dentro de la familia y primer año de atención a consulta (Hospital de Sierrallana) o recepción de la muestra. En los 3 grupos hay donantes de diferentes rangos de edades: los donantes sanos estaban representados por individuos de 24 a 79 años y los donantes HHT por individuos de 20 a 65 años.

##### 1.2 Análisis de la incidencia de procesos infecciosos.

Las historias clínicas de un total de 185 pacientes HHT que pasaron por la Unidad HHT España (Hospital de Sierrallana) durante el periodo 2005-2010 se analizaron retrospectivamente. Se recopilaron los datos relativos a procesos infecciosos de menor o mayor gravedad tales como Ulcus por *Helicobacter pylori*, abscesos cutáneos, abscesos cerebrales, osteomielitis y septicemias.

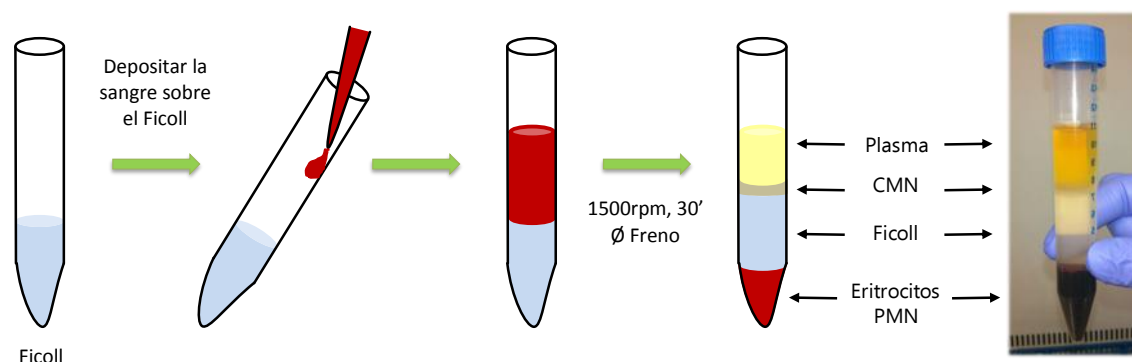
##### 1.3 Evaluación de los valores analíticos en la población HHT.

Los valores de los hemogramas reflejados en las historias clínicas también fueron analizados y evaluados los niveles de leucocitos en sangre periférica y los valores de IgA, IgG e IgM. Estos valores se compararon con los niveles considerados como rango de referencia en los análisis bioquímicos de los pacientes.

## 2 Aislamiento de células y cultivos celulares.

### 2.1 Obtención de plasma y fracción de células mononucleares de sangre periférica.

La obtención de plasma así como de células mononucleares de sangre periférica (MNCs; *Mononuclear Cells*) de donantes sanos y HHT se realiza a partir de muestras de sangre venosa extraída en tubos para hematología de plástico con EDTA como anticoagulante (Vacutainer™ BD Diagnostic Systems). Se requiere un volumen mínimo de 10 ml de sangre por donante. Tras la extracción de las muestras en los centros de recepción (principalmente Hospital de Sierrallana), dichas muestras se procesaron en menos de 24h en nuestro laboratorio en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid). Las muestras de sangre se sometieron a un gradiente de densidad en medio Ficoll (*Lymphocyte Separation Medium*, BioWhittaker®, LONZA). El gradiente se realizó en tubos cónicos de polipropileno de 15 ml. En primer lugar se dispensaron 5 ml de medio Ficoll, y sobre el mismo se depositaron 5 ml de sangre (v/v 1:1) de forma continua pero suave, sobre la pared del tubo que se sostiene en orientación oblicua, con el objetivo que la sangre se deposite sobre el Ficoll sin llegar a mezclarse (Figura 24). A continuación los tubos se centrifugaron a 1.500rpm sin freno ni aceleración, durante 30 minutos a 22°C. Una vez finalizada la centrifugación se observa la formación de 3 fases: la superior amarillenta se corresponde con el plasma sanguíneo; la fase intermedia y transparente corresponde al medio Ficoll y; la fase inferior y roja está compuesta por restos celulares, eritrocitos y células polimorfonucleares (PMN). Entre el plasma y el Ficoll se observa un anillo turbio y blanquecino donde se encuentran las MNCs. El plasma se alicuotó en tubos de 1,5 ml y se conservó a -80°C hasta su posterior análisis. El halo de MNCs se recogió en 10 ml de PBS a temperatura ambiente y se transfirió a un nuevo tubo cónico de 15ml para su posterior concentración de células por centrifugación y cultivo.



**Figura 23. Esquema de la obtención de plasma y la fracción de MNCs mediante la técnica de centrifugación en gradiente de densidad.** La muestra de sangre venosa extraída con EDTA (anticoagulante) se deposita sobre el medio Ficoll (1:1 v/v). La adición de la sangre se deposita de forma oblicua y suave sobre la pared del tubo. La separación de las fases según su gradiente de densidad se obtiene tras centrifugación (1.500rpm, 30 minutos sin freno ni aceleración, 22°C), finalizada la misma se

observa la formación de 3 fases: la superior constituida por el plasma sanguíneo, la intermedia que corresponde al medio Ficoll y la inferior donde se encuentran principalmente eritrocitos, células polimorfonucleares (PMNs) y restos celulares. Entre el plasma y el medio Ficoll se localiza un halo blanquecino constituido en su mayoría por células mononucleares de sangre periférica (MNCs).

## 2.2 Cultivo de MNCs humanas.

La suspensión MNCs aislada de sangre venosa de donantes fue sometida a dos lavados en medio PBS atemperado (1.200 rpm, 5 min). El sobrenadante fue eliminado y las células se resuspendieron en 3 ml de medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, GIBCO®), complementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO®), 100 unidades/ml de una mezcla de estreptomicina/penicilina y 2mM de L-Glutamina (GIBCO®), lo que constituye el medio DMEM completo. La suspensión celular se transfirió a pocillos de placas de cultivo celular de 3cm<sup>2</sup> (60 x 15mm, BD Falcon) pretratadas con suero AB humano inactivado por temperatura. Tras 2 horas de incubación de la suspensión de MNCs a 37°C y 5,0% CO<sub>2</sub>, los linfocitos (células no adherentes) se eliminan mediante lavados con la solución HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*, GIBCO®) atemperada, enriqueciendo de este modo el cultivo en monocitos (selección por adherencia). Se obtuvieron monocitos parcialmente diferenciados a macrófagos tras mantenerlos en cultivo durante 48 horas a 37°C y un 5,0% CO<sub>2</sub> para su posterior aislamiento de ARN.

### 2.2.1 Tratamiento con el agente inflamatorio LPS.

Para los estudios de producción de citoquinas/quimioquinas, se dispensaron un total de 500.000 MNCs en pocillos de placas de cultivo celular BD Falcon (60 x 15mm), por duplicado (condición control y experimental). Las células se cultivaron en medio DMEM completo como se ha descrito en el apartado anterior, a excepción de la condición experimental en la que además se añadieron 100 ng/ml del agente inflamatorio LPS (*E. coli* O111:B:4, Sigma-Aldrich). Las células se cultivaron durante 48h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de cultivo, el sobrenadante celular se recogió y se transfirió a un tubo *Eppendorf* de 1,5 ml. Las muestras se centrifugaron a 4.000 rpm durante 5 minutos en una microcentrifuga (*Eppendorf Mini Spin Plus*) para eliminar los restos celulares. El sobrenadante resultante se recogió y transfirió a un nuevo tubo *Eppendorf* que se conservó a -20°C hasta su posterior análisis.

## 2.3 Obtención de células de origen murino.

Se seleccionaron ratones machos libres de patógenos de la cepa C57Bl/6J o bien machos transgénicos en el mismo fondo genético (C57Bl/6J), con una edad comprendida entre 10 - 12 semanas. Para el aislamiento de órganos y fluidos corporales, todos los animales se



sometieron a una anestesia profunda con isoflurano y tras la obtención de las muestras se sacrificaron por dislocación cervical.

### **2.3.1 Obtención de leucocitos de sangre periférica.**

Los leucocitos de sangre periférica se obtuvieron mediante extracción de sangre heparinizada de la vena cava. El acceso a la vena cava se realizó a través de la cavidad peritoneal. La mayor parte de eritrocitos se eliminaron mediante tratamiento con tampón de lisis de eritrocitos RBC (*Red Blood Cell lysis buffer*) compuesto por: 1g/l  $\text{KHCO}_3$ , 8,3g/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,019% EDTA. Las muestras de sangre se trataron 2 veces consecutivas con el tampón RBC durante 2 minutos a temperatura ambiente, tiempo tras el cual se les añadió PBS y se centrifugaron 5 min a 1.200 rpm. Tras eliminar la mayor parte de eritrocitos, las muestras procedentes de un mínimo de 10 ratones se unificaron. Los monocitos de sangre periférica se aislaron incubando la fracción total de leucocitos de sangre periférica en medio DMEM completo durante 3 horas a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  en placas pre-incubadas con suero de ratón inactivado por temperatura. El cultivo se enriquece en monocitos-macrófagos eliminando las células no adherentes realizando lavados con la solución HBSS atemperada. Las células adherentes se levantaron a los tiempos de interés con una solución de tripsina-EDTA (0,05% y 0,02%, respectivamente) y mediante raspado suave con el émbolo de una jeringa estéril de 1 ml.

### **2.3.2 Aislamiento de células de la cavidad peritoneal.**

Para la recolección de las células presentes de la cavidad peritoneal, se realizó un pequeño corte en la piel del abdomen con el fin de visualizar el peritoneo. A continuación se inyectaron 10 ml de PBS estéril con una jeringa acoplada a una aguja de 25-G siguiendo la orientación de la línea media presente en el peritoneo. Acto seguido se realizó un masaje en el abdomen de aproximadamente 1 minuto para asegurar que las células adheridas a la pared peritoneal y a otros órganos se liberaban y pasaban a la suspensión de lavado (PBS). Finalmente, el líquido inyectado en la cavidad peritoneal se recuperó aspirando lentamente el fluido con una jeringa de 10 ml incorporada a una aguja de 23G. Se recuperaron entre 8,5 – 9,5 ml de líquido del lavado por individuo, que se transfirieron a un tubo cónico de polipropileno de 15 ml. La suspensión celular se centrifugó a 250g durante 6 minutos. Tras la centrifugación, el sobrenadante se conservó a -20°C para posteriores análisis y las células se resuspendieron en 1 ml de medio DMEM completo para su cultivo. Las muestras contaminadas de sangre fueron descartadas.

### 2.3.2.1 Obtención de células de la cavidad peritoneal tras peritonitis mediada por Zymosan.

Ratones de 10 semanas de edad fueron inyectados i.p. con 1 mg de Zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae* (Z4250; Sigma-Aldrich) en 500  $\mu$ l de PBS estéril. La inyección de Zymosan induce una peritonitis experimental conocida como el modelo ZIP (*Zymosan Induced Peritonitis*). La obtención de las células de la cavidad peritoneal se realizó como se ha descrito en el apartado anterior. Para el análisis *in vivo* de la inducción de la expresión de endoglina en la superficie de macrófagos peritoneales, las muestras se recogieron a las 12h, 24h, 36h, 48h, 3, 7, y 14 días tras la inyección de Zymosan y se procesaron para su posterior análisis por citometría de flujo. Las muestras de animales no estimulados fueron utilizadas como el tiempo 0.

Para otros experimentos, los animales fueron de igual forma inyectados con Zymosan A i.p. (1 mg Zymosan/500  $\mu$ l PBS). Transcurridas 24 horas, los exudados de la cavidad peritoneal fueron recuperados bien para evaluar el reclutamiento de leucocitos de sangre periférica a la cavidad peritoneal tras ZIP; bien para aislar los macrófagos mediante la técnica de selección por adherencia en cultivo y analizar los niveles de expresión de ARNm.

### 2.3.3 Aislamiento de células de Kupffer.

El hígado se aisló de la cavidad peritoneal y se lavó en el tampón KRB (*Krebs-Ringer Buffer*; KRB-100; Zen-Bio Inc., NC, USA). La obtención de una suspensión celular a partir del tejido de hígado de ratón se realizó siguiendo las instrucciones del disociador comercial de tejidos *Gentle MACS Dissociator* (#130-095-937; Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Para la obtención de la suspensión celular el tejido fue tratado con colagenasa tipo IV (C5138; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

### 2.3.4 Obtención de macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs).

Los macrófagos derivados de médula ósea o BMDMs (del inglés *Bone Marrow-Derived Macrophages*) se obtuvieron mediante lavado de fémur de ratón con PBS frío. De 5 a 8 x 10<sup>6</sup> células se cultivaron en medio DMEM completo suplementado con 50 $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoetanol, que contenía 25ng/ml del factor estimulador de colonias de macrófagos humanos o M-CSF (del inglés *human macrophage colony-stimulating factor*) o 1.000U/ml el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos murinos o GM-CSF (del inglés *granulocyte macrophages colony-stimulating factor*) (ImmunoTools GmbH), respectivamente durante 7 días para obtener un 95% de BMDM CD11b<sup>+</sup>. Las BMDMs diferenciadas con GM-CSF darán lugar a macrófagos con fenotipo M1 y las células diferenciadas con M-CSF a macrófagos

con fenotipo M2 (Fleetwood *et al.*, 2007; Fleetwood *et al.*, 2009). Las citoquinas se añaden cada dos días. Después de esto, el medio se descarta y se lavan dos veces en una solución salina.

#### 2.4 Cultivo de la línea de linfocitos SR.D10-CD4<sup>-</sup>F1.

La línea SR.D10-CD4<sup>-</sup>F1 es una línea celular CD4<sup>-</sup> mutante clonada a partir de la línea celular CD4<sup>+</sup> TH2 denominada D10.G4.1 (Díez-Orejas *et al.*, 1994). Las células SR.D10-CD4<sup>-</sup>F1 se mantienen en cultivo en medio Click con 10% de SFB, 9% (v/v) β-mercaptoetanol, 5 U/ml IL-2, 10 U/ml de IL-4 y 25 pg/ml de IL-1α.

#### 2.5 Cultivo de macrófagos peritoneales.

El cultivo de macrófagos peritoneales se obtuvo a partir de los lavados de la cavidad peritoneal de ratones C57Bl6/J o bien de ratones transgénicos como se ha descrito anteriormente. El cultivo se realiza a partir de un total de  $1 \times 10^6$  células por pocillo (60 x 15 mm, BD Falcon) en un volumen final de 2,5 ml de medio DMEM completo. Dependiendo del número de réplicas para cada experimento, el lavado peritoneal de entre 2 – 3 individuos se unificó para alcanzar el número necesario de células. Las células se cultivaron durante 2 horas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, el cultivo se enriqueció en macrófagos mediante la selección de las células adherentes: las células no adherentes (principalmente linfocitos B) se eliminaron mediante de 2 – 3 lavados con solución HBSS atemperada. Los macrófagos se mantuvieron en cultivo por el tiempo de interés, cambiándose el medio cada 24 horas.

##### 2.5.1 Tratamiento con TGF-β1: inhibición de la inflamación mediada por LPS.

En otros ensayos, el cultivo de macrófagos peritoneales fue pre-tratado con 10 ng/ml de la citoquina murina recombinante TGF-β1 (Immunostep #MTGFB1-10-CUSTOM) durante 30 minutos antes de añadir 15 ng/ml de LPS (*E. coli* O111:B:4, Sigma-Aldrich). Las células fueron entonces incubadas durante 16 horas a 37°C.

### 3 Análisis de la expresión de ARN.

#### 3.1 Extracción de ARNm de MNCs.

El ARN total se aisló de monocitos parcialmente diferenciados a macrófagos obtenidos del cultivo de MNCs. Las células en suspensión se eliminaron mediante lavados en medio HBSS y el ARN total se aisló de las células adherentes utilizando el kit *AllPrep DNA/RNA Mini Kit* (QIAGEN) siguiendo las instrucciones detalladas en el manual para cultivos de células animales. El proceso de extracción se realizó a temperatura ambiente y a la mayor brevedad posible con

el fin de optimizar la cantidad de ARN extraída de cada muestra. La pureza y cantidad del ARN se determinó mediante electroforesis microfluídica en chip (Experion™ RNA Std Sens Analysis kits, Bio-Rad). El factor RQI (*RNA quality indicator*) facilitado por el software Experion fue el criterio utilizado para elegir las muestras óptimas de ARN con menor degradación. Las muestras con un RQI aceptable (7 – 10) fueron seleccionadas para su posterior obtención de sondas de ADN e hibridación con los chips de ADN. El ARN obtenido se conservó a -80°C hasta su uso para la hibridación con los chips de ADN.

### 3.2 Extracción de ARN y PCR cuantitativa a tiempo real de células de origen murino.

El ARN celular se extrajo de los macrófagos peritoneales en cultivo o bien de los BMDM usando el kit comercial *NucleSpin® RNA II* (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). Un total de 600 ng de ARN total por muestra se sometió a una retro-transcripción en un volumen final de 20µl mediante el kit *First Strand cDNA Synthesis* (Roche, Mannheim, Alemania), usando como cebadores los oligonucleótidos *random primers* proporcionados por el kit. La amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real se realizó a partir de 2µl de cDNA (dilución ½ para los genes de interés; dilución 1/150 para el control endógeno) utilizando *iQ™ SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad). Los análisis se realizaron por triplicado. Los transcritos de los genes seleccionados así como el ARNr *18S* utilizado como control endógeno, se amplificaron utilizando una pareja de cebadores específicos cuya secuencia se detalla en la tabla 3 y que fue diseñada según el programa de predicción de secuencias *Universal Probe Library*. Las muestras se analizaron por triplicado. El análisis de la expresión génica en macrófagos peritoneales de ratones experimentales se normalizó frente a los valores de los ratones control y el experimento se repitió un mínimo de 3 veces. Los resultados de la expresión génica en BMDMs están representados de forma individual.

| Gen          | Secuencia 5' → 3'                                           | Tm |
|--------------|-------------------------------------------------------------|----|
| <i>Eng</i>   | Dir. CGATAGCAGCACTGGATGAC<br>Rev. AGAATGGTGCCTTTGGGTCT      |    |
| <i>Alk1</i>  | Dir. TGACCTCAAGAGTCGCAATG<br>Rev. CTCGGGTGCCATGTATCTTT      |    |
| <i>Pai-1</i> | Dir. GTCTTTCCGACCAAGAGCAG<br>Rev. GACAAAGGCTGTGGAGGAAG      |    |
| <i>Id1</i>   | Dir. GCGAGATCAGTGCCTTGG<br>Rev. CTCCTGAAGGGCTGGAGTC         |    |
| <i>InhbA</i> | Dir. ATCATCACCTTTGCCGAGTC<br>Rev. TCACTGCCTTCCTGGAAAT       |    |
| <i>Nos2</i>  | Dir. TGGCCACCAAGCTGAACT<br>Rev. TTCATGATAACGTTTCTGGCTCT     |    |
| <i>Mmp12</i> | Dir. CCACTTCGCCAAAAGGTTTA<br>Rev. GGGGTAAGCAGGGTCCAT        |    |
| <i>Il-6</i>  | Dir. TGATGGATGCTACCAAAGTGG<br>Rev. TTCATGTAAGTCCAGGTAGCTATG |    |
| <i>18s</i>   | Dir. CTCAACACGGGAAACCTCAC<br>Rev. CGCTCCACCACTAAGAACG       |    |

**Tabla 3. Oligonucleóticos utilizados para la cuantificación por PCR a tiempo real en células de origen murino.** En la tabla se muestran las parejas de oligonucleótidos (cebadores) utilizadas para la amplificación mediante PCR a tiempo real de los genes de interés. El diseño de los cebadores se realizó a través de la plataforma accesible *on-line*: <http://www.roche-applied-science.com>.

#### 4 Estudio de expresión génica diferencial por *microarrays* de ADN.

El análisis de la expresión génica se realizó en MNCs de pacientes HHT, y se comparó con la expresión génica de muestras de donantes sanos. Se seleccionaron un total de 3 individuos sanos y 6 pacientes HHT cuyas mutaciones están descritas en la tabla 4.

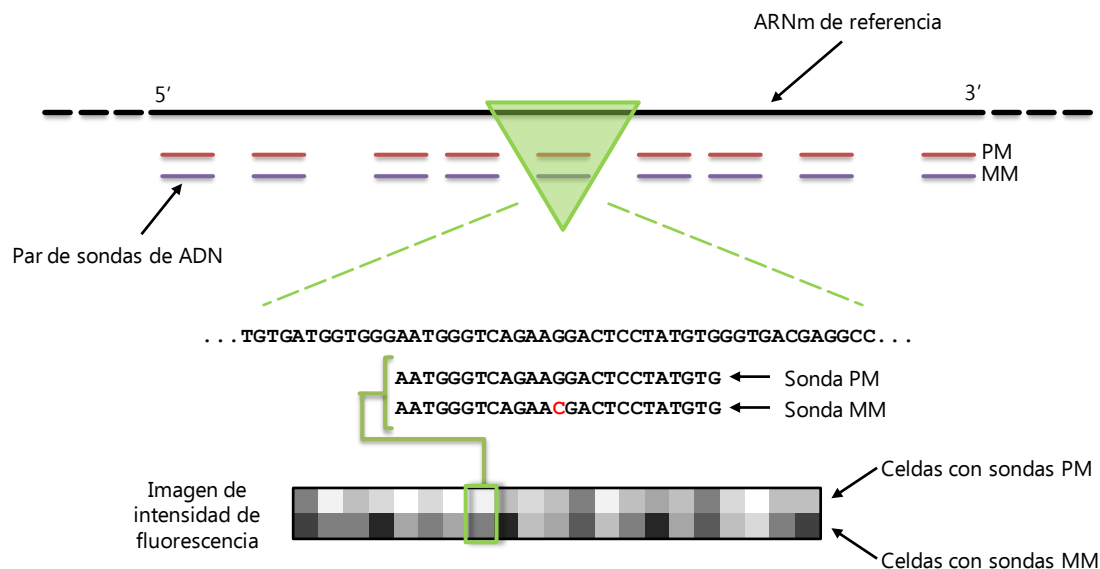
| Código   | Gen  | Exon    | Mutación    | Tipo de mutación        | Cambio secuencia proteína | Referencia            |
|----------|------|---------|-------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 89.01.07 | ENG  | Exón 5  | c.659 T>A   | Cambio AA               | p.I220N                   | Gedge, 2007           |
| 45.02.06 | ENG  | Exon 10 | c.1414 C>T  | Sin sentido             | p.Q472X                   | Nueva                 |
| 45.12.07 | ENG  | Exon 10 | c.1414 C>T  | Sin sentido             | p.Q472X                   | Nueva                 |
| 77.01.06 | ALK1 | Exon 10 | c.1436 G>A  | Cambio AA               | p.R479X                   | Bayrak-Toydemir, 2006 |
| 77.06.08 | ALK1 | Exon 10 | c.1436G>A   | Cambio AA               | p.479X                    | Bayrak-Toydemir, 2006 |
| 87.01.07 | ALK1 | Int 4   | c.525+1 G>A | Defecto <i>splicing</i> | Degradación               | Fontalba, 2008        |

**Tabla 4. Descripción de las mutaciones presentes en los pacientes HHT incluidos en el análisis de la expresión génica en MNCs.** En la tabla se representan los pacientes con su código de identificación y la descripción de la mutación detectada. Se incluyeron un total de 6 pacientes HHT; 3 pacientes HHT1 y 3 pacientes HHT2.

##### 4.1 Hibridación y detección de la señal.

Las muestras de ARN fueron sometidas a una retrotranscripción para la obtención de las sondas de ADNc. La obtención de las sondas de ADNc de cada una de las muestras, así como su marcaje, hibridación con los *microarrays* de ADN y lectura de la señal se realizó de forma independiente. Los *microarrays* de ADN utilizados son GeneChip® Human Genome U133 plus 2.0 (Affymetrix), para genoma humano completo. GeneChip® es una marca registrada por Affymetrix que hace referencia a la elevada densidad de oligonucleótidos en el ADN *microarray*. Este chip de ADN contiene más de 54.000 sondas diferentes que se corresponden con secuencias génicas. Ofrecen información del genoma humano completo, más concretamente son 38.500 genes y 47.400 transcritos. La tecnología Affymetrix se basa en los *microarrays* de ADN de un color, donde la intensidad de la señal será proporcional al número de copias de ARNm presentes en la muestra. Para corregir el error derivado de la hibridación a las sondas de secuencias parecidas pero no complementarias, Affymetrix utiliza sondas denominadas *mismatch probes* (MM). Las sondas MM son idénticas a las sondas *perfect match* (PM), a excepción del nucleótido central, de modo que aplicando un algoritmo, el software de Affymetrix corrige el valor de la intensidad obtenido para cada sonda eliminando el ruido de fondo provocado por posibles hibridaciones no exactas (Figura 24). Cada gen está

representado por un grupo de entre 16 – 20 pares de sondas, entendiéndose como par de sonda el par constituido por una sonda PM y su correspondiente sonda MM. Cada sonda consta de 25 nucleótidos.



**Figura 24. Esquema de las sondas MM y PM utilizadas por Affymetrix.** Cada secuencia génica presente en el chip de ADN puede contener entre 16 y 20 pares de sondas. Un par de sondas está constituido por la combinación de una sonda PM (*perfect match*) complementaria a la secuencia de ADN, y la sonda MM (*mismatch*) que difiere de su correspondiente sonda PM en el nucleótido central.

El procesamiento de las muestras de ARN, su hibridación en los microarrays, así como la lectura de las señales de hibridación y su posterior extracción y normalización de los datos se realizó en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid, equipada con la plataforma *GeneChip* (Affymetrix) para hibridación, tinción y escaneado de microarrays de ADN. La señal se obtuvo empleando el software *GCOS* de Affymetrix integrado en el sistema. Con el fin de poder comparar los valores de señal obtenidos para cada uno de los *microarrays* o chips de ADN, los valores de intensidad absoluta se normalizaron mediante el método RMA (*Robust Multi-array Average*) implementado en la herramienta *Affymetrix Expression Console*.

#### 4.2 Análisis estadístico de los datos: selección de genes diferencialmente expresados.

Para seleccionar los genes comunes afectados en HHT, independientemente de la mutación, y para reducir el ruido derivado de la variabilidad de expresión génica interindividual, sólo los genes expresados diferencialmente en la totalidad de las muestras HHT (HHT1+HHT2) se consideraron para su anotación en la tabla. Los valores de señal para cada sonda se representan en escala logarítmica en base 2 (Log2). Se realizó la comparativa entre los dos grupos de estudio: población control (constituida por 3 chips de ADN) frente a la población HHT (constituida por 5 chips de ADN). La ratio de expresión resultante para cada

sonda se corresponde a la media del valor obtenido para el grupo HHT frente a la media obtenida para el grupo control. La lista preliminar que contenía todas las sondas identificadas en el análisis se analizó de forma manual en los archivos Excel resultantes. Se excluyeron las sondas cuya ratio respecto al control estuvieran entre -1,5 y 1,5. Se aplicó un test estadístico *t* de Student para la obtención de un *p*-valor asociado al cambio de expresión. La selección final de genes diferencialmente expresados en MNCs de pacientes HHT frente a las de donantes sanos se realizó teniendo en cuenta un *p*-valor<0,01.

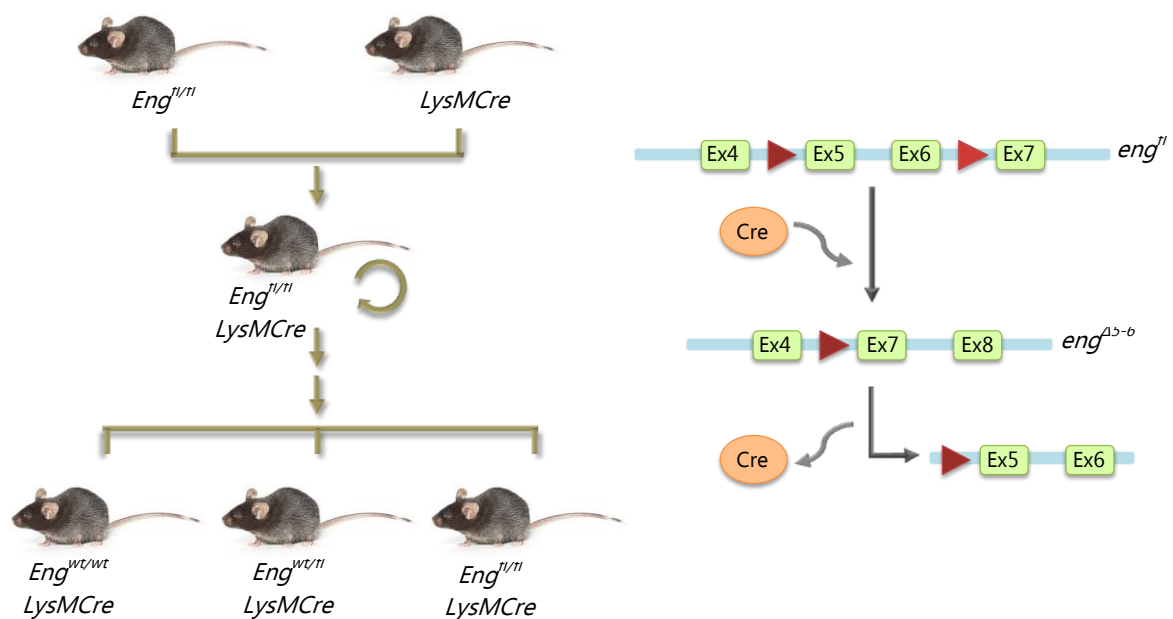
### 4.3 Análisis funcional.

Los genes diferencialmente expresados en MNCs de pacientes HHT, tanto inducidos como reprimidos, se sometieron a un análisis de enriquecimiento funcional utilizando el programa FatiGO accesible de forma gratuita *on-line* en la plataforma [www.babelomics.org](http://www.babelomics.org). FatiGO es una herramienta de análisis de datos dirigida por la base de datos Gene Ontology (Al-Shahrour *et al.*, 2004), desarrollada en el Centro de Investigaciones Príncipe Felipe (Valencia). Las ontologías proporcionan una descripción estructurada de las informaciones biológicas que es extremadamente útil para el manejo de datos obtenidos en *microarrays* de ADN. Una de las ontologías más aceptadas es el Gene Ontology (GO; Ashburner *et al.*, 2000) donde la información está organizada para funciones moleculares, procesos biológicos y componentes celulares para diferentes organismos. FatiGO localiza diferencias significativas en la distribución de términos biológicos entre 2 grupos de genes diferencialmente expresados. En nuestro caso se sometió la lista de genes inducidos y reprimidos al análisis funcional comparando ambas listas con el genoma humano completo. De este modo, el programa muestra qué grupos funcionales del Gene Ontology están más representados en nuestro listado de genes inducidos o reprimidos. El programa también puede ser utilizado para obtener las proporciones de términos GO en un listado de genes. La herramienta *DAG viewer* se utilizó para visualizar los resultados de FatiGO (también accesible en la plataforma de Babelomics). El gráfico aparece coloreado de acuerdo al número de anotaciones que aparecen en cada uno de los grupos del GO que se representan. FatiGO utiliza el procedimiento FDR (*False Discovery Rate*) de Benjamini y colaboradores (2001), como ajuste del valor *p* resultante de un *t* test de Fisher. Se consideraron grupos funcionales estadísticamente significativos aquellos con un valor FDR<0,01.

## 5 Generación y caracterización de un modelo murino con ausencia de expresión de endoglina en macrófagos.

### 5.1 Líneas utilizadas y cruces establecidos.

Para generar el ratón homocigoto y heterocigoto deficiente en endoglina, en linaje mieloide, se cruzaron dos líneas transgénicas diferentes generadas en la cepa C57Bl/6:  $Eng^{fl/fl}$  y la línea  $LysMCre$ . La línea  $Eng^{fl/fl}$  fue generada y cedida por el laboratorio de la Dra. Helen M Arthur (*University of Newcastle*, Reino Unido) que presenta los exones 5 y 6 de endoglina flanqueados por secuencias loxP (dianas de la recombinasa Cre). Los ratones homocigotos para el alelo de endoglina floxeado ( $Eng^{fl/fl}$ ) tienen una esperanza de vida, fertilidad y apariencia normal (Allinson *et al.*, 2007). La línea  $LysMCre$  es de origen comercial (B6.129P2- $Lyz^{tm1(cre)lfo}/J$ , Jackson Laboratory) y fue cedida por la Dra. Mercedes Ricote (Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid). Los ratones  $LysMCre$  expresan el gen de la recombinasa Cre bajo control del promotor de Lisozima 2 ( $Lyz2$ ) específico del linaje mieloide y que se expresa en monocitos, macrófagos y neutrófilos. Los ratones  $Eng^{fl/fl}$  se cruzaron con la cepa  $LysMCre$  para generar un ratón deficiente en endoglina en el linaje mieloide. Los individuos heterocigotos de la primera camada (F1) que contenían el gen de endoglina con las secuencias loxP ( $eng^{wt/fl}$ ) y el transgen Cre ( $LysMCre^+$ ) fueron identificados mediante PCR y cruzados entre ellos durante 10 generaciones seleccionando los individuos  $eng^{wt/fl}LysMCre$  para mantener los cruces. En la F10 se separaron las tres líneas experimentales: los individuos homocigotos experimentales ( $eng^{fl/fl}LysMCre$ ), los heterocigotos experimentales ( $eng^{wt/fl}LysMCre$ ) y los ratones control ( $eng^{wt/wt}LysMCre$ ) (Figura 25).



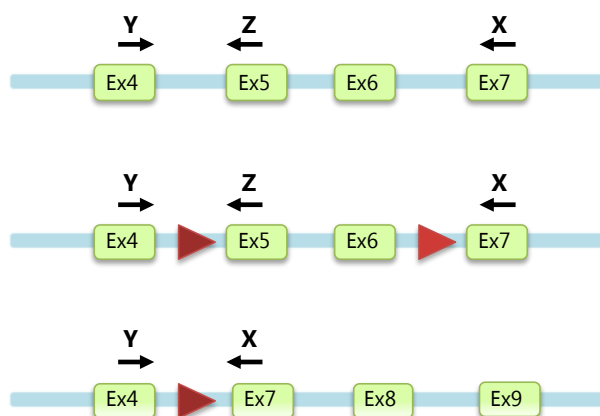


**Figura 25. Representación esquemática de las cepas utilizadas para generar un ratón endoglina deficiente específico de linaje mieloide. A)** La cepa que expresa la recombinasa Cre bajo control del promotor endógeno del locus *Lyz2* se conoce como B6.129P2-*Lyz<sup>tm1(cre)lfo</sup>/J* (Jackson Laboratory). Esta cepa se cruzó con una cepa C57Bl6 que presentaba el gen *eng* con las dianas loxP flanqueando los exones 5-6. Los ratones heterocigotos para el alelo de *eng* floxeado (*eng<sup>fl</sup>*) y portadores de la recombinasa Cre de las primeras camadas, fueron identificados mediante PCR y cruzados entre ellos hasta obtener los tres genotipos utilizados en los ensayos. **B)** Representación esquemática de la acción de la recombinasa Cre sobre el alelo de *eng<sup>fl</sup>*. La recombinación mediada por Cre da lugar a una escisión de los exones 5 – 6 de endoglina. El alelo resultante recibe el nombre de *eng<sup>Δ5-6</sup>* y aparecerá en aquellos tipos celulares donde se expresa el gen *Lyz2* como monocitos, macrófagos maduros y granulocitos. El triángulo rojo representa las secuencias loxP.

## 5.2 Genotipado por PCR.

El genotipado se realiza en ratones de 21 días de edad, coincidiendo con el momento del destete (separación de la madre). Este momento se aprovecha para obtener una muestra de tejido de la porción final de la cola de entre 1 y 2 mm. El genotipo de los ratones se determinó mediante PCR a partir del ADN aislado del tejido de la cola. Tanto para la extracción de ADN del tejido de cola así como la amplificación de los fragmentos de ADN mediante PCR, se utilizó el kit comercial *REExtract-N-Amp<sup>TM</sup> Tissue PCR Kit (#XNAT, Sigma-Aldrich)*. El diseño de la PCR se desarrolló en base a las instrucciones del fabricante y a las propiedades de los cebadores.

Una PCR múltiple diseñada con 2 cebadores denominados Y y Z nos permite distinguir entre tres genotipos constituidos por dos alelos *eng* diferentes: *eng<sup>wt</sup>* con un tamaño de 411 pb y *eng<sup>fl</sup>* con un tamaño de 566 pb. Con la combinación de cebadores X e Y podemos detectar la presencia del alelo que presenta la escisión de los exones 5 – 6 de *eng*. Este alelo es denominado *eng<sup>Δ5-6</sup>* y su producto de amplificación con los cebadores XY posee un tamaño de 602 pb (Figura 26). Los cebadores Y, Z y X están descritos en Allinson y colaboradores (2007), y representados en la tabla 5. Finalmente, comprobamos la presencia del gen de la recombinasa Cre bajo control del promotor de *Lyz2* con dos cebadores específicos (Cre Fw y Cre R) que dan lugar a un producto de amplificación por PCR de 420 pb.



**Figura 26. Representación esquemática del lugar de hibridación de los cebadores Z, Y y X sobre *eng*.** En la figura están representados los lugares de hibridación de los cebadores Z, Y y X sobre la secuencia de *eng* mediante una flecha que indica la orientación 5' – 3' de los mismos. El producto de PCR resultante de la amplificación con los oligonucleótidos YZ dará lugar a un fragmento de 411 pb en el alelo *eng<sup>wt</sup>* y de 566 pb en el alelo *eng<sup>fl</sup>* (superior en este último debido a la presencia de la diana loxP). El producto de amplificación por PCR con la combinación de oligos YX dará lugar a un fragmento de ADN de 602 pb cuando esté presente el alelo *eng<sup>Δ5-6</sup>*. El triángulo rojo muestra la localización de las secuencias LoxP en los intrones 4 y 6.

Todas las reacciones de PCR se realizan con un paso previo de desnaturalización durante 3 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos con las siguientes características: 95°C por 30 segundos para todas las reacciones; 58°C durante 30 segundos para la combinación de cebadores YZ e XY y 55°C durante 30 segundos para la combinación de oligonucleótidos *Cre Fw* y *Cre R*; y un ciclo de extensión a 72°C durante 40 segundos para la combinación de cebadores YZ e XY y 30 segundos para la combinación de cebadores *Cre*. Para finalizar, todas las PCRs se someten a un ciclo de extensión final a 72°C durante 10 min.

| Nombre cebador | Secuencia 5'→ 3'       | Tm   |
|----------------|------------------------|------|
| Y              | GGTCAGCCAGTCTAGCCAAG   | 63,9 |
| Z              | GTGGTTGCCATTCAAGTGTG   | 64,1 |
| X              | CCACGCCTTTGACCTTGC     | 66,9 |
| <i>Cre Fw</i>  | AGGTGTAGAGAAGGCACTTAGC | 60,5 |
| <i>Cre Rv</i>  | CTAATCGCCATCTTCCAGCAGG | 68,7 |

**Tabla 5. Descripción de cebadores utilizados para el genotipado de los ratones.**

En otros ensayos se analizó la presencia de los diferentes alelos de *eng* y del transgen *Cre* en macrófagos peritoneales y otros tejidos como corazón, bazo, hígado y pulmón. En esta ocasión el ADN se obtuvo usando las columnas QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN #51304). La reacción de PCR se llevó a cabo a una temperatura de anillamiento de 58°C, usando una Taq polimerasa *Hot Master* (Eppendorf, Westbury, NY).

Todos los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en solución TAE durante 40 min a 100 V en una cubeta de electroforesis *RunOne™ Electrophoresis Cell* (Komabiotech, Inc.) La detección de los fragmentos de ADN amplificados por PCR se realizó mediante tinción con el agente intercalante de ADN Sybr® Safe DNA Gel Stain (Ref. S33102, Molecular Probes) a una dilución 5/100.000 en agua destilada durante 20 min a RT. Los productos de amplificación se visualizaron en el sistema de transiluminación *Molecular Imager® GelDoc™* (BioRad, Hercules, CA) y las imágenes se capturan con el software *ImageLab™* (BioRad, Hercules, CA).

### 5.3 Análisis hematológico

Las muestras de sangre periférica fueron obtenidas por punción de la vena cava y recogidas en tubos para hematología con EDTA de 0,5 ml (Ref. 1501126, Monlab S.L.). El recuento leucocitario de sangre periférica se realizó en un contador hematológico Abacus Junior Vet (Diatron®) que utiliza el método Coulter (método de impedancia) para contar células que pasan a través de una pequeña apertura y mide la cantidad de hemoglobina en sangre. El análisis se realiza a partir de 25µl de muestra y el valor de cada parámetro es el resultado del valor medio de 3 mediciones consecutivas. Los valores obtenidos se compararon con el rango de referencia establecido para la especie ratón contenido en la base de datos del software integrado en el sistema.

### 5.4 Análisis microbiológico y necropsia

Los ratones que desarrollaron infecciones espontáneas en diversas zonas de la piel fueron sacrificados. Las heridas se lavaron bajo condiciones estériles con solución PBS. Muestras de la zona de la piel que presentaban las heridas se obtuvieron mediante un corte con tijeras estériles y se transfirieron a un tubo *Eppendorf* y mantenidas a 4°C hasta el envío para su posterior análisis microbiológico. Las muestras fueron analizadas en el departamento de microbiología del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid. El aislamiento de los microorganismos de las heridas se realizó utilizando medios selectivos y la identificación de los microorganismos se determinó mediante el sistema de detección bioquímica API® strips.

La necropsia se realizó a todos los animales que presentaban una infección. Tras la observación de posibles alteraciones, se extrajo el bazo y se midió su longitud. La longitud del bazo fue medida en un total de 22 ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* que desarrollaron una infección espontánea en la piel y en 10 ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* que presentaban un buen estado y sin presencia de heridas.

## 5.5 Análisis de fagocitosis.

### 5.5.1 Fagocitosis *in vitro*.

Partículas de Zymosan a una concentración final de 1 mg/ml en PBS se marcaron con la sonda fluorescente de éster succinimidil diacetato de carboxifluoresceína (CFSE, Ref. C34554, Molecular Probes®) a una concentración final de 45 µM durante 15 minutos a temperatura ambiente, lavadas 3 veces con PBS y sonicadas en medio DMEM durante 15 minutos previo al ensayo. La comprobación del marcaje de las partículas de zymosan con la sonda CFSE se realizó mediante su visualización en un microscopio *Axio Vert.A1* (Zeiss) con luz transmitida y de fluorescencia LED. Para los ensayos de fagocitosis *in vitro*, un total de 200.000 células de la cavidad peritoneal se depositaron en pocillos de placas p24 (BD, Falcon). Las células se mantuvieron en cultivo durante 1 hora a 37°C para permitir su adherencia a la placa, periodo tras el que se procedió a realizar 2 lavados con PBS atemperado para eliminar las células no adherentes. Las células se mantuvieron a 4°C durante 5 min y se añadió la suspensión de partículas de Zymosan marcadas con CFSE a una concentración final de 100 µg/ml en medio DMEM completo. El proceso de fagocitosis se dejó actuar durante 2 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El proceso de fagocitosis se detuvo mediante la fijación de las células con *p*-formaldehído al 2% en PBS. A continuación las células se incubaron con un anticuerpo anti-F4/80 de ratón marcado con PE (Tabla 7) durante 20 min a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PBS, las preparaciones se montaron en medio Prolong® Gold Antifade Reagent with Dapi (Molecular Probes®, Ref. P36931). Las muestras se analizaron un microscopio *Axio Vert.A1* (Zeiss) y las imágenes fueron capturadas con una cámara SLR R-330 Olympus®. Se seleccionaron 10 campos al azar y se analizaron un mínimo de 150 células por condición. Para el cálculo de la actividad y eficiencia fagocítica se aplicaron las siguientes fórmulas:

$$\text{Actividad fagocítica} = \frac{\text{nº macrófagos que contienen partículas}}{\text{nº total de macrófagos contabilizados}} \times 100$$

$$\text{Eficiencia de fagocitosis} = \frac{\text{promedio de partículas incorporadas}}{\text{macrófago con actividad fagocítica}}$$

En otros ensayos un total de 50.000 células de la cavidad peritoneal de ratones *Eng<sup>wt/wt</sup>LysMCre* y *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* se depositaron en placas pre-tratadas con fibronectina para microscopia de fluorescencia (iBidi µ-Slide VI<sup>0.4</sup>, Ref.80603) y se mantuvieron en cultivo durante 1 hora para permitir la selección por adherencia de los macrófagos de la cavidad peritoneal. A continuación se realizaron dos lavados consecutivos con PBS atemperado para eliminar las células no adheridas. Las cámaras de las placas se rellenaron con medio DMEM

completo. Las células se mantuvieron a 4°C durante 5 min y se añadió la suspensión de partículas de Zymosan marcadas con CFSE a una concentración final de 5µg/ml en medio DMEM completo. El proceso de fagocitosis de las partículas se dejó actuar durante 2 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la tinción de actina se realizó con Faloidina acoplada al fluorocromo Alexa 568 (Molecular Probes, Ref. A-12380) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras tres lavados con PBS, los canales del portaobjetos se rellenaron con el medio de montaje Prolong® Gold Antifade Reagent with Dapi (Molecular Probes®, Ref. P36931). Las muestras fueron analizadas por microscopia confocal.

### 5.5.2 Fagocitosis *in vivo*.

Para los ensayos de fagocitosis *in vivo*, los ratones se inyectaron i.p. con 50 µg de partículas Zymosan marcadas con CFSE en 500 µl de PBS estéril. La inyección se realizó con una jeringa de 1ml acoplada a una aguja de 25G. Para evitar la punción de intestinos, la aguja se insertó en el cuadrante inferior derecho o izquierdo del abdomen, evitando la línea media. Transcurridos 90 minutos de la inyección de las partículas de Zymosan, los ratones fueron anestesiados con isoflurano para obtener los exudados de la cavidad peritoneal. Se realizó una incisión a lo largo de la línea media y se retiró la piel del abdomen manualmente para dejar expuesta la pared peritoneal. El lavado peritoneal se realizó siguiendo las instrucciones descritas en el apartado anteriormente. El fluido peritoneal obtenido se transfirió a tubos cónicos de propileno para centrifuga (15 ml) tras eliminar la aguja de la jeringa. Los tubos se mantuvieron a 4°C y la suspensión celular fue procesada para detectar la tinción por citometría de flujo del marcador de macrófagos F4/80. La evaluación de la actividad fagocítica se calculó siguiendo las siguientes fórmulas:

$$\text{Actividad fagocítica} = \frac{\text{nº células F4/80}^+ \text{CFSE}^+}{\text{nº total de células F4/80}^+(\text{CFSE}^+ + \text{CFSE}^-)} \times 100$$

$$\text{Eficiencia de fagocitosis} = \frac{\text{Intensidad de fluorescencia media (IFM) CFSE}}{\text{(en células F4/80}^+\text{CFSE}^+)}$$

La actividad fagocítica representa por tanto el porcentaje de macrófagos que han incorporado partículas de Zymosan (F4/80<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup>), y la eficiencia de fagocitosis es equivalente al número de partículas incorporadas por cada célula, por lo que se representa por el valor de Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) de CFSE en la población de macrófagos (F4/80<sup>+</sup>).

## 5.6 Inducción de shock séptico.

Machos de 12 semanas de edad fueron inyectados i.p. con 40 mg/kg de LPS (*E. coli* 0111;B4; Sigma-Aldrich). La ratio de supervivencia a la inducción del shock séptico fue seguida durante 5 días en ratones  $Eng^{wt/wt}LysMCre$  (n=33),  $Eng^{wt/fj}LysMCre$  (n=24) y  $Eng^{fj/fj}LysMCre$  (n=34).

## 5.7 Ensayo de migración celular.

Alrededor de  $1,5 \times 10^5$  células de la línea de linfocitos SR.D10-CD4<sup>+</sup> en un volumen final de 100µl de medio DMEM sin suero, fueron depositados en el compartimento superior de las cámaras *Transwell* (Corning, Ref. 3421) que contienen membranas con poros de 5 µm de diámetro, en las que las células migran al compartimento inferior en respuesta a un gradiente de citoquinas/quimioquinas. Las células se mantuvieron en las cámaras de cultivo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 3 horas para permitir la migración de los linfocitos hacia los exudados de la cavidad peritoneal extraídos de ratones  $Eng^{wt/wt}LysMCre$ ,  $Eng^{wt/fj}LysMCre$  y  $Eng^{fj/fj}LysMCre$ . Las células que migraron al compartimento inferior fueron contadas por citometría de flujo. El porcentaje de migración se calculó refiriendo el total de células migradas al número de células migradas hacia los exudados peritoneales de los ratones  $Eng^{wt/wt}LysMCre$ .

## 5.8 Transmigración *in vivo*.

La valoración del reclutamiento de leucocitos a un *focus* inflamatorio se evaluó tras la inducción de una peritonitis mediada por Zymosan o ZIP descrita en apartados anteriores. Los exudados de la cavidad peritoneal se recuperaron mediante lavados con PBS tras 24 horas de la inducción de ZIP. Ratones inyectados con 500µl de PBS estéril fueron utilizados como condición control. El número total de leucocitos en la cavidad peritoneal fue evaluado en el contador de células CASY® Cell Counter. Los eventos registrados fueron considerados células cuando presentaban un diámetro mínimo de 5,7 micras. El porcentaje de células mieloides CD11b<sup>+</sup>, granulocitos Ly6G<sup>+</sup>, macrófagos F4/80<sup>+</sup>, células B CD19<sup>+</sup> y linfocitos T CD3<sup>+</sup> fue evaluado por citometría de flujo.

# 6 Análisis de la expresión de proteínas.

## 6.1 ELISA

La detección de proteínas en solución (plasma, suero o fluidos corporales) se realizó mediante la técnica cuantitativa ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Para ello se utilizaron *kits* comerciales *Quantikine® Colorimetric Sandwich ELISA* de la casa comercial R&D Systems (Minneapolis, MN 55413, USA), cuya referencia está indicada en la Tabla 6. El sistema

está basado en una fase sólida donde un anticuerpo monoclonal que reacciona frente al antígeno de interés está inmovilizado en la superficie de los pocillos de una placa p96. El antígeno unido será reconocido por otro anticuerpo monoclonal, en esta ocasión unido a la enzima peroxidasa de rábano o HRP (del inglés *Horseradish peroxidase*). Todos los análisis y calibraciones se realizaron en duplicado. La densidad óptica se determinó mediante un lector de microplacas *GloMax® Multi Detection System* (Promega) con un filtro de 450 nm. La longitud de onda de corrección de fondo se estableció en 540 nm, siguiendo las instrucciones del fabricante.

| Proteína reconocida  | Especie           | Referencia |
|----------------------|-------------------|------------|
| Activina A           | Humano/Ratón/Rata | DAC00B     |
| Ang-2                | Humano            | DANG20     |
| CCL20/MIP-3 $\alpha$ | Humano            | DM3A00     |
| IL-1 $\beta$         | Humano            | DLB50      |
| IL-1 $\beta$         | Ratón             | MLB00C     |
| IL-6                 | Humano            | D6050      |
| IL-6                 | Ratón             | M6000B     |
| IL-12p40             | Humano            | DP400      |
| Endoglina/CD105      | Humano            | DNDG00     |
| Endoglina/CD105      | Ratón             | MNDG00     |
| TNF- $\alpha$        | Ratón             | MTA00      |
| TSP-1                | Humano            | DTSP10     |

**Tabla 6. Kits de ELISA utilizados en la detección de proteínas solubles.** En la tabla se muestra la proteína de interés, la especie que es reconocida por los anticuerpos monoclonales presentes en el *kit*, y la referencia de la casa comercial R&D Systems.

### 6.1.1 Valores de sEng y Ang-2 en plasma.

Los niveles de Ang-2 y sEng en plasma se determinaron mediante un ensayo ciego, sin el conocimiento del grupo al que el donante pertenece; control (no-HHT), HHT1 o HHT2. Se analizaron un total de 62 pacientes HHT, 32 de ellos fueron diagnosticados genéticamente como HHT1 por presentar una mutación en *ENG*, y los 30 pacientes restantes fueron diagnosticados como HHT2 debido a la presencia de mutaciones en *ACVRL1* (Tabla 1 Anexo). Las concentraciones de sEng se representan en ng/ml y en pg/ml para Ang-2.

### 6.1.2 Producción de citoquinas y quimioquinas por MNCs.

La producción de citoquinas y quimioquinas en el sobrenadante de cultivos de MNCs aislados de pacientes HHT y donantes sanos se analizaron en dos condiciones: control (DMEM completo) y experimental (DMEM completo con LPS). Se midieron los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-12p40, IL6, CCL20, TSP-1 y Activina A liberados al sobrenadante tras 48 horas de cultivo,

mediante el uso de kits comerciales de ELISA (Tabla 6). Todos los análisis y calibraciones se realizaron en duplicado. Las concentraciones están representadas en pg/mL.

### 6.1.3 Muestras de origen murino.

La producción de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 mediada por la respuesta a LPS se analizó en ratones tras la inducción de un shock séptico mediado por LPS. Tras anestésiar con isoflurano se obtuvieron muestras de lavado peritoneal y de sangre (sin anticoagulante) tras 1 y 3 horas posteriores a la inyección de LPS. El lavado peritoneal se obtuvo siguiendo las indicaciones descritas previamente y las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción de la vena cava. Las muestras de sangre se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para facilitar la coagulación y a continuación se centrifugaron a 2.000xg durante 20 minutos a 4°C para poder aislar el suero de las muestras. Los exudados de la cavidad peritoneal se obtuvieron mediante la inyección i.p. de 10 ml de PBS1x estéril. Se recuperaron entre 8,5 – 9,5 ml del volumen total inyectado. Las muestras de suero y del exudado de la cavidad peritoneal se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis. En otros ensayos las muestras de suero se obtuvieron de ratones de las tres líneas experimentales transgénicas sin tratar para evaluar los niveles basales de sEng en cada una de las líneas transgénicas generadas. En paralelo, también se midieron los niveles de sEng en una población de ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* que había desarrollado una infección espontánea. circulantes en condiciones control. Los niveles de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y sEng se cuantificaron mediante kits de ELISA comerciales (Quantikine® R&D Systems) anotados en la Tabla 6.

## 6.2 Citometría de flujo

Los análisis mediante citometría de flujo se realizaron en un citómetro Beckman Coulter FC500 equipados con un láser de argón sintonizado a 488nm capaz de procesar seis señales simultáneas: dos de dispersión y cuatro de fluorescencia. La señal de fluorescencia específica correspondiente a FITC/Alexa488, PE y APC se recogió con los filtros BP de 525, 575 y 675 respectivamente. Las células fueron seleccionadas según sus propiedades de dispersión de la luz *Forward Scatter* (FS) y *Side Scatter* (SS). En paralelo, las células muertas fueron localizadas por exclusión de Ioduro de Propidio (Sigma #81845) con el fin de delimitar una región con la población de interés; >95% de viabilidad celular. Se analizó un mínimo de 5.000 células por muestra. Para el análisis de las muestras se utilizó el programa CXP (Beckman Coulter).

### 6.2.1 Fenotipado celular con fluorocromos.

La fracción celular obtenida tras el tratamiento de las muestras de sangre con el tampón RBC o bien de los lavados peritoneales, se resuspendió en 100 $\mu$ l de suero de rata en PBS al 5%

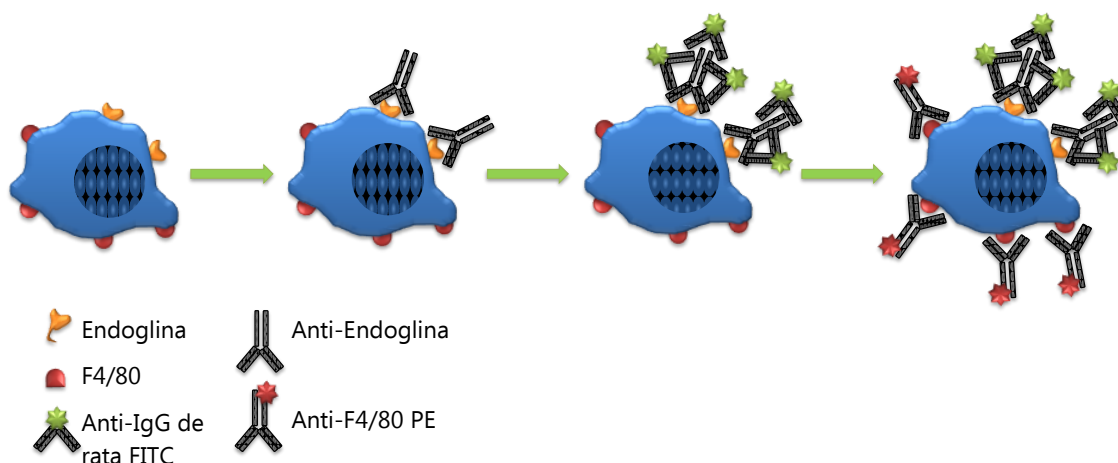


y transferidas a una placa de poliestireno de 96 pocillos con fondo cónico. El bloqueo de las muestras con suero de rata se dejó proceder durante 20 minutos a 4°C. Tras el bloqueo, las células se incubaron con un *cocktail* de anticuerpos monoclonales generados frente diferentes marcadores de leucocitos de ratón: F4/80 (macrófagos), CD11b (línea mieloide), Ly6G (granulocitos), CD3 (linfocitos T) y CD19 (linfocitos B) durante 20 minutos a 4°C. En paralelo, se realizaron las incubaciones con los siguientes isotipos control: PE Rat IgG2b κ, Rat IgG2a APC y Alexa 388 Rat IgG2a κ. Las diluciones de los anticuerpos fueron seleccionadas según las indicaciones del fabricante y las referencias de los mismos están anotadas en la Tabla 7. Los anticuerpos no unidos se eliminaron mediante lavados en PBS-BSA1%. Las muestras se resuspendieron en 300µl de PBS frío para su análisis por citometría de flujo.

En otros experimentos, tras el bloqueo de la suspensión celular con suero de rata al 5% en PBS, la suspensión celular obtenida de la cavidad peritoneal fue incubada con un cocktail de anticuerpos monoclonales compuesto por: anti-F4/80 de ratón, anti-Ly6G de ratón y anti-TLR2 de ratón durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los niveles de TLR2 fueron analizados en la población F4/80<sup>pos</sup>Ly6G<sup>neg</sup>.

### 6.2.2 Expresión de endoglina en leucocitos.

La detección de la expresión de endoglina en la superficie de células procedentes de hígado o la cavidad peritoneal, se realizó mediante una tinción indirecta para detectar endoglina seguida de una tinción directa para detectar marcadores celulares en la superficie de la membrana (Figura 27). Tras el procesado de las muestras, las células se bloquearon en 100µl de suero de conejo al 5% en PBS durante 20 minutos a 4°C. A continuación las muestras se transfirieron a placas de 96 pocillos de poliestireno con fondo cónico adaptables al citómetro. La primera incubación se realizó con un anticuerpo monoclonal anti-endoglina de ratón (clon MJ7), durante 1h a 4°C. Como control negativo se realizó en paralelo una tinción de muestras con un isotipo control de rata en las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces en PBS-BSA al 1% y se incubaron con el fragmento F(ab')<sub>2</sub> de un anticuerpo policlonal de conejo marcado con FITC anti-IgG (H&L) de rata durante 20 min a 4°C. De nuevo las células se lavaron como en el paso previo y en esta ocasión se incubaron con los anticuerpos monoclonales generados frente a diferentes marcadores celulares de ratón: F4/80 (macrófagos) o CD11b (línea mieloide), y Ly6G (granulocitos), durante 20 minutos a 4°C. Como control negativo de la fluorescencia de los anticuerpos monoclonales primarios acoplados a fluorocromo, se utilizaron los siguientes isotipos control: PE Rat IgG2b κ, Rat IgG2a APC, y Alexa 388 Rat IgG2a κ. Los anticuerpos que no se hayan unido se eliminan mediante los lavados en PBS-BSA1%.



**Figura 27. Representación esquemática de la tinción realizada para la detección de endoglina por citometría de flujo en macrófagos de ratón.** La suspensión celular obtenida de la disgregación de tejidos de ratón y de fluidos corporales fue sometida en primer lugar a una tinción indirecta para localizar endoglina con un anticuerpo monoclonal frente a endoglina (clon MJ7/18) seguida por la tinción con un anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de rata marcado con FITC. Tras el marcaje realizado para la detección de endoglina, se prosiguió con la adición de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a diversos tipos de marcadores de leucocitos: en la imagen sólo se ha representado el F4/80 para simplificar la figura. Todas las incubaciones con los anticuerpos se realizaron en presencia de suero de cabra (no representado en el esquema).

Para el análisis de las muestras se utilizó el programa CXP (Beckman Coulter). En primer lugar se delimitaron las ventanas de interés en el *dot-plot* FSLog/SSLog, y los niveles de endoglina se analizaron en la población  $CD11b^{pos} Ly6G^{neg}$  de las células adherentes de los ensayos *in vitro*; y en la población  $F4/80^{pos} Ly6^{neg} CD19^{neg}$  de las suspensiones celulares obtenidas del tejido hepático o la cavidad peritoneal. Los niveles de endoglina están representados por el porcentaje de células positivas y la intensidad de fluorescencia media (IFM). Para los ensayos de peritonitis inducida por Zymosan, un panel dot-plot mostrando el SS vs el marcaje F4/80-PE se usó para distinguir entre las diferentes poblaciones de macrófagos peritoneales.

### 6.3 Microscopía de inmunofluorescencia

#### 6.3.1 Inmunohistofluorescencia

Inmediatamente tras el sacrificio, los animales fueron perfundidos con una solución de *p*-formaldehído (PFA) fresco al 1% en PBS. Hígado, bazo y pulmón fueron extraídos y fijados en PFA al 1% durante 12h a 4°C. Transcurrido este tiempo, los órganos se transfirieron a una solución de sacarosa al 15% en PBS durante 12 horas, seguida de una solución de sacarosa al 30% en la cual se mantuvieron los órganos hasta que decantaron (mínimo 12 horas). Una vez finalizada la inclusión de los órganos en la solución de sacarosa, las muestras se enviaron al Servicio de Histología del Centro Nacional de Biotecnología para su inclusión en OCT y la obtención de portaobjetos con criosecciones de entre 10 – 12 micras. A su recepción, las

criosecciones fueron atemperadas durante 30 minutos en cámara húmeda. Todos los pasos siguientes para la tinción de las muestras se realizaron en cámara húmeda, oscuridad y a 4°C. Tras el bloqueo con el suero de cabra, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario monoclonal de rata anti-endoglina de ratón (clon MJ7/18) o su isotipo control IgG2a κ durante 12h a 4°C a una concentración final de 20µg/ml en PBS-BSA 1%. El exceso de anticuerpo primario no unido se eliminó mediante lavados con PBS-BSA al 1%. Las reacciones fueron detectadas tras 1 hora de incubación con el anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-IgG de rata (H+L) acoplado al fluorocromo Alexa 488 (#A-11006, Molecular Probes, Invitrogen) a una concentración 2 µg/ml en presencia de suero de cabra (suero animal al 5% v/v en PBS). Todas las incubaciones se realizaron en presencia de suero de cabra al 5% en PBS. La referencia de los anticuerpos utilizados está detallada en la Tabla 7. El montaje se realizó colocando los cubreobjetos sobre las muestras de tejido, intercalando una gota de medio de montaje Prolong (*Prolong Gold with Dapi*, Invitrogen) que contiene DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) para realizar la tinción de los núcleos. Este agente intercalante tiñe el ADN y emite fluorescencia azul al ser irradiado con luz ultravioleta. Las tinciones se visualizaron en un microscopio láser de fluorescencia, con óptica confocal espectral Leica TCS-SP5-AOBS (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemania). Las imágenes fueron capturadas con el software LAS AF (Leica Application Suite 2.7.39723) integrado en el sistema.

### **6.3.2 Inmuncitofluorescencia.**

El cultivo de macrófagos peritoneales se realizó sobre cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro colocados en placas de 24 pocillos y tapizados anteriormente con suero de ratón inactivado por temperatura. Tras 24 horas de incubación en medio DMEM completo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, las muestras se fijaron con PFA al 1% en PBS durante 20 minutos a 4°C. Las muestras se bloquearon durante 1 hora a 4°C con suero de cabra al 5% en PBS y se incubaron con diversos anticuerpos primarios anti-endoglina de ratón (clon MJ7/18, clon RM00300) durante 1h a 4°C en oscuridad, o bien con el anticuerpo monoclonal anti-F4/80 de ratón acoplado al fluorocromo PE. Tras tres series de lavados con PBS-BSA al 1%, las muestras incubadas con el anticuerpo primario anti-endoglina de ratón fueron incubadas con el anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-IgG de rata (H+L) durante 30 minutos en oscuridad. Tras tres series de lavados con PBS-BSA al 1% se procedió al montaje de las muestras. Los cubreobjetos se extraen de los pocillos de las placas p24 y se colocan sobre los cubreobjetos con el lado que contiene las células orientado hacia la superficie del portaobjetos, intercalando una gota de medio de montaje Prolong que contiene DAPI para visualizar los núcleos de las células.

| Proteína        | Fluorocromo | Isotipo             | Especie huésped | Especie reconocida | Aplicación    | Referencia                  |
|-----------------|-------------|---------------------|-----------------|--------------------|---------------|-----------------------------|
| Endoglina       | —           | IgG2a, $\kappa$     | Rata            | Ratón              | CF<br>IHF/ICF | 14-1051,<br>eBioscience     |
| F4/80           | PE          | IgG2b, $\kappa$     | Rata            | Ratón              | CF            | 122616,<br>Biolegend        |
| CD11b           | PE          | IgG2b, $\kappa$     | Rata            | Ratón              | CF            | M11BPE,<br>Immunostep       |
| Ly6G            | APC         | IgG2a, $\kappa$     | Rata            | Ratón              | CF            | MLY6GA,<br>Immunostep       |
| CD19            | FITC        | IgG1, $\kappa$      | Ratón           | Ratón              | CF            | M19F,<br>Immunostep         |
| CD3e            | FITC        | IgG1, $\kappa$      | Rata            | Ratón              | CF            | 220911<br>Immunostep        |
| TLR2            | Alexa 488   | IgG1, $\kappa$      | Ratón           | Ratón<br>Humano    | CF            | 121808<br>Biolegend         |
| IgG/IgM         | Alexa 488   | F(ab') <sub>2</sub> | Cabra           | Rata               | IHF/ICF       | A-11006<br>Molecular Probes |
| IgG             | FITC        | F(ab') <sub>2</sub> | Conejo          | Rata               | CF            | Ab102246<br>Abcam           |
| Isotipo control | —           | IgG2a, $\kappa$     | Rata            | —                  | CF<br>IHF/ICF | 14-4321,<br>eBioscience     |
| Isotipo control | PE          | IgG2b, $\kappa$     | Rata            | —                  | CF            | 400608,<br>Biolegend        |
| Isotipo control | APC         | IgG2a               | Rata            | —                  | CF            | 220812/RIGG2A<br>Immunostep |
| Isotipo control | Alexa 488   | IgG2a, $\kappa$     | Rata            | —                  | CF            | 400525<br>Biolegend         |

**Tabla 7. Anticuerpos utilizados en las técnicas de inmunodetección.** En la tabla se muestran los anticuerpos dirigidos frente a las proteínas de interés y los isotipos control correspondientes. En cada uno se detalla el fluorocromo al que están acoplados, el isotipo, la técnica en la que han sido aplicados y la referencia de la casa comercial.

## 7 Análisis estadístico

Los datos pertenecientes a muestras de donantes se presentan como el valor de la media  $\pm$  SD (*Standard Deviation*). En el caso de los ensayos *in vivo* realizados en ratón, los datos se presentan como el valor de la mediana  $\pm$  SEM (error estándar de la media), calculado como  $SEM=SD/\sqrt{n}$ , donde  $n$  es el tamaño de la población. El cálculo de la SEM es válido para muestras con  $n < 10$ . Las diferencias entre las medias se calcularon aplicando el test *t*-Student de dos colas para muestras desapareadas. La comparativa entre el grupo de ratones control y los ratones experimentales se realizó mediante un análisis de varianza ANOVA y se aplicó el test de comparación múltiple *post-hoc* de Bonferroni para detectar diferencias estadísticamente significativas. Las curvas de supervivencia están representadas como curvas de Kaplan-Meier y los resultados fueron analizados con el test log-rank (Mantel-Cox). Se consideran diferencias estadísticamente significativas aquellas con un valor  $p < 0,05$ , siendo mostradas en las figuras de la siguiente manera: \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . La abreviatura *ns* hace referencia a resultados no significativos. Los análisis estadísticos se realizaron con

software SPSS para Windows versión 11.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) y en otros casos se utilizó el software GraphPad Prism 5 para Windows (La Jolla, CA).

## 8 Aspectos legales

### 8.1 Muestras de origen humano

La investigación realizada a partir de los datos clínicos de pacientes HHT y de las muestras de origen humano (plasma y MNCs) se realizó conforme a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki (*Cardiovascular Research*, 1997; 35:2-4). Para los donantes incluidos en el estudio se solicitó el consentimiento informado de participación en estudios científicos debidamente firmado y cumplimentado, o el de los padres en el caso de ser éste menor de edad. El protocolo de actuación con las muestras obtenidas de los donantes fue aprobado por el Comité de Ética del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid) y por el Subcomité de Ética del CSIC.

### 8.2 Manipulación experimental de animales

Los animales se criaron y mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos en el estabulario del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC, Madrid). Los animales fueron manipulados de acuerdo a las normas de buenas prácticas con animales de laboratorio definidas por las instituciones nacionales de bienestar animal (RD 1201/2005 BOE nº252). El diseño experimental y el trabajo con los animales fue aprobado por el Comité de Ética del Centro de Investigaciones Biológicas, siguiendo la guía relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos definida por la directiva europea 2010/63/UE. Para el aislamiento de órganos y fluidos corporales, los animales fueron anestesiados con Isoflurano inhalado y posteriormente sacrificados por dislocación cervical. Según los requisitos de formación de personal al que se refiere el artículo 15 del RD 53/2013 BOE nº34, la presente candidata a la obtención de mención de doctor, fue reconocida como Categoría B, por lo que está reconocida como personal capacitado para realizar las siguientes funciones: eutanasia de los animales y realización de los procedimientos. Se entiende como procedimiento “La utilización, tanto invasiva como no invasiva, de un animal con fines experimentales u otros fines científicos, cuyos resultados sean predecibles o impredecibles, o con fines educativos siempre que dicha utilización pueda causarle al animal un nivel de dolor, sufrimiento, angustia o daño duradero equivalente o superior al causado por la introducción de una aguja conforme a las buenas prácticas veterinarias” (Artículo 3. RD 53/2013).

# RESULTADOS



## IV. Resultados

### 1 Diagnóstico diferencial de HHT1 y HHT2 mediante la valoración de Ang-2 y sEng en plasma.

#### 1.1 Niveles reducidos de Ang-2 y sEng en plasma de pacientes HHT.

Los niveles plasmáticos tanto de Ang-2 así como de sEng fueron valorados mediante la técnica cuantitativa de ELISA en muestras de plasma pertenecientes a 38 donantes sanos (no-HHT) y 62 pacientes HHT, de los cuales 32 pertenecen al grupo HHT1 y los 30 restantes al grupo HHT2. Todos los pacientes incluidos en el análisis están diagnosticados genéticamente como HHT1 o HHT2.

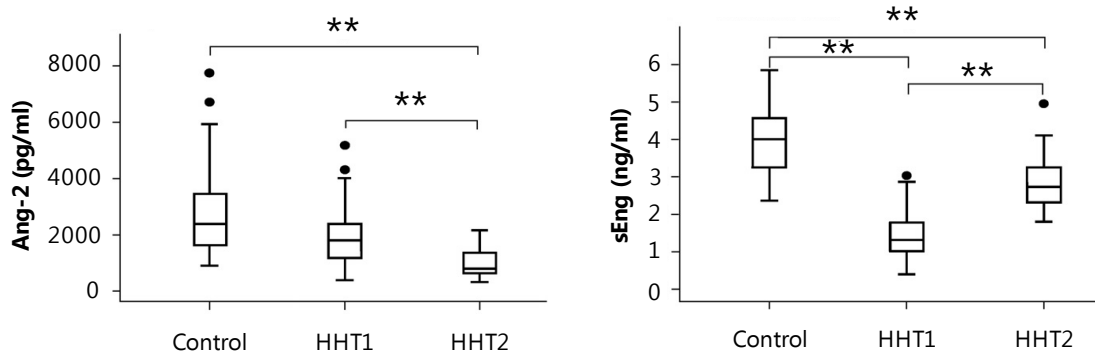
Los niveles plasmáticos de Ang-2 en los pacientes HHT están disminuidos en comparación con aquellos que presentan los donantes sanos (Tabla 8). Los controles presentan un promedio de 2.712,90 pg/ml  $\pm$  263,41, mientras que los pacientes HHT1 muestran un valor promedio de 2.042,68 pg/ml  $\pm$  201,75, siendo el valor promedio de Ang-2 más bajo el presentado por el grupo HHT2 con 956,77 pg/ml  $\pm$  84,05. Los niveles de sEng en plasma de pacientes HHT son significativamente menores comparados con la población control (Tabla 8). Los individuos sanos presentan un promedio de 3,95 ng/ml  $\pm$  0,87 mientras que la población HHT1 presenta un promedio de 1,48 ng/ml  $\pm$  0,62 y la población HHT2 un promedio de 2,91 ng/ml  $\pm$  0,76.

|               | Grupo   | N  | Media $\pm$ SEM      | Rango de datos    |
|---------------|---------|----|----------------------|-------------------|
| Ang-2*        | Control | 38 | 2712,90 $\pm$ 263,41 | 2179,17 – 3246,62 |
|               | HHT1    | 32 | 2042,68 $\pm$ 201,75 | 1631,21 – 2454,15 |
|               | HHT2    | 30 | 956,77 $\pm$ 84,05   | 784,87 – 1128,68  |
| sEng* (ng/ml) | Control | 38 | 3,95 $\pm$ 0,87      | 3,66 – 4,23       |
|               | HHT1    | 32 | 1,48 $\pm$ 0,62      | 1,26 – 1,71       |
|               | HHT2    | 30 | 2,91 $\pm$ 0,76      | 2,62 – 3,19       |

Tabla 8. Niveles plasmáticos de Ang-2 y sEng en las poblaciones control, HHT1 y HHT2. \*Diferencias estadísticamente significativas utilizando el F-ratio (ANOVA test,  $p < 0,01$ ).

Las diferencias observadas en los niveles de Ang-2 son estadísticamente significativas entre los individuos sanos y la población HHT2 así como entre individuos HHT1 y HHT2. Sin embargo, aunque se observa una menor cantidad de Ang-2 en los pacientes HHT1 frente al grupo control, las diferencias no son estadísticamente significativas (Figura 28). En el caso de sEng, encontramos diferencias significativas entre los 3 grupos analizados, siendo los que presentan menores niveles los HHT1. Los valores fuera de rango (*outliers*) que aparecen tanto en la valoración de Ang-2 como en la de sEng fueron incluidos en los análisis estadísticos.





**Figura 28. Representación *box-plot* de los niveles plasmáticos de Ang-2 y sEng en donantes sanos y pacientes HHT.** En la figura se representa un *box plot* que muestra los niveles en plasma de Ang-2 y sEng en donantes sanos utilizados como control (n=38), pacientes HHT1 (n=32) y pacientes HHT2 (n=30). La línea horizontal en el centro de cada caja representa el percentil 50, mientras que los márgenes de la caja (*box*) representan los percentiles 25 y 75 respectivamente. El margen (*tip*) de las líneas verticales indica el percentil 5 y 95. Los individuos fuera de rango se han representado como puntos (*outliers*). Se muestran diferencias estadísticamente significativas (\*\* $p < 0,01$ ).

## 1.2 Análisis discriminante

La función lineal discriminante de Fisher fue utilizada para obtener un análisis discriminante utilizando la combinación de los niveles de sEng y Ang-2 presentes en plasma. Este análisis estadístico proporciona una función que puede ser utilizada para identificar individuos que sean portadores de la enfermedad y también permite distinguir entre los dos tipos de HHT (Tabla 9).

|               | Grupo                   |        |        |
|---------------|-------------------------|--------|--------|
|               | Control                 | HHT1   | HHT2   |
| sEng (ng/ml)  | 6,800                   | 1,950  | 5,626  |
| Ang-2 (pg/ml) | $-7,209 \times 10^{-5}$ | 0,001  | 0,000  |
| Constante     | -14,415                 | -3,395 | -8,827 |

**Tabla 9. Clasificación de los coeficientes de la función.** Función lineal discriminante de Fisher.

Las funciones que describen y predicen a qué grupo pertenecerá un donante son las siguientes:

$$\text{Sano} = 6,80 \times \text{sEng (ng/ml)} - 0,000072 \times \text{Ang-2 (pg/ml)} - 14,41$$

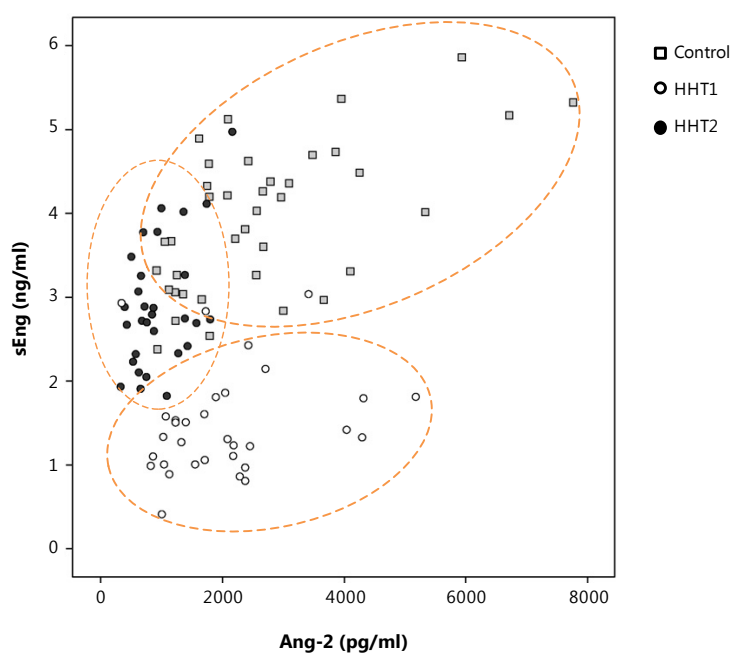
$$\text{HHT1} = 1,95 \times \text{sEng (ng/ml)} + 0,001 \times \text{Ang-2 (pg/ml)} - 3,40$$

$$\text{HHT2} = 5,63 \times \text{sEng (ng/ml)} + 0,000 \times \text{Ang-2 (pg/ml)} - 8,83$$

Al aplicar las anteriores funciones, el valor más elevado determina el grupo al que pertenece el individuo analizado. Con el fin de evaluar la eficiencia del valor predictivo del test lineal discriminante de Fisher se desarrolló una validación cruzada (Tabla 10). La validación cruzada nos permite evaluar cuando el grupo teórico asignado por la función discriminante de Fisher se corresponde con el grupo real al que el individuo pertenece. Una clasificación correcta es cuando el grupo asignado y real son el mismo. Este método de análisis está descrito por Afifi et Clark (1996). Como puede observarse en la Tabla 12, el 79% de los casos han sido correctamente clasificados. La predicción está basada en la combinación de las dos variables (Ang-2 y sEng) alcanzando el 65,8% de casos correctamente clasificados para individuos control (no-HHT), el 90,6% para los casos HHT1 y el 83,3% para los casos HHT2. La dispersión de los datos se muestra en la Figura 29.

| Grupo real | Grupo teórico asignado |      |      | Total |
|------------|------------------------|------|------|-------|
|            | Control                | HHT1 | HHT2 |       |
| Control    | 25                     | 2    | 11   | 38    |
| HHT1       | 1                      | 29   | 2    | 32    |
| HHT2       | 4                      | 1    | 25   | 30    |
| % Control  | 65,8                   | 5,3  | 28,9 | 100   |
| % HHT1     | 3,1                    | 90,6 | 6,3  | 100   |
| %HHT2      | 13,3                   | 3,3  | 83,3 | 100   |

Tabla 10. Validación cruzada de los datos obtenidos en la función discriminante del test de Fisher.



**Figura 29. Correlación entre los niveles de Ang-2 y sEng.** En la figura se representan los niveles plasmáticos de Ang-2 (pg/ml) y sEng (ng/ml) en individuos control (n=38), HHT1 (n=32) y HHT2 (n=30). En la figura se han resaltado con tres círculos de línea discontinua las zonas con mayor densidad de datos para cada grupo de individuos control, HHT1 y HHT2.

## 2 Procesos infecciosos en la población HHT española

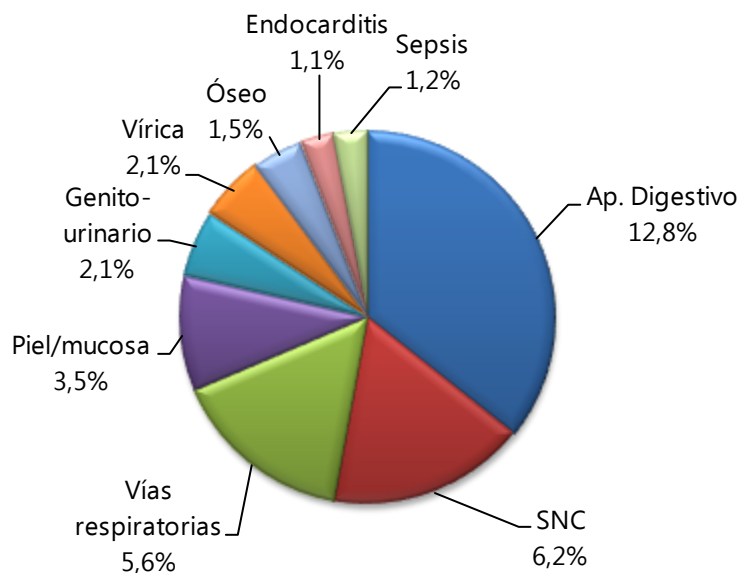
A pesar que varias publicaciones sugieren que los pacientes HHT presentan una mayor predisposición a desarrollar procesos infecciosos que en algunos casos dan lugar a complicaciones serias para la salud como abscesos cerebrales, septicemia o osteomielitis, su función inmunológica no ha sido analizada en detalle. Con el fin de indagar en la posible relación entre deficiencias del sistema inmune y el síndrome HHT, se analizaron de forma retrospectiva la historia clínica de una cohorte de pacientes HHT (n=185) que fueron admitidos en el Centro de Referencia español para el manejo de la HHT (Hospital de Sierrallana) durante el periodo 2005 - 2010. El síndrome HHT fue diagnosticado mediante criterios clínicos y/o análisis genético.

### 2.1 Incidencia de infecciones

Durante la revisión de las historias clínicas, en un primer lugar se recopilieron los datos relacionados con enfermedades infecciosas. Se estableció el porcentaje de incidencia de cada tipo de infección según su localización, para valorar cuáles de ellos eran los más frecuentes (Figura 30). Las infecciones más comunes se encuentran vinculadas al aparato digestivo, sistema nervioso central y vías respiratorias. En menor medida se han registrado infecciones que afectan a piel o mucosas, el aparato genito-urinario e infecciones víricas. Especial atención tienen osteomielitis, endocarditis y sepsis, que aún siendo las de menor incidencia en la población HHT, pueden dar lugar a complicaciones médicas serias y con riesgo para la salud del paciente.

Más en detalle, se revisaron las historias clínicas de pacientes que habían cursado con osteomielitis, infecciones en el aparato digestivo, abscesos cutáneos o cerebrales y las endocarditis. Se anotaron datos como edad de aparición, sexo y síntomas clásicos de la HHT. Las características de interés presentes en los pacientes que desarrollaron una osteomielitis se muestran en la Tabla 12. Con el tamaño de la población no se puede establecer si hay una mayor predisposición en pacientes HHT1 o HHT2, o si está influida por el sexo. Aún así, se han presentado en 4 hombres HHT1 con respecto a 4 mujeres HHT2. Todos ellos presentan epistaxis y telangiectasias, pero ambos síntomas son los de mayor prevalencia en la enfermedad. Todos ellos presentan alguna MAVs en órganos internos como tubo digestivo, pulmón e hígado. Una osteomielitis fue posterior a un episodio de septicemia, una

espondilodiscitis fue el resultado de una recidiva de tuberculosis, y un paciente tubo dos episodios severos de infección cursando con un absceso cerebral y posteriormente una sacroileitis.



**Figura 30. Incidencia de infecciones en la población HHT.** Las infecciones registradas en los pacientes HHT se clasificaron según su localización. Dentro de aquellas relacionadas con el aparato digestivo se incluyen úlceras gástricas, peritonitis y apendicitis. En las que afectan al sistema nervioso central (SNC) se han incluido abscesos cerebrales y meningitis. En las englobadas dentro de las vías respiratorias se encuentran faringitis de repetición (> 3 episodios/año), tuberculosis y neumonía. Los abscesos cutáneos y blefaritis están representados por las infecciones en piel y mucosas. En el apartado de enfermedades óseas se han incluido osteomielitis y espondilodiscitis.

#### Osteomielitis

| Tipo             | Patógeno aislado                  | Gen  | Sexo   | Edad | Clínica HHT    | Observaciones                 |
|------------------|-----------------------------------|------|--------|------|----------------|-------------------------------|
| Osteomielitis    | <i>Staphylococcus aureus</i>      | ENG  | Hombre | 42   | E, T, G        | Sepsis                        |
| Sacroileitis     | <i>Staphylococcus sp.</i>         | ENG  | Hombre | 38   | E, T, P        | Absceso cerebral              |
| Sacroileitis     | No identificado                   | ENG  | Hombre | 45   | E, T, G, sP, H |                               |
| Sacroileitis     | No identificado                   | ENG  | Hombre | 57   | E, T, H        |                               |
| Spondilodiscitis | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | ALK1 | Mujer  | 57   | E, T, sP       | Secundario a una tuberculosis |
| Osteomielitis    | No identificado                   | ALK1 | Mujer  | 60   | E, T, P, G, H  |                               |

**Tabla 11. Osteomielitis registradas en la población HHT española.** Las osteomielitis se han registrado tanto en pacientes HHT1 (4 hombres) como en pacientes HHT2 (2 mujeres). El patógeno implicado se ha identificado en 3 casos; 2 causados por *Staphylococcus sp* y uno por *Mycobacterium tuberculosis*. Todos los individuos presentan epistaxis, telangiectasias y la afectación de algún órgano. E=epistaxis, T=telangiectasia, G=sangrados gástricos, P=MAVs pulmonar, H=MAV hepática, sP=MAV pulmonar de pequeño tamaño (Grado 1 en prueba *Ecobubble*).

El diagnóstico de los abscesos cerebrales se realizó mediante TC (tomografía computerizada) o RMN (resonancia magnética nuclear), entendiéndose como absceso un acúmulo de pus. Los abscesos cerebrales se han identificado sólo en pacientes HHT1, en un

rango de edades comprendido entre los 20 y los 44 años. Los abscesos cutáneos se han identificado en ambos tipos de HHT (Tabla 12). En relación a los abscesos cerebrales, que son los que pueden cursar con las complicaciones más serias para el individuo, podemos comprobar que todos presentan una fístula pulmonar a excepción de una mujer que era portadora de una fístula hepática. Este dato es relevante ya que la mayor incidencia de abscesos cerebrales en pacientes HHT se considera secundaria a la presencia de fístulas pulmonares. También se anotó si eran fumadores o no puesto que se había establecido una posible relación entre el hábito al tabaco y la aparición de abscesos cerebrales en pacientes de HHT (Silva *et al.*, 2013). Por lo que podemos comprobar en nuestros datos, no parece haber una relación entre el tabaco y la aparición de un absceso cerebral puesto que 3 de los 5 pacientes no eran fumadores.

**Abscesos cutáneos y cerebrales**

| Tipo     | Patógeno aislado                                      | Gen  | Sexo   | Edad | Sintomatología HHT | Fumador     |
|----------|-------------------------------------------------------|------|--------|------|--------------------|-------------|
| Cerebral | Sin identificar                                       | ENG  | Hombre | 21   | E, T, P            | Sí (20/día) |
| Cerebral | <i>Staphylococcus sp.</i>                             | ENG  | Hombre | 44   | E, T, P            | No          |
| Cerebral | <i>Peptrostreptococcus &amp; Bacteroides fragilis</i> | ENG  | Mujer  | 43   | T, H               | Exfumador   |
| Cerebral | Sin identificar                                       | ENG  | Hombre | 41   | E, T, P            | Sí (5/día)  |
| Cerebral | Sin identificar                                       | ENG  | Mujer  | 36   | E, T, P            | No          |
| Cutáneo  | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                         | ENG  | Mujer  | 70   | E, T, sP, H        | No          |
| Cutáneo  | Sin identificar                                       | ENG  | Hombre | 41   | E, T, P            | Sí (5/día)  |
| Cutáneo  | Sin identificar                                       | ALK1 | Hombre | 20   | E, T, H            | Sí (15/día) |

**Tabla 12. Abscesos cerebrales y cutáneos en la población HHT española.** Los abscesos cerebrales han sido identificados únicamente en pacientes HHT1. La edad de aparición se encuentra entre los 21 y 44 años, presentando todos los pacientes epistaxis, telangiectasias y afectación de órganos internos. Los abscesos cerebrales no parecen estar vinculados al hecho de que el individuo sea fumador. Los abscesos cutáneos afectan tanto a HHT1 como a HHT2. E= epistaxis, T = telangiectasias, P = MAV pulmonar, H = MAV hepática, sP = MAV pulmonar de pequeño tamaño (Grado 1 en prueba *Ecobubble*).

Dentro de las infecciones relacionadas con el aparato digestivo se registraron úlceras gástricas (ulcus), peritonitis y apendicitis (Tabla 13). Las afecciones de mayor prevalencia en este caso son las úlceras gástricas causadas por *Helicobacter pylori*. Aparecen en edades relativamente tempranas, pues ninguno superaba los 50 años. La mayor prevalencia de infecciones del aparato digestivo no parece depender del tipo HHT al que pertenece el individuo. A excepción de un paciente, todos los individuos presentaban alguna MAV en órganos internos.

Un único caso de endocarditis fue detectado en la cohorte HHT analizada (Tabla 14). El paciente era un varón HHT2 de 58 años que presentaba una MAV hepática y había desarrollado una endocarditis por *Streptococcus viridans*.

Úlcus y peritonitis

| Tipo                  | Patógeno aislado           | Gen  | Sexo   | Edad | Sintomatología HHT |
|-----------------------|----------------------------|------|--------|------|--------------------|
| Úlcus                 | <i>Helicobacter pylori</i> | NI   | Mujer  | 35   | T, G               |
| Úlcus                 | <i>Helicobacter pylori</i> | ENG  | Mujer  | 40   | E, T, P, H         |
| Úlcus (de repetición) | <i>Helicobacter pylori</i> | ALK1 | Mujer  | 48   | E, T               |
| Úlcus duodenal        | <i>Helicobacter pylori</i> | ALK1 | Hombre | 26   | E, T, H            |
| Peritonitis           | No identificado            | ENG  | Mujer  | 43   | T, H               |
| Peritonitis           | No identificado            | ALK1 | Mujer  | 50   | E, T, sP           |
| Apendicitis           | No identificado            | ALK1 | Hombre | 45   | E, T               |

**Tabla 13. Infecciones del sistema digestivo en pacientes HHT.** Se registraron 4 pacientes con úlceras gástricas, 2 peritonitis y una apendicitis. Con los datos aquí presentes no se observa una diferencia entre pacientes HHT1 y HHT2. Tres de los cuatro individuos con úlcera gástrica presentaban una fístula a nivel hepático o sangrados del tubo digestivo debido a la presencia de telangiectasias. NI = no identificado.

Otros

| Tipo         | Patógeno aislado              | Gen  | Sexo   | Edad | Sintomatología HHT |
|--------------|-------------------------------|------|--------|------|--------------------|
| Endocarditis | <i>Streptococcus viridans</i> | ALK1 | Hombre | 58   | E, T, H            |

**Tabla 14. Endocarditis en pacientes HHT.** Un paciente HHT2 de 58 años y con una fístula hepática desarrolló una endocarditis. E = epistaxis, T = telangiectasia, H = MAV hepática.

## 2.2 Hemogramas, perfiles bioquímicos generales y cuantificación de inmunoglobulinas en pacientes HHT.

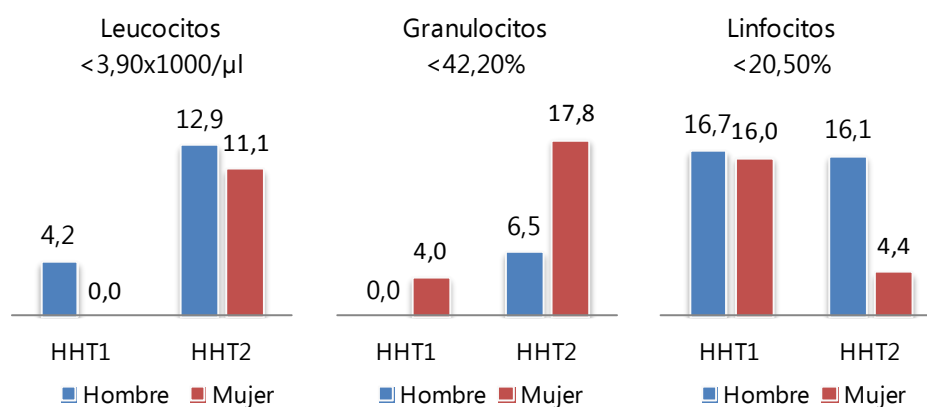
Las inmunodeficiencias primarias (IP) deben sospecharse en personas que tienen “demasiadas infecciones” causadas por patógenos normales, infecciones recurrentes o crónicas difíciles de erradicar e infecciones por gérmenes oportunistas o no habituales. Las IP suelen manifestarse en la primera infancia, pero algunas pueden manifestarse en adultos como la inmunodeficiencia variable común o los déficit aislados de IgA entre otras. Aunque el diagnóstico preciso de las IP requiere estudios muy especializados, a menudo es posible acercarse al diagnóstico con pruebas de laboratorio sencillas y rutinarias como el hemograma, perfiles bioquímicos generales o cuantificación de inmunoglobulinas (Ruiz-Contreras, 2003). Los análisis bioquímicos y hemogramas de un total de 125 pacientes fueron analizados con el

objetivo de observar si había alguna alteración en los mismos que pudiera estar relacionada con una mayor incidencia de infecciones o con una IP que hubiese pasado inadvertida. Se revisaron un total de 125 análisis correspondientes a 49 pacientes HHT1 (25 mujeres y 24 varones) y 76 pacientes HHT2 (45 mujeres y 31 varones). En primer lugar se analizó el recuento leucocitario, comparando los datos obtenidos en cada paciente con el rango de referencia facilitado por el sistema de análisis. El promedio de valores para cada grupo (HHT1 o HHT2) y sexo (hombre o mujer) estaba dentro de los rangos de referencia para cada parámetro (Tabla 15).

| Parámetro                            | Hombre HHT1      | Hombre HHT2       | Mujer HHT1        | Mujer HHT2       | Rango de referencia |
|--------------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|---------------------|
| Leucocitos $\times 10^3/\mu\text{L}$ | 6,10 $\pm$ 1,43  | 6,11 $\pm$ 2,55   | 6,51 $\pm$ 1,70   | 5,75 $\pm$ 1,67  | 3,90 - 10,00        |
| Granulocitos %                       | 57,62 $\pm$ 8,22 | 57,63 $\pm$ 11,41 | 58,01 $\pm$ 11,57 | 52,56 $\pm$ 9,32 | 42,20-75,20         |
| Linfocitos %                         | 29,25 $\pm$ 9,46 | 28,92 $\pm$ 9,02  | 31,05 $\pm$ 9,98  | 35,19 $\pm$ 9,95 | 20,50 – 51,50       |
| Monocitos %                          | 9,85 $\pm$ 3,06  | 9,06 $\pm$ 2,79   | 8,06 $\pm$ 1,94   | 9,19 $\pm$ 2,35  | 2,00 – 13,00        |
| Eosinófilos %                        | 2,55 $\pm$ 1,35  | 3,47 $\pm$ 2,49   | 2,31 $\pm$ 1,94   | 2,97 $\pm$ 1,81  | 0,00 – 8,00         |
| Basófilos %                          | 0,64 $\pm$ 1,35  | 0,88 $\pm$ 0,81   | 0,58 $\pm$ 0,35   | 0,63 $\pm$ 0,30  | 0,00 – 2,00         |

**Tabla 15. Recuento leucocitaria en pacientes HHT.** Se analizaron los datos correspondientes a un total de 125 pacientes; 49 individuos HHT1 (24 hombres y 25 mujeres) y 76 pacientes HHT2 (31 hombres y 45 mujeres). En la tabla se presenta el valor promedio  $\pm$  SD. El rango de referencia se muestra en la última columna de la derecha. Todos los parámetros observados se encuentran dentro del rango de referencia.

A pesar de que el valor promedio dentro de la población estaba dentro de la normalidad, observamos que había individuos que presentaban valores por debajo del límite inferior del rango de referencia para diversos parámetros, pudiendo estar ello relacionado con una inmunodeficiencia primaria (Figura 31). Se observa una mayor deficiencia de leucocitos totales en los pacientes HHT2, pero al observar las poblaciones son dos las más afectadas; granulocitos y linfocitos. Un 17,8% de las mujeres HHT2 presentan una deficiencia en granulocitos, y alrededor de un 16% de los pacientes HHT1 y los varones HHT2 presentan una deficiencia en linfocitos circulantes. La leucopenia podría estar contribuyendo a un detrimento de la respuesta inmunitaria.



**Figura 31. Porcentaje de pacientes HHT con un déficit en el recuento leucocitario.** En la figura se muestra el porcentaje de pacientes HHT1 y HHT2 según el sexo al que pertenecen que presentaban un déficit en el recuento leucocitario. Las alteraciones se observaron en el recuento de leucocitos totales, el porcentaje de granulocitos y el porcentaje de leucocitos.

Los déficit de inmunoglobulinas en plasma como IgG, IgM e IgA también están asociados a IP, por lo que su concentración se evaluó en un total de 10 pacientes (Tabla 16). Debido al tamaño de la población analizada ( $n=10$ ), no se realizó ninguna distinción entre HHT1/ HHT2 o el sexo del individuo. En rasgos generales no se observa ninguna deficiencia en los niveles de inmunoglobulinas plasmáticas analizadas ya que el promedio de la población se encuentra dentro de los rangos de referencias establecidos como normales. Si bien hay 3 pacientes que presentan niveles por encima del rango de referencia que pueden estar vinculados a una infección en curso. Sin embargo, en ninguno de ellos se ha detectado una deficiencia en la expresión de IgG, IgM o IgA en plasma.

| Parámetro   | HHT                 | N  | Rango de referencia | Observaciones               |
|-------------|---------------------|----|---------------------|-----------------------------|
| IgG (mg/dL) | $1262,7 \pm 255,14$ | 10 | 734.00 – 1486.00    | > 1486 mg/dL<br>3 pacientes |
| IgM (mg/dL) | $109,23 \pm 63,22$  | 10 | 41.0 – 201.0        | > 201 mg/dL<br>1 paciente   |
| IgA (mg/dL) | $309,43 \pm 168,58$ | 10 | 49.0 – 401.0        | > 401 mg/dL<br>2 pacientes  |

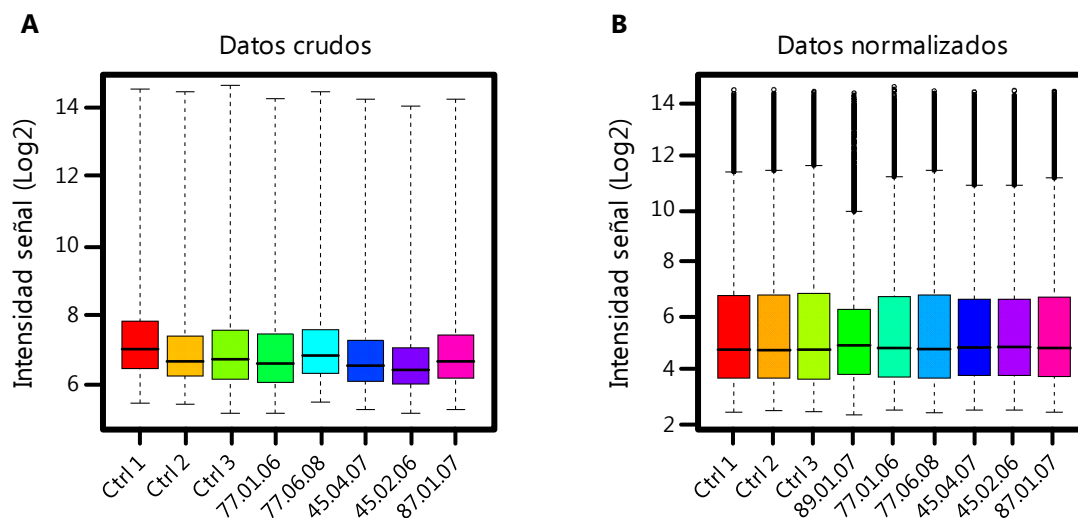
**Tabla 16. Niveles de IgG, IgM e IgA en pacientes HHT.** Los niveles de inmunoglobulinas asociadas a procesos infecciosos se analizaron en un total de 10 pacientes HHT. El valor promedio encontrado se encuentra dentro del rango de referencia. Se debe puntualizar que 3 pacientes presentaban niveles elevados de IgG, 1 individuo niveles elevados de IgM y 2 pacientes presentaban mayores niveles de IgA a los establecidos como normales.

### 3 Expresión génica diferencial en MNCs de pacientes HHT.

Un total de 9 chips de ADN fueron hibridados y escaneados (3 muestras de individuos control, 3 muestras de pacientes HHT1 y 3 muestras de pacientes HHT2). Sin embargo, tras el proceso de normalización de la señales de hibridación, se observó que una de las muestras correspondientes a un paciente HHT1 presentaba una señal de hibridación mucho menor que



el resto de muestras, por lo que fue descartada de los análisis posteriores de expresión génica (Figura 32). En consecuencia, el análisis de expresión génica se realizó con un total de 8 muestras: 3 donantes control (no-HHT) y 5 donantes HHT (2 HHT1+3 HHT2).



**Figura 32. Representación *box-plot* de las señales de intensidad derivadas de los *microarrays* de ADN. (A)** Representación *box-plot* de la distribución de las señales de hibridación en crudo de 3 donantes sanos y de los 6 donantes HHT para los que se realizó hibridación de su ADNc en *microarrays* de ADN. **(B)** Representación *box-plot* de las intensidades de la señal tras la normalización de los datos. El individuo 89.01.07 no sigue la distribución de datos del resto de donantes.

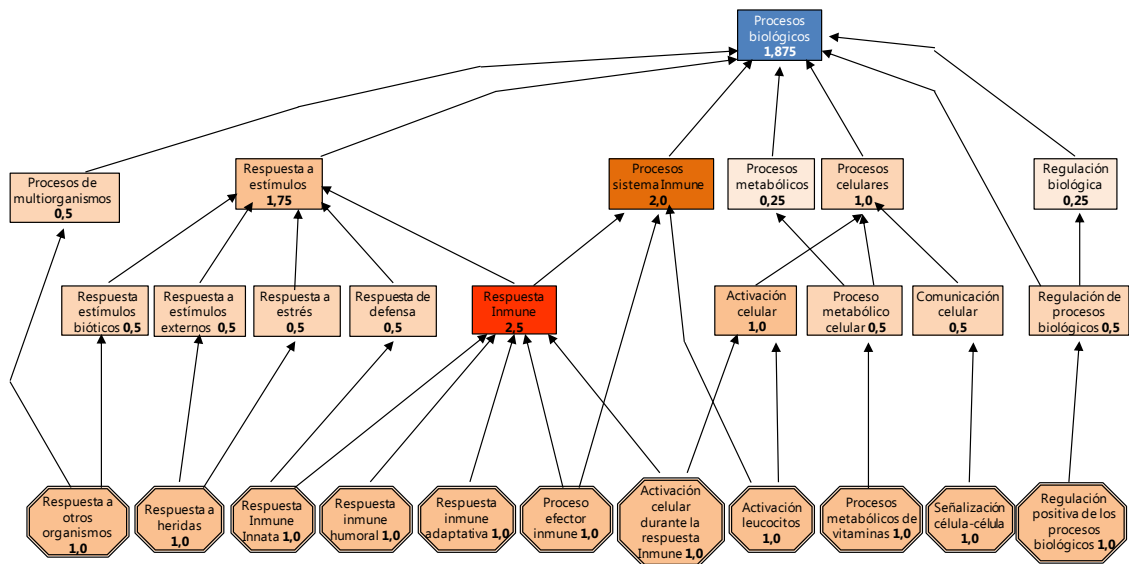
Tras la normalización de los datos, el valor de la *ratio* se calculó a partir del valor de las señales para cada sonda y cada muestra tras su transformación a logaritmo en base 2. Con una probabilidad, o valor  $p < 0,01$  y una *ratio* superior a 1,5 ( $ratio = 2^{1,5}$  veces de inducción sobre el control) se obtuvieron 27 genes inducidos en las MNCs de pacientes HHT (Anexo I, Tabla 2). En el listado de genes inducidos, varias anotaciones se corresponden con genes asociados a anemia como *ADA*, *HBA1*, *HBA2* y *HBB*. Probablemente estos genes que aparecen diferencialmente expresados en las muestras de HHT, sean debido a que los pacientes inducen la expresión de genes relacionados con la hemoglobina para compensar la anemia que presentan derivada de las hemorragias ya que en situaciones las MNCs tienen la capacidad de sintetizar hemoglobina en otras patologías (Brunyanski *et al.*, 2015).

Con una probabilidad, o valor  $p < 0,01$  y una *ratio* inferior a -1,5 ( $2^{1,5}$  veces de represión por debajo del control) se obtuvieron 187 genes reprimidos en MNCs de pacientes HHT (Anexo I, Tabla 3). Entre todos ellos destaca la presencia de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas, proteínas del sistema del complemento, receptores de MHC-I, interleuquinas y diversos genes relacionados con el sistema inmunitario.

### 3.1 Procesos funcionales afectados en MNCs de pacientes HHT.

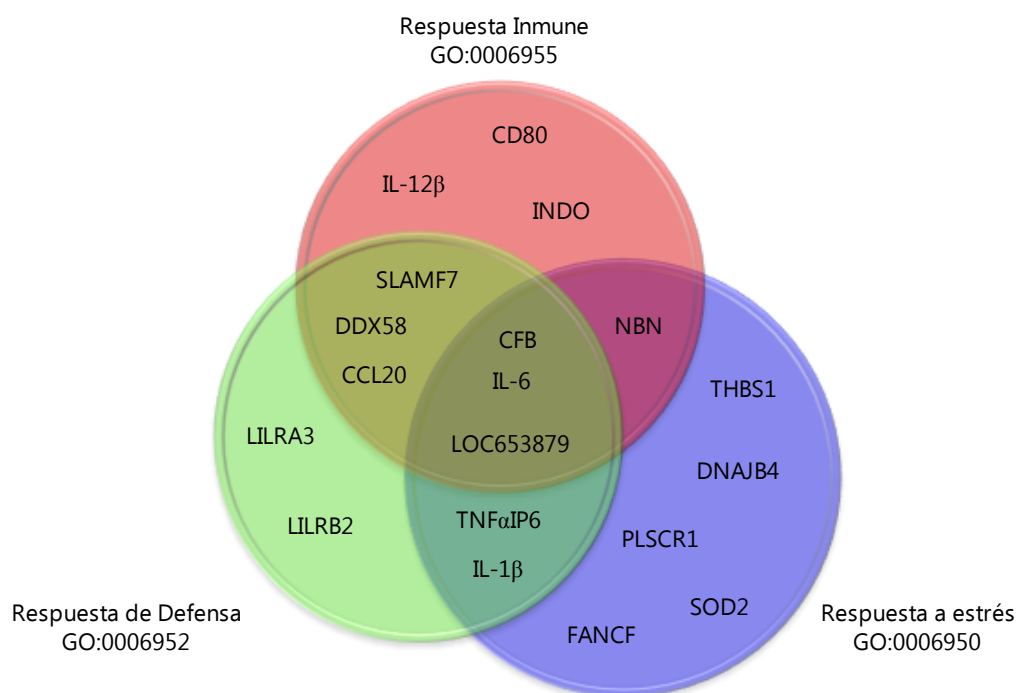
Con el listado de genes diferencialmente expresados en MNCs de pacientes HHT se realizó un análisis de enriquecimiento funcional mediante el cual se puede predecir si determinadas funciones celulares pueden verse afectadas. Para realizar el análisis de enriquecimiento funcional, fue utilizada la herramienta FatiGO<sup>1</sup> ([www.babelomics.bioinfo.cipf.es](http://www.babelomics.bioinfo.cipf.es)). FatiGO realiza una comparativa entre el listado de genes introducidos y la base de datos GO. Para ello se introdujo el listado de genes inducidos o reprimidos, y se realizó una comparación frente al genoma humano. Se seleccionó la base de datos de procesos biológicos presente en GO para realizar el análisis funcional. El análisis del listado de genes inducidos en las MNCs de pacientes HHT no mostró ningún grupo funcional sobre-representado. Sin embargo, el análisis funcional de genes reprimidos en las MNCs de pacientes HHT reveló la alteración de un total de 54 grupos funcionales implicados en procesos biológicos en 7 niveles consecutivos de la base de datos GO. En el Anexo I (Tabla 4) se encuentra el listado con la descripción de los grupos funcionales estadísticamente significativos. Podemos comprobar que los grupos funcionales más afectados son la Respuesta Inmune (GO:0006955) con un 84,01% de anotaciones y Procesos del Sistema Inmune (GO:0002376) con un 81,46% de anotaciones. El porcentaje de anotaciones hace referencia al número de genes del total de genes reprimidos, que se encuentran dentro del grupo funcional afectado. Para visualizar los grupos funcionales más significativos y las conexiones entre ellos, se utilizó la herramienta *DAG Viewer*. Para simplificar la figura los datos fueron representados a partir del nivel 4 (Figura 33). En la representación gráfica se muestran los términos más significativos (FDR<0,01) en un árbol sub-ontológico.

<sup>1</sup> El nombre FatiGO hace referencia al autor del software Fatima Al-Sharour y, a la base de datos que utiliza para realizar el análisis, la GO (Gene Ontology).



**Figura 33. Representación de los grupos funcionales implicados en procesos biológicos afectados en macrófagos de pacientes HHT.** La lista de genes reprimidos en MNCs de los pacientes HHT en comparación con las células de donantes no-HHT se sometió a un análisis de enriquecimiento funcional usando el programa FatiGO ([www.babelomics.org](http://www.babelomics.org)). El listado de genes sometidos se comparó con el listado de anotaciones presentes en el genoma humano para obtener una predicción de grupos funcionales en la base de datos de GO que pudieran estar afectados con significancia estadística. En la figura se representan los grupos GO a partir del nivel 4 de los Procesos Biológicos que están estadísticamente ( $FDR < 0,01$ ) afectados por la represión de genes en MNCs de pacientes HHT. Los dos grupos funcionales más representativos estadísticamente son el grupo Procesos del Sistema Inmune (GO:0002376) en el nivel 2 de la ontología con un 81,5% de anotaciones y la Respuesta Inmune (GO:0006955) presente en el nivel 3 con un total de 84,01% de anotaciones. Para visualizar los datos del análisis funcional se utilizó la herramienta *DAG viewer*, también disponible en la plataforma de Babelomics. La intensidad de la coloración del gráfico es proporcional al número de genes (anotaciones) incluidos en cada uno de los grupos funcionales de la base de datos GO. Esta representación otorga a los grupos en el nivel inferior lo que considera el valor más elevado (1,0) y por tanto más específico funcionalmente hablando.

Con el objetivo de seleccionar genes de interés para su validación y establecer si hay una relación entre los pacientes HHT y una afectación de la respuesta inmune, nos centramos en genes que estuvieran presentes dentro del grupo Respuesta Inmune (GO:0006955). En la Figura 34 se muestra un diagrama de Venn con los genes reprimidos en las MNCs de los pacientes HHT implicados en la Respuesta Inmune y su conexión con otros dos grupos funcionales del mismo nivel con los que comparte más anotaciones; la Respuesta de Defensa (GO:0006952) y la Respuesta a estrés (GO:0006950).

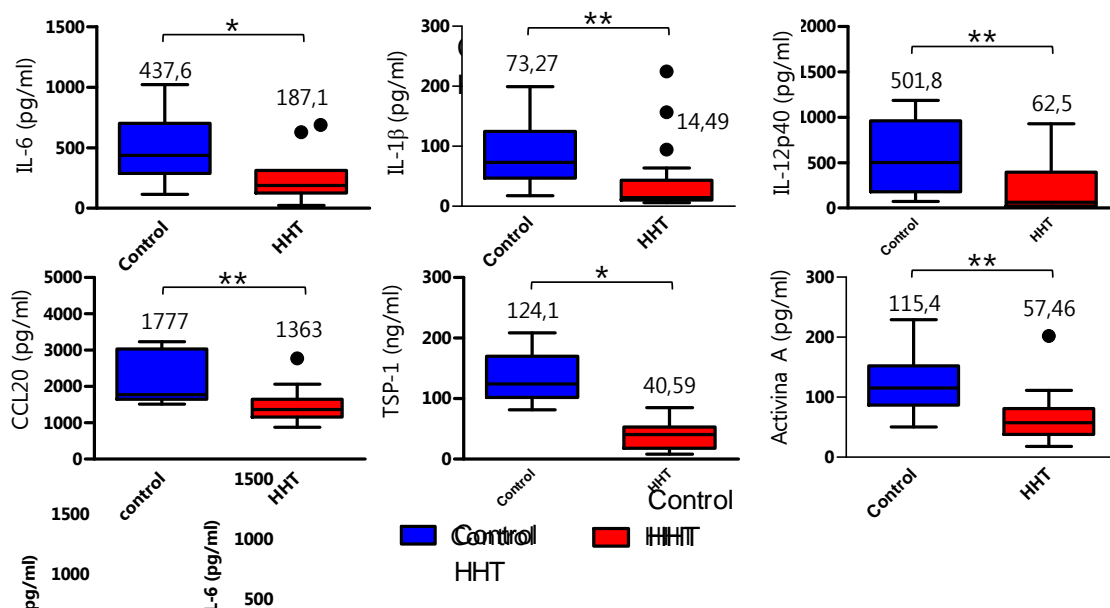


**Figura 34. Genes compartidos entre grupos GO afectados por la represión génica en MNCs de pacientes HHT.** Los genes compartidos de 3 grupos funcionales representativos del nivel 3 de Procesos Biológicos (GO) se muestran mediante un diagrama de Venn.

### 3.2 Validación de proteínas componentes de la Respuesta Inmune.

Con el fin de validar algunos genes resultantes del análisis de expresión génica diferencial, se seleccionaron componentes como citoquinas y quimioquinas que afectaban la Respuesta Inmune principalmente (Figura 34) entre otros grupos funcionales. También se incluyó el análisis de la producción de Activina A, que aunque no resultó como diferencialmente expresada, sí presenta un interés añadido puesto que interviene en la respuesta pro-inflamatoria (Sierra-Filardi *et al.*, 2011). Se analizaron los niveles de producción de citoquinas/quimioquinas y TSP-1 en el sobrenadante de cultivo de MNCs de donantes sanos y donantes HHT. Las células fueron cultivadas durante 48 horas en medio DMEM completo o suplementado con 10 ng/ml de LPS. Los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40, CCL20 y Activina A no pudieron analizarse en ausencia de LPS puesto que se encontraban por debajo del límite de detección del kit ELISA seleccionado, por lo que únicamente se validaron los niveles producidos por las células tras su estimulación con LPS. Sin embargo, los niveles de TSP-1 se detectaron tanto a nivel basal como tras la estimulación con LPS, siendo la respuesta equivalente en ambas condiciones. Tal como los *microarrays* predicen, los niveles de las interleuquinas seleccionadas (IL-6, IL-1 $\beta$ , IL12p40), CCL20 y TSP-1 están disminuidos en el sobrenadante de las MNCs de pacientes HHT en comparación con las células de donantes

sanos. De igual modo, se observa una deficiencia en la producción de Activina A tras la estimulación con LPS en las células de pacientes HHT.

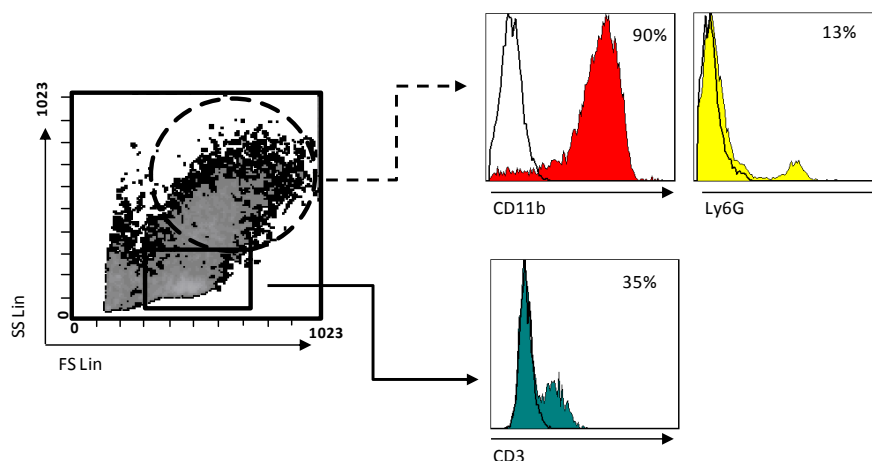


**Figura 35. Validación de proteínas componentes de la respuesta inmune en MNCs aisladas de pacientes HHT.** Un total de 500.000 MNCs de donantes sanos no-HHT (control) y pacientes HHT fueron cultivados en medio DMEM durante 48 horas con y sin LPS. Los valores en la condición de cultivo control no se muestran debido a que eran inferiores al límite de detección del kit de ELISA correspondiente, a excepción de TSP-1 dónde los niveles no variaban frente al tratamiento con LPS pero estaban dentro del límite de detección del Kit. A excepción de TSP-1, los valores mostrados son correspondientes a la producción de citoquinas/quimioquinas tras la estimulación con LPS. Las MNCs de los pacientes HHT producen menores niveles de citoquinas y quimioquinas que las células de donantes no-HHT.

#### 4 Expresión de endoglina en macrófagos de ratón.

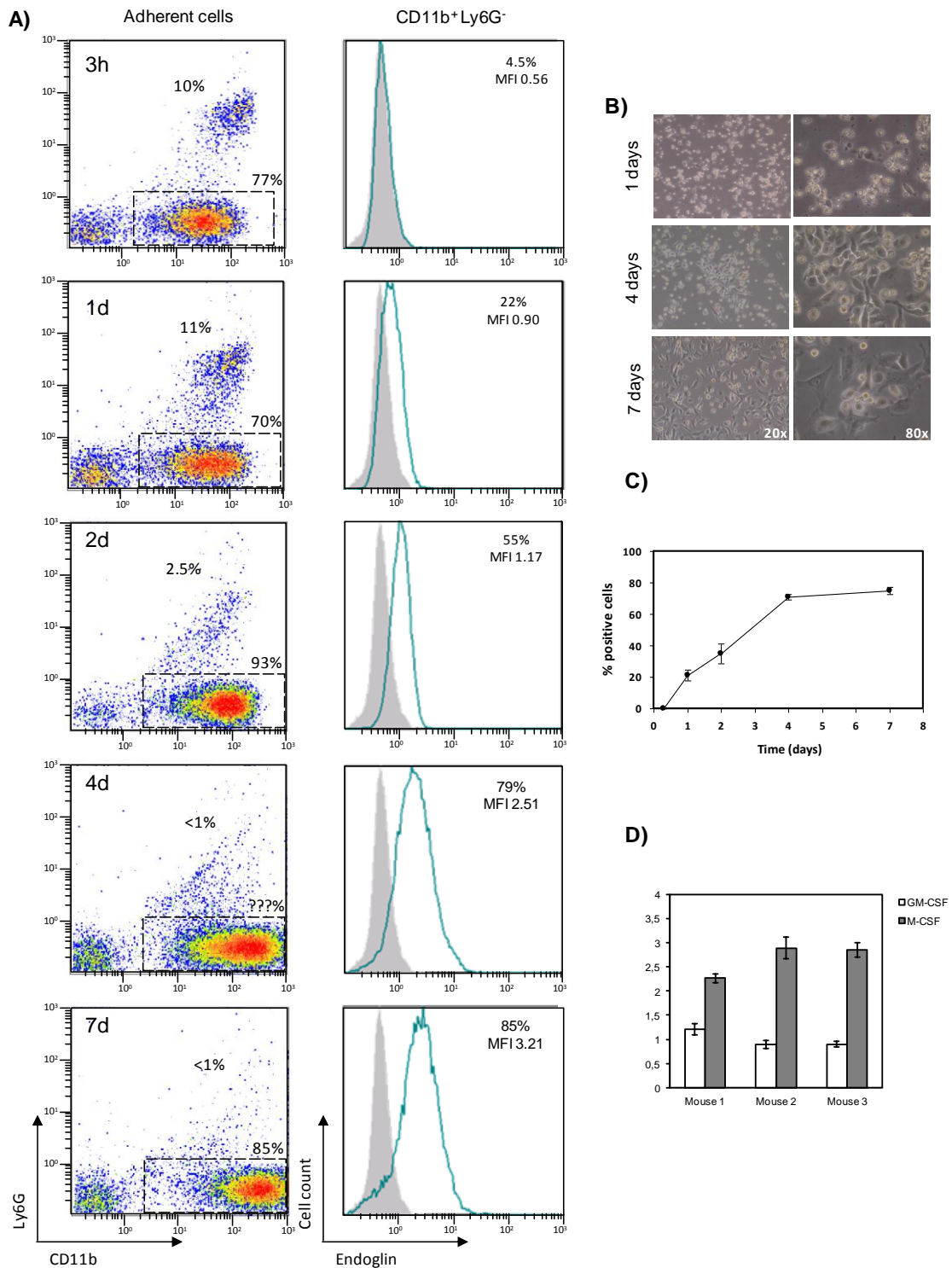
##### 4.1 Inducción de la expresión de endoglina durante la diferenciación *in vitro* de monocitos.

Con el fin de analizar la expresión de endoglina durante la transición monocito/macrófago de origen murino, realizamos un análisis mediante citometría de flujo de monocitos en cultivo de sangre periférica de ratones C57Bl/6. El análisis de las propiedades FS vs SS de los PBLs (*peripheral blood leukocytes*) marcados con un cóctel de anticuerpos dirigidos frente CD11b, Ly6G y CD3 nos permitió delimitar la ventana de interés dónde se localizan los monocitos (Figura 36). Monocitos y granulocitos se localizan en la misma ventana, siendo distinguibles entre ellos debido a la expresión diferencial de Ly6G: los monocitos son CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> y los granulocitos son CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>.



**Figura 36. Fenotipo de leucocitos de sangre periférica.** Los leucocitos de sangre periférica (PBLs) se aislaron tras el tratamiento de la sangre heparinizada con el tampón RBC. Las células se marcaron con un cóctel de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a los epitopos de ratón CD3, CD11b y Ly6G. El análisis por citometría de flujo de las propiedades FS vs SS de los PBLs en cultivo permitió la identificación de los monocitos como una población Ly6G<sup>neg</sup> CD11b<sup>alto</sup> CD3<sup>neg</sup>.

El análisis de la expresión de endoglina se realizó en muestras de PBLs en cultivo enriquecidas en monocitos mediante su selección por adherencia a placa. La expresión de endoglina en la superficie de los monocitos en cultivo se realizó a las 3h, 1, 2, 4 y 7 días. Las células fueron en esta ocasión incubadas con anticuerpos dirigidos frente a CD11b, Ly6G y endoglina. Tras 3 horas de incubación y dos lavados del cultivo podemos comprobar que la selección por adherencia es eficiente, siendo >75% de las células monocitos (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>) (Figura 37A). Los niveles de endoglina eran indetectables en los monocitos recién aislados, mientras que a partir de las 24 horas en adherencia, el 22% de las células eran positivas para la expresión de endoglina, mostrando una rápida inducción de la expresión de endoglina en las condiciones *in vitro* (Figura 37, C). La expresión de endoglina alcanza una meseta con expresión máxima detectada entre los 4 – 7 días de cultivo. El aumento en la expresión de CD11b visible tras 2 días en cultivo (Figura 37 A), está en concordancia con su aumento durante la diferenciación del monocito (Ammon *et al.*, 2000). Por otro lado, los macrófagos también se diferenciaron *in vitro* a partir de precursores de la MOR tratando las células con las citoquinas CM-CSF o M-CSF durante 7 días. Estas citoquinas inducen la diferenciación hacia dos fenotipos de macrófagos el fenotipo M1 y M2, respectivamente (Fleetwood *et al.*, 2009). La PCR cuantitativa a tiempo real muestra la expresión de endoglina en las muestras de M1/M2 de los 3 ratones analizados (Figura 37 D). Es remarcable, que los macrófagos M2 expresan niveles más altos del ARNm de *eng* que los observados en los M1.



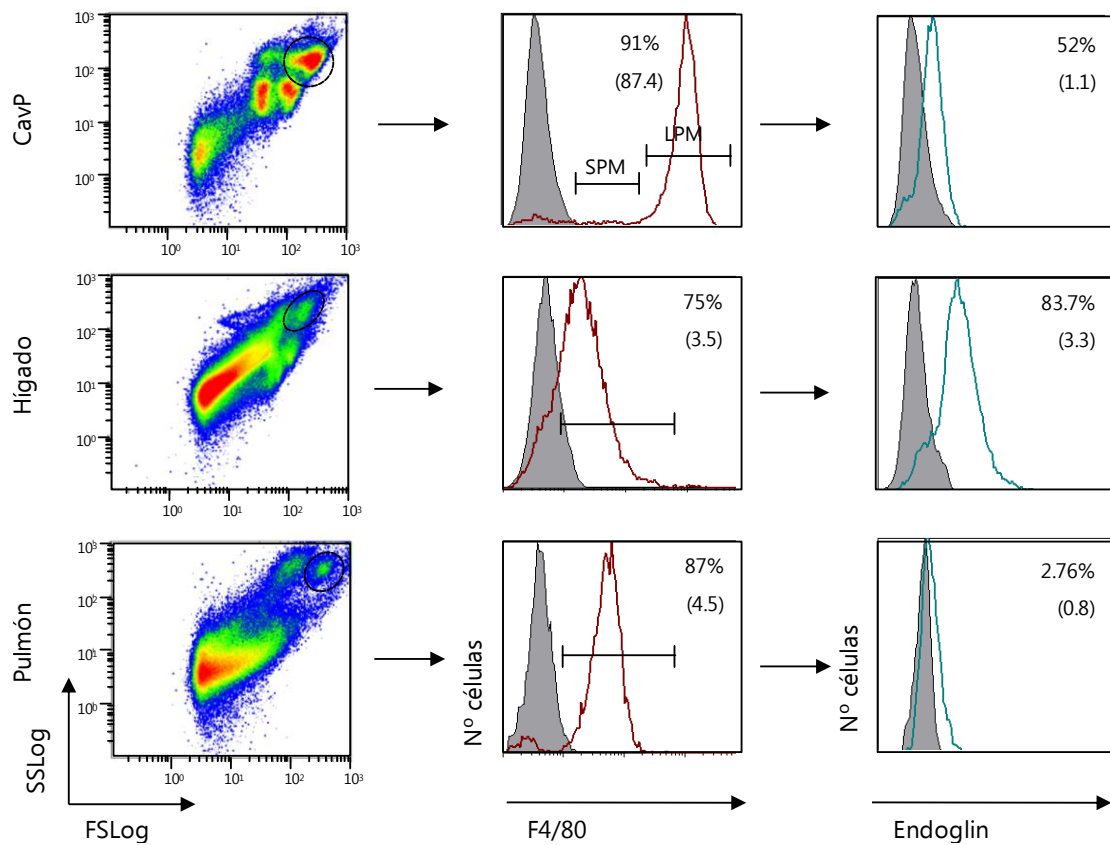
**Figura 37. Expresión de endoglina durante la transición monocito/macrófago.** (A) La expresión de endoglina se analiza en monocitos, definidos como Ly6G<sup>neg</sup>CD11b<sup>pos</sup>, que aparecen en los paneles de la izquierda delimitados por un rectángulo de línea discontinua. Los histogramas de citometría de flujo muestran la fluorescencia derivada de la expresión de endoglina en los monocitos en cultivo (CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>) y están representados por un perfil delimitado por una línea de color verde. Los perfiles coloreados en gris representan la fluorescencia registrada en el control negativo. En la parte superior de los histogramas se representa el % de células positivas para la expresión de endoglina y la intensidad de fluorescencia media (IFM) de la población. (B) Imagen de microscopia de contraste de fase de las células en cultivo tras 1, 4 y 7 días. (C) Inducción de la expresión de endoglina en monocitos de sangre periférica. Las medidas de endoglina están representadas por el porcentaje de células positivas en la población CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>. La mayor expresión de endoglina se alcanzó entre el 4º y 7º día en cultivo. (D) Expresión de los niveles de ARNm de *eng* en BMDMs tratados con GM-CSF o M-CSF de 3 ratones C57Bl6/J. Los niveles relativos de ARNm de

*eng* están normalizados frente al control de expresión endógeno *18S*. Las barras representan el valor promedio y la desviación estándar de cada triplicado. Ambos tipos de diferenciación *in vitro* mediante GM-CSF o M-CSF inducen la expresión de *eng*. \*\* $p < 0,01$ .

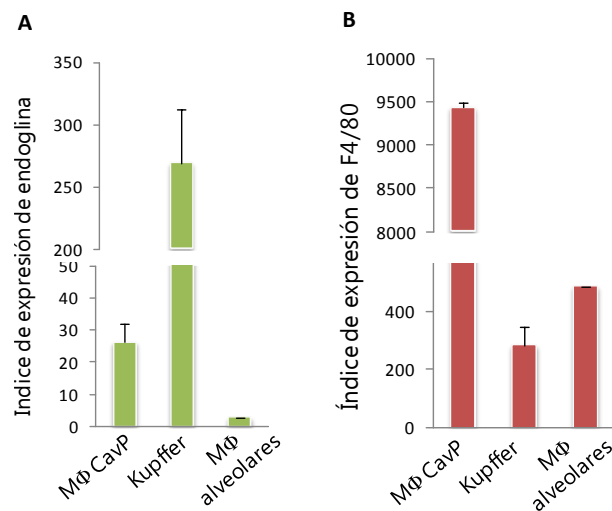
#### 4.2 Expresión de endoglina en macrófagos tisulares.

Para analizar los niveles de expresión de endoglina en macrófagos tisulares, en primer lugar se obtuvo una suspensión celular a partir del tejido hepático, de un lavado broncoalveolar (BALF) y de las células residentes en la cavidad peritoneal de los ratones C67Bl6/J. Los niveles de endoglina en superficie fueron analizados mediante citometría de flujo en la población de macrófagos tisulares definidos como F4/80<sup>pos</sup> Ly6G<sup>neg</sup> (Figura 38). Todos los macrófagos residentes de tejido son positivos para la expresión de endoglina de acuerdo al análisis de citometría de flujo. Los niveles de expresión de F4/80 (marcador de macrófagos) varían entre los diferentes macrófagos tisulares analizados. Además de esto, en la cavidad peritoneal, coexisten dos subpoblaciones de macrófagos (Ghosh *et al.*, 2010) definidos como *Small Peritoneal Macrophages* (SPMs) y *Large Peritoneal Macrophages* (LPMs) debido a sus diferencias en el tamaño, que además se distinguen entre sí por sus diferencias en los niveles de expresión del antígeno F4/80. Sin embargo, la presencia de SPM en la cepa C57Bl6/J en condiciones normales, donde el ratón no ha sido estimulado con agentes inflamatorios, es muy baja, representando <5% de los macrófagos presentes en la cavidad peritoneal. Como la expresión de endoglina en los macrófagos peritoneales se muestra en la totalidad de las células F4/80<sup>+</sup>, la contribución de los SPM es prácticamente despreciable. Cabe destacar la mayor expresión de F4/80 observada en los LPM en comparación con SPM, en las células de Kupffer y en los macrófagos alveolares, pero independientemente del grado de intensidad de la señal de F4/80, todos los macrófagos expresan endoglina. Por otro lado, se observan diferencias en los niveles de expresión de endoglina entre los diferentes macrófagos tisulares analizados, siendo las células de Kupffer las que expresan mayores niveles, los macrófagos peritoneales (principalmente representados por los LPM) un valor intermedio, y valores muy bajos en los macrófagos alveolares (Figura 38).





**Figura 38. Expresión de endoglina en macrófagos tisulares.** Los macrófagos residentes de tejido se aislaron de la cavidad peritoneal (CavP), el hígado y los alveolos pulmonares. Los macrófagos se seleccionaron según sus propiedades FS/SS y se identificaron como F4/80<sup>pos</sup> Ly6G<sup>neg</sup>. La intensidad de fluorescencia media (IFM) tanto de F4/80 como de endoglina se representa en la esquina superior derecha de cada uno de los histogramas entre paréntesis, así como el porcentaje de células positivas para cada antígeno. El control negativo se representa mediante un histograma coloreado en gris. En el histograma correspondiente a los niveles de F4/80 en la cavidad peritoneal, se indican las regiones dónde se localizarían los SPM y los LPM en base a los niveles de expresión de F4/80. En paralelo, los niveles de expresión de endoglina se analizaron en los macrófagos (F4/80<sup>pos</sup>) de cada una de las muestras. Se muestra un experimento representativo de tres con similares resultados.

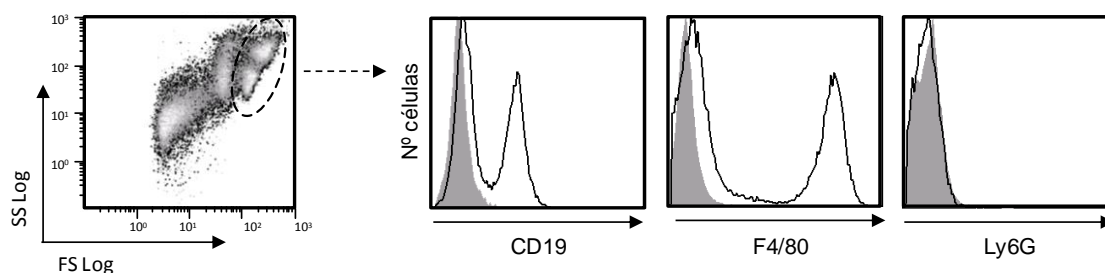


**Figura 39. Índice de expresión de endoglina y F4/80 en macrófagos tisulares.** Los MΦ aislaron de pulmón, hígado y cavidad peritoneal. (A) Niveles de endoglina en células F4/80<sup>pos</sup>. (B) Índice de expresión de F4/80. La población analizada se muestra en el panel FSLog/SSLog de la figura 38. El índice de expresión se define como el resultado de

multiplicar el porcentaje de células positivas por la IFM. Cada muestra se analizó por duplicado. Se muestra un experimento representativo de tres con similares resultados. \*\*\* $p < 0,001$

### 4.3 Diferenciación de monocitos reclutados a la cavidad peritoneal.

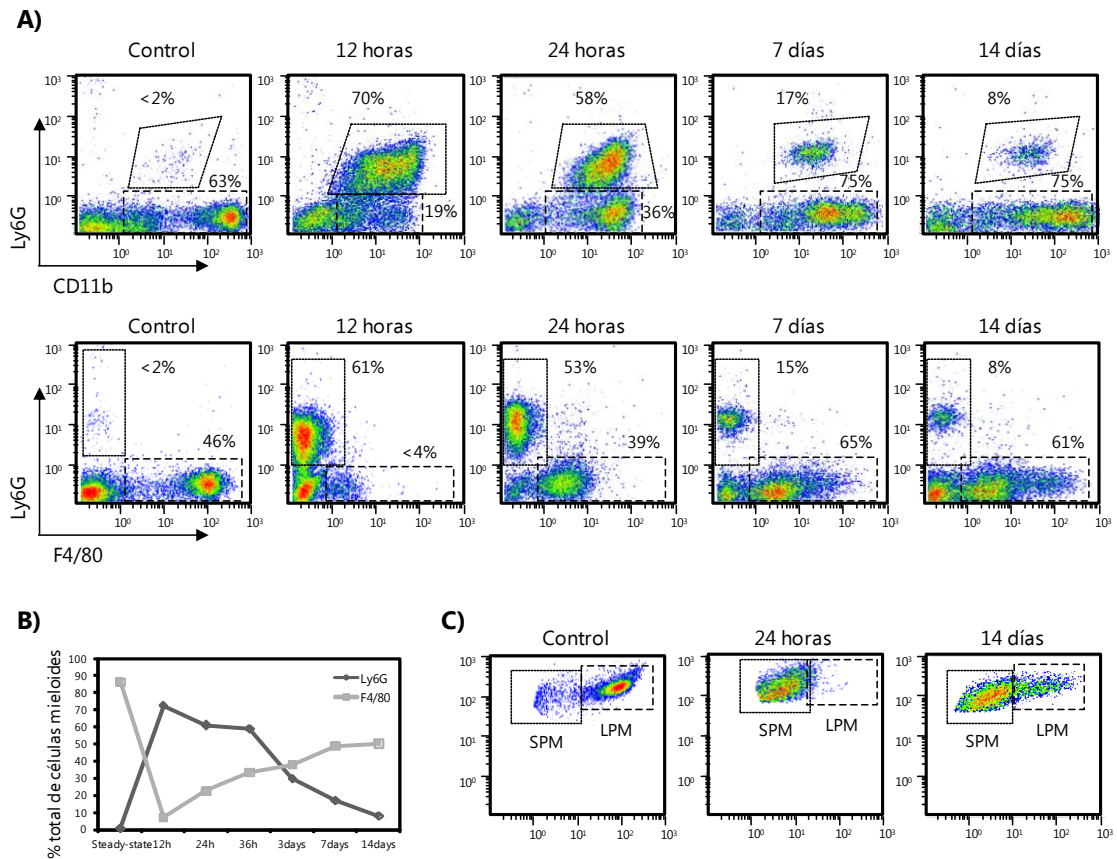
La cavidad peritoneal de los ratones C57Bl6/J en condiciones fisiológicas o de reposo, está compuesta mayoritariamente por macrófagos (45%) y células B (47%) (Cassado *et al.*, 2011; Figura 40).



**Figura 40. Fenotipo de las principales poblaciones de leucocitos en la cavidad peritoneal de ratones C57Bl6/J.** Las células de la cavidad peritoneal se seleccionaron en primer lugar según sus propiedades FS/SS Log mediante citometría de flujo. En condiciones de reposo, la cavidad peritoneal de la estirpe C57Bl6/J presenta una proporción aproximada de un 45% de macrófagos definidos como  $F4/80^+Ly6G^-CD11b^+$  y un 45% aproximadamente de linfocitos B definidos como  $CD19^+F4/80^-Ly6G^-$ . Los granulocitos son una población minoritaria representando entre un 3-5% de las células presentes en PerC. Los granulocitos se definen como  $Ly6G^+CD11b^-F4/80^-$ .

La inyección de Zymosan i.p. induce un fuerte reclutamiento de monocitos y granulocitos hacia la cavidad peritoneal. En el ensayo realizado, observamos una extravasación de dichas células inflamatorias características de una respuesta inflamatoria. Los neutrófilos ( $Ly6G^+F4/80^-CD11b^+$ ) son los primeros leucocitos reclutados a la cavidad peritoneal. Doce horas tras la inducción de la inflamación por Zymosan, se puede observar que los macrófagos residentes  $Ly6G^-F4/80^{alto}CD11b^+$  (LPM principalmente), han desaparecido, mientras se detecta una afluencia de monocitos ( $Ly6G^-F4/80^-CD11b^+$ ) en la cavidad peritoneal (Figura 41 A). A las 24 horas de la inyección de Zymosan se detecta una población nueva de células  $F4/80^+$ . Estas células son macrófagos diferenciados a partir de los monocitos que se han extravasado a la cavidad peritoneal y se conocen como SPM. Los SPM son fácilmente distinguibles de la mayoría de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, los LPM, ya que expresan menores niveles de F4/80. Cuando la fase de inflamación se va resolviendo, el porcentaje de granulocitos disminuye y los macrófagos inflamatorios aumentan sus niveles de F4/80 (Figura 41 A-B). El proceso inflamatorio completo *in vivo* se describe mediante la presencia de las diferentes poblaciones de leucocitos de acuerdo con los niveles de Ly6G, F4/80 y CD11b (Figura 41B), que muestra la evolución de las diferentes poblaciones en porcentajes. Una semana tras la inyección de Zymosan, se observa la aparición de una nueva población de

macrófagos con mayores niveles de expresión de F4/80 y que se define claramente tras 2 semanas de la inducción de la inflamación (Figura 41 A, C). Esta nueva población muestra las mismas propiedades SS vs F4/80 que los LPM presentes en la cavidad peritoneal en condiciones de reposo.

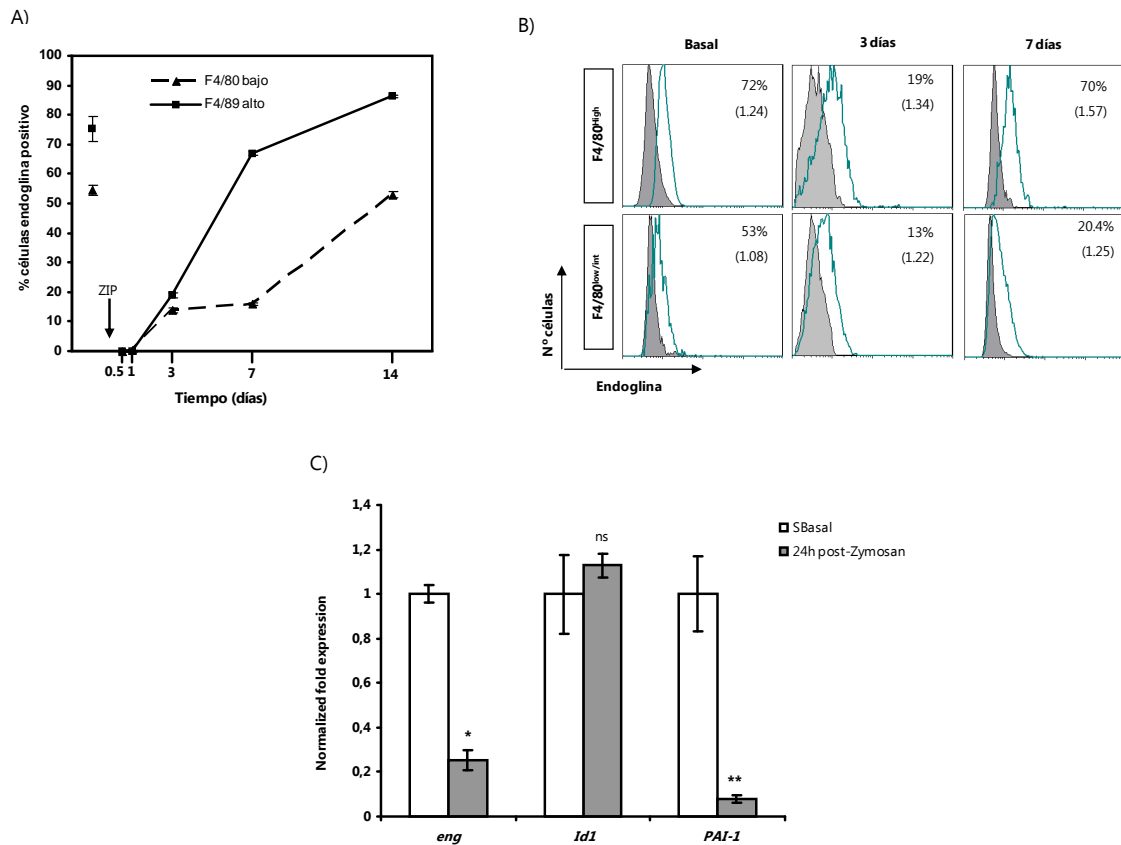


**Figura 41. Reemplazo de macrófagos residentes de la cavidad peritoneal por monocitos circulantes.** Las poblaciones mieloides durante un proceso inflamatorio, se analizaron por citometría de flujo las células presentes en la cavidad peritoneal antes y tras una peritonitis inducida por la inyección de Zymosan. **(A)** Fenotipado de las células mieloides a lo largo del proceso de inducción de la peritonitis. Las células se analizaron según la intensidad de fluorescencia de los marcajes de Ly6G vs CD11b o bien Ly6G vs F4/80. El grupo Mo/MΦ se identifica como Ly6G<sup>neg</sup> CD11b<sup>pos</sup> (resaltado en el panel con una línea discontinua), los granulocitos se definen como Ly6G<sup>bajo</sup> CD11b<sup>alto</sup> o Ly6G<sup>bajo</sup> F4/80<sup>neg</sup> (delimitado por una región con línea de puntos) y los macrófagos diferenciados están representados en los paneles inferiores y definidos como Ly6G<sup>neg</sup> F4/80<sup>pos</sup> (delimitados por una región de línea discontinua). Los animales sin estimular se utilizaron como la condición control o el tiempo 0. El porcentaje de granulocitos y MΦ está indicado en cada panel. Se muestra un experimento representativo de 3 con similares resultados **(B)** Infiltrado de células mieloides durante la peritonitis. Flujo de granulocitos y macrófagos hacia la cavidad peritoneal registrado durante una peritonitis mediada por Zymosan. El gráfico muestra el porcentaje de macrófagos y granulocitos recuperados tras la inyección i.p. de Zymosan a los tiempos indicados. Los valores representan la media ± SEM; N=3 **(C)** Discriminación entre los diferentes subtipos de MΦ en la cavidad peritoneal. Los SPM están definidos como F4/80<sup>bajo</sup> y los LPM como F4/80<sup>alto</sup>. La discriminación entre SPM y LPM se realiza analizando sus propiedades Log SS frente la señal de F4/80. Para cada condición se ha utilizado un pool de células procedente de 3 ratones. Se presenta un experimento representativo de 3 con similares resultados.

#### 4.3.1 Inducción de la expresión de endoglina durante la transición *in vivo* monocito/macrófago.

En paralelo al estudio de las poblaciones mieloides extravasadas a la cavidad peritoneal durante una peritonitis inducida por Zymosan, también se analizaron los niveles de expresión de endoglina en las dos subpoblaciones de macrófagos características de PerC (Figura 42). Los macrófagos fueron clasificados según sus niveles de expresión de F4/80 como se describe en la figura R13. Durante los primeros pasos de diferenciación del Mo a MΦ, la expresión de endoglina en la superficie de los SPM es indetectable (Figura 42 A). Tres días tras la inyección de Zymosan, es cuando se puede detectar claramente en los SPM y en una pequeña población de LPM visible en el panel (Figura 42 A-B). Transcurridas 2 semanas tras la inducción de la peritonitis mediante la administración de Zymosan, podemos comprobar que tanto los SPM como los LPM expresan los niveles de endoglina que se registraban en la situación de partida o control (ratones sin estimular). Los datos de citometría de flujo están respaldados por la detección del ARNm de *eng* en la condición basal, donde la población predominante de macrófagos es mayoritariamente LPM, y los niveles de expresión de *eng* registrados a las 24h tras la inyección de Zymosan dónde la mayoría de macrófagos son SPM (Figura 42 C). Los niveles de expresión del ARNm de *endoglina* en la población SPM recién diferenciada a partir de los Mo que han extravasado del torrente circulatorio es llamativamente inferior a los niveles que se detectan en los LPM que se recogen en la condición basal.

Debido al papel regulador de endoglina en la señalización de TGF-β1 en otros tipos celulares, se analizaron los niveles de expresión de *Id1* y *Pai-1*, dos genes diana dependientes de la señalización de TGF-β1. El *Id1* se expresa en ambas poblaciones, mientras que la expresión de *Pai1* es más elevada en los LPM que en los SPM (24h tras la peritonitis) donde la expresión de endoglina en membrana es aún indetectable.



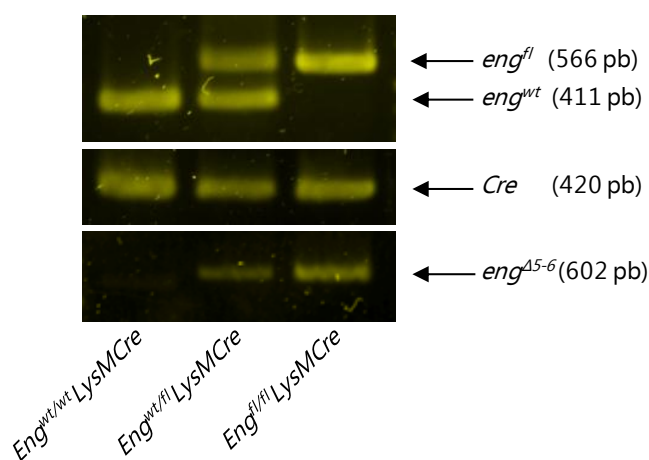
**Figura 42. Expresión *in vivo* de endoglina durante la diferenciación de Mo/MΦ.** (A) La expresión de endoglina se analizó en los MΦ de la cavidad peritoneal durante la inducción de una peritonitis por inyección de Zymosan. Las células residentes se obtuvieron de animales no inyectados, lo que denominamos como condición basal. Endoglina se detecta por primera vez transcurridos 3 días de la inyección de Zymosan y el porcentaje de macrófagos positivos para la expresión de endoglina continúa aumentando durante la evolución y resolución del proceso inflamatorio. Tras 2 semanas de la inducción de la peritonitis, los niveles de expresión de endoglina en los SPM y LPM son similares a los presentados en la condición basal. (B) Expresión de endoglina en las células F4/80<sup>pos</sup>. Los histogramas en gris representan la fluorescencia registrada por el isotipo control y los histogramas representados por un perfil en línea verde muestran los valores de expresión de endoglina en los macrófagos durante el proceso de inflamación *in vivo*. Los dos subtipos de macrófagos peritoneales (SPM o LPM), están indicados. La IFM y el porcentaje de macrófagos positivos para la expresión de endoglina están indicados en la esquina superior derecha de cada panel. (C) PCR a tiempo real de *eng*, *Id1* y *Pai1* en LPM y SPM (24h post-Zymosan) relativo a los niveles de expresión del ARNm del *18s*. Los niveles de expresión en los LPM se consideran los niveles control. Las barras indican el valor promedio y la desviación estándar de cada uno de los triplicados. Se muestra un experimento representativo de un total de 3 experimentos. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; ns = no significativo.

## 5 Generación de un modelo *knock-out* de endoglina en linaje mieloide.

### 5.1 Establecimiento de las líneas experimentales y su identificación mediante genotipado por PCR.

Tras cruzar 3 individuos portadores del gen que codifica endoglina con los exones 5 – 6 flanqueados por secuencias flox (*Eng<sup>fl/fl</sup>*) con 3 individuos portadores de la recombinasa Cre bajo control del lisozima (*LysMCre*), en la F1 obtuvimos los primeros individuos *Eng<sup>wt/fl</sup>LysMCre*

(Figura 25), con un desarrollo embrionario, fertilidad y aspecto normales. Tras identificar los individuos  $Eng^{wt/fl}LysMCre^+$  mediante PCR, estos se entrecruzaron entre ellos durante 10 generaciones para finalmente obtener los tres genotipos de ratones experimentales: ratones control ( $eng^{wt/wt}LysMCre$ ), heterocigotos o haploinsuficientes en endoglina ( $eng^{wt/fl}LysMCre$ ) y los homocigotos para la deficiencia de endoglina en macrófagos ( $eng^{fl/fl}LysMCre$ ). Las tres líneas son fértiles, presentando una descendencia sin alteraciones. Los ratones fueron genotipados mediante una PCR múltiple a partir del ADN aislado de la cola. Los 3 alelos  $eng$  identificados y la amplificación del fragmento de la recombinasa Cre se muestran en la (Figura 43).

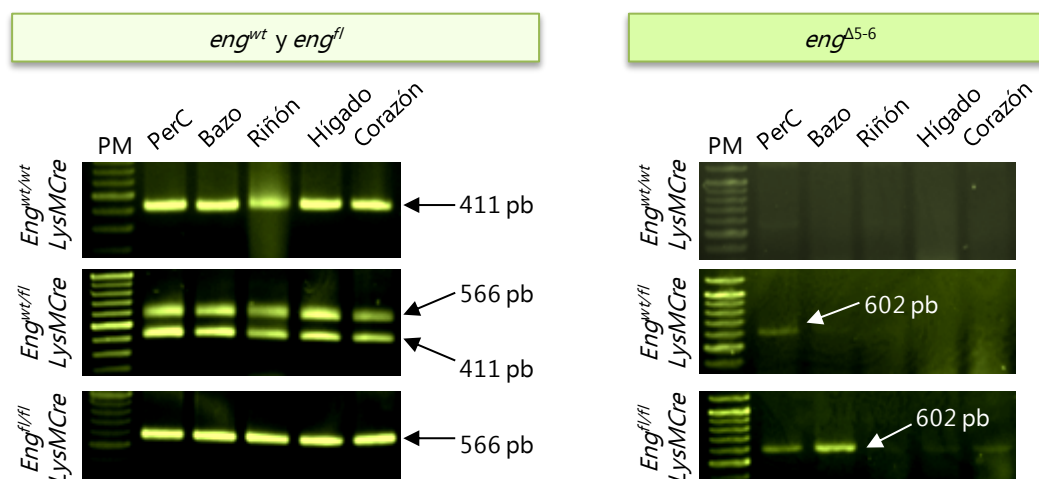


**Figura 43. Identificación de los genotipos de ratones experimentales mediante genotipado por PCR.** La amplificación por PCR de ADN genómico se realizó a partir del ADN aislado del tejido de cola. El producto de amplificación del alelo de  $eng$  floxeado ( $eng^{fl}$ ) presenta un tamaño de 566 pb, siendo fácilmente distinguible del alelo *wild-type* ( $eng^{wt}$ ) que da lugar a un producto de amplificación de 411 pb. Todos los individuos son portadores de la recombinasa  $LysMCre$ , cuya amplificación da lugar a un fragmento de 420 pb. El alelo de  $eng$  que presenta la escisión de los exones 5 a 6 ( $eng^{\Delta 5-6}$ ) por acción de la recombinasa Cre, se identifica mediante una amplificación por PCR que da lugar a un fragmento de 602 pb. El alelo  $eng^{\Delta 5-6}$  se identifica únicamente en los ratones portadores del alelo  $eng^{fl}$ .

## 5.2 Eficiencia de acción de la recombinasa Cre.

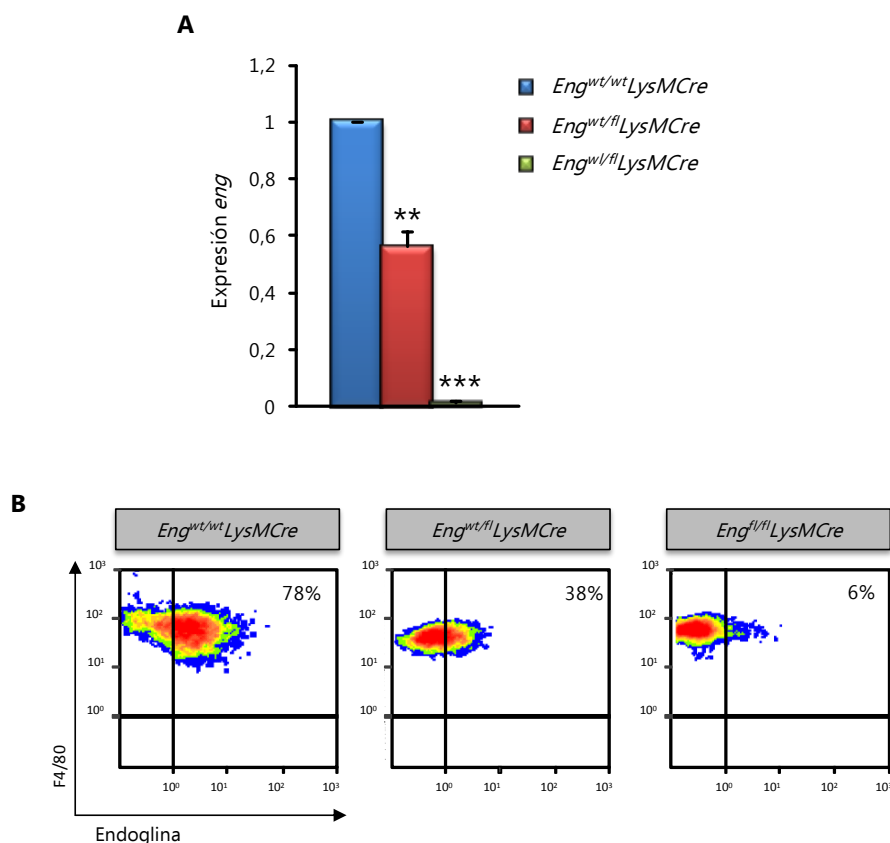
Uno de los primeros pasos a realizar tras el establecimiento de las líneas experimentales era comprobar la eficiencia de acción de la recombinasa Cre. La recombinasa Cre se encuentra bajo control del promotor de Lisozima 2 ( $Lyz2$ ) específico del linaje mielóide y que se expresa en monocitos, macrófagos y neutrófilos. Debido a que los macrófagos están presentes en tejidos y fluidos corporales como la cavidad peritoneal, aislamos el ADN genómico de bazo, riñón, hígado, corazón y las células presentes en la cavidad peritoneal. En todas las muestras detectamos los alelos correspondientes al genotipo experimental:  $eng^{wt}$  en ratones control y heterocigotos; y  $eng^{fl}$  en ratones *KO* y heterocigotos (Figura 44). Siendo todos ellos portadores de la recombinasa Cre. Si bien el objetivo era detectar mediante PCR el alelo resultante de la escisión de los exones 5 – 6 de endoglina ( $eng^{\Delta 5-6}$ ) en diferentes muestras. Como cabía esperar,

en ninguna muestra de tejido de los ratones  $Eng^{wt/wt}LysMCre$  se detectó la presencia del alelo  $eng^{\Delta5-6}$ . En los ratones  $Eng^{wt/fl}LysMCre$  detectamos una banda en la muestra que provenía de la cavidad peritoneal, siendo esta mucho más intensa en la muestra de ratones  $Eng^{fl/fl}LysMCre$ , e identificándose el producto de amplificación también en bazo y corazón.



**Figura 44. Acción de la recombinasa Cre: detección del alelo  $eng^{\Delta5-6}$  en diferentes tejidos.** Acción de la recombinasa LysMCre en diferentes tejidos y macrófagos peritoneales. En la figura se muestra el análisis mediante PCR de la presencia del transgen Cre y de los diferentes alelos de endoglina;  $eng^{wt}$ ,  $eng^{fl}$  y  $eng^{\Delta5-6}$ . La amplificación por PCR se realizó a partir del ADN genómico aislado de diferentes tejidos. El tamaño del fragmento de amplificación esperado está indicado en la figura. PerC= cavidad peritoneal.

Los niveles de expresión de  $eng$  fueron analizados mediante PCR cuantitativa a tiempo real en cultivos de macrófagos peritoneales (selección por adherencia a placa) de los diferentes genotipos. La acción de la recombinasa Cre en el ratón  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  es de gran eficacia, siendo prácticamente indetectables los niveles de expresión de endoglina y observándose una expresión cercana al 50% en los ratones  $Eng^{wt/fl}LysMCre$  si sus niveles se comparaban con aquellos registrados en la línea control ( $Eng^{wt/wt}LysMCre$ ) (Figura 45 A). Finalmente, el análisis mediante citometría de flujo de la expresión de endoglina en macrófagos peritoneales, demuestra que la eficiencia de acción de la recombinasa, a nivel de expresión de endoglina en membrana es cercana al 95% en los ratones  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  (Figura 45 B).



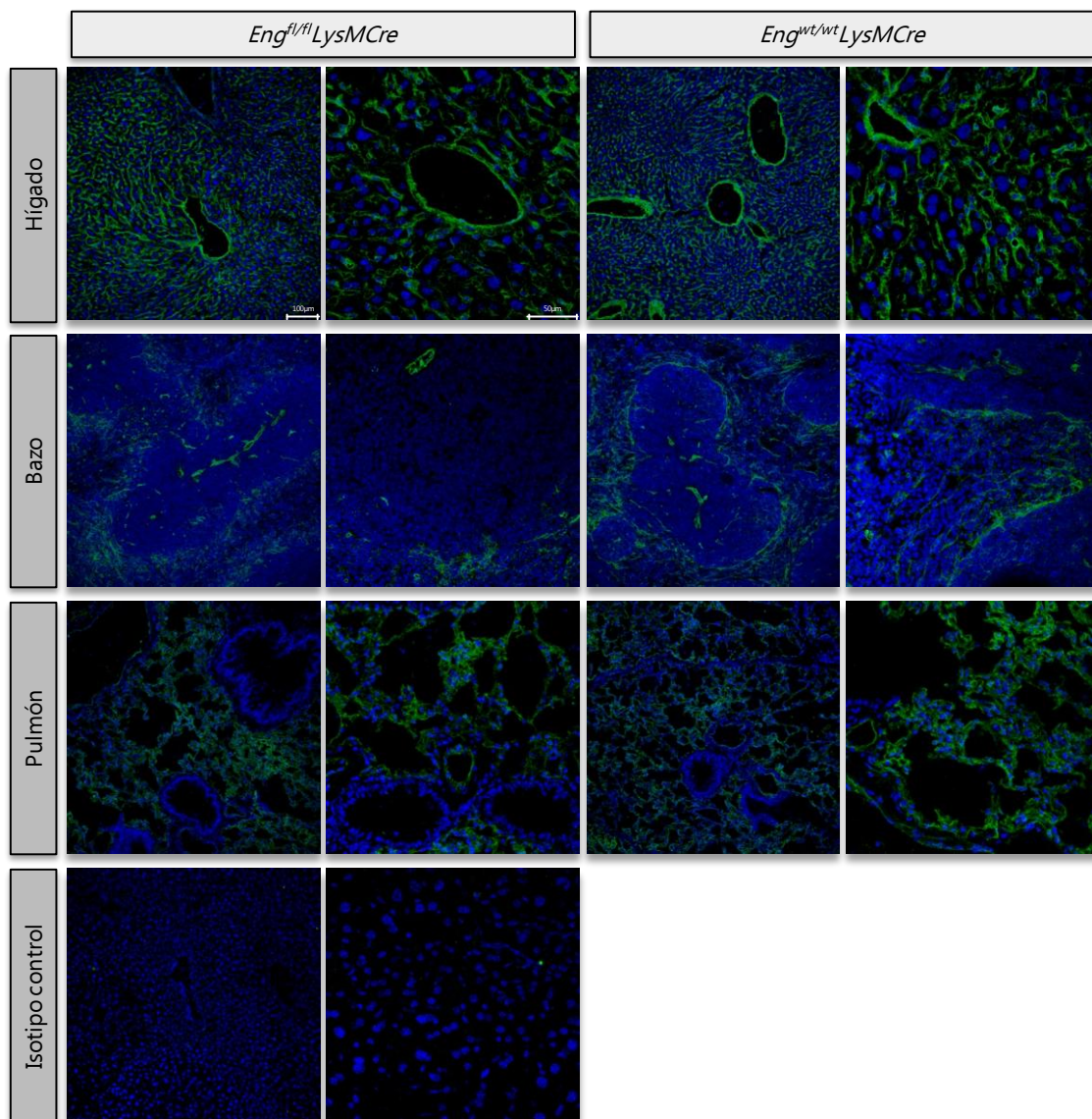
**Figura 45. Eficiencia de acción de la recombinasa Cre en macrófagos peritoneales. (A)** PCR cuantitativa a tiempo real de *eng* en macrófagos de la cavidad peritoneal. El gen *18s* fue utilizado como control endógeno de la expresión génica. Los datos están normalizados frente a la expresión del ARNm en los ratones control  $Eng^{wt/wt}LysMCre$ . Los datos se presentan como la media  $\pm$  SEM y son el resultado de 5 experimentos independientes (N=5) con triplicados por réplica. Las diferencias son estadísticamente significativas respecto a los respectivos controles. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  **(B)** Niveles de expresión de endoglina en la superficie de macrófagos peritoneales. Los paneles de citometría de flujo muestran el porcentaje de células que expresan endoglina en la población de macrófagos, identificados como  $F4/80^+$  en los ratones  $Eng^{wt/wt}LysMCre$ ,  $Eng^{wt/fl}LysMCre$  y  $Eng^{fl/fl}LysMCre$ . El marcaje se realizó en 3 ocasiones y se muestra el panel más representativo.

### 5.3 Especificidad de acción de la recombinasa Cre.

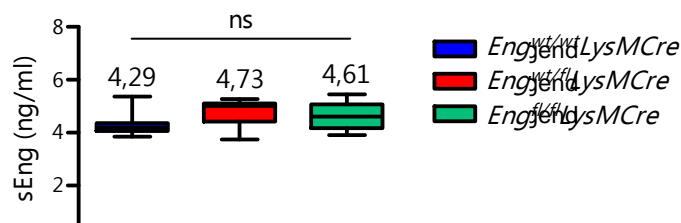
La recombinasa Cre se expresa bajo control del promotor de *Lyz2* que en principio es específico de linaje mieloide comprendiendo a monocitos, macrófagos y granulocitos. Para verificar dicha especificidad, comprobamos los niveles de expresión de endoglina en endotelio mediante inmunohistofluorescencia. Para ello se seleccionaron hígado, bazo y pulmón de ratones control y ratones deficientes en endoglina en el macrófago. En los cortes de hígado podemos observar que la expresión de endoglina se mantiene íntegra en los vasos y sinusoides hepáticos (Figura 46) en los ratones  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  en comparación con los ratones control. De igual modo, el patrón de marcaje de endoglina es idéntico entre ambas líneas en los cortes de bazo, localizándose preferentemente en los vasos centrales del centro germinal y en los vasos que se encuentran en el margen de la zona marginal, y en el parénquima de pulmón, un tejido altamente vascularizado.



Los niveles de sEng en un individuo sano son proporcionales a los niveles de expresión de endoglina en membrana como hemos comprobado en apartados anteriores de la sección de resultados dónde los pacientes HHT1 presentaban menores niveles de endoglina que la población control no HHT. Es por ello que los niveles de sEng circulantes fueron analizados en los sueros de las tres líneas experimentales. El valor promedio de sEng fue 4,29, 4,73 y 4,21 para  $Eng^{wt/wt}LysMCre$ ,  $Eng^{wt/fl}LysMCre$  y  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  respectivamente (Figura 47). Las diferencias observadas no son estadísticamente significativas por lo que no habría diferencias en la expresión de endoglina a nivel de vasculatura general.



**Figura 46. Expresión de endoglina en órganos internos.** La especificidad de acción de la recombinasa Cre al linaje mieloide se comprobó mediante la evaluación de la expresión de endoglina en la vasculatura de órganos internos como hígado, bazo y pulmón. La expresión de endoglina se detecta en vasos hepáticos y sinusoides hepáticos, en los vasos presentes en el centro germinal y la zona marginal del bazo, y en el parénquima pulmonar de ambas líneas. En azul están marcados los núcleos (Dapi) y la fluorescencia verde se corresponde al marcaje de endoglina.



**Figura 47. Niveles de sEng en suero de ratones  $Eng^{wt/wt}LysMCre$ ,  $Eng^{wt/fl}LysMCre$  y  $Eng^{fl/fl}LysMCre$ .** Representación *box-plot* de los niveles de sEng resultantes en el suero aislado de los ratones  $Eng^{wt/wt}LysMCre$  (n=14),  $Eng^{wt/fl}LysMCre$  (n=7) y  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  (n=14). Los límites de las cajas representan el percentil 10-90 y las líneas exteriores el percentil 5-95. La línea horizontal presente en cada una de las cajas representa la mediana, cuyo valor está indicado sobre la distribución de valores para cada grupo. Las diferencias no son estadísticamente significativas (ns).

#### 5.4 Análisis hematológico

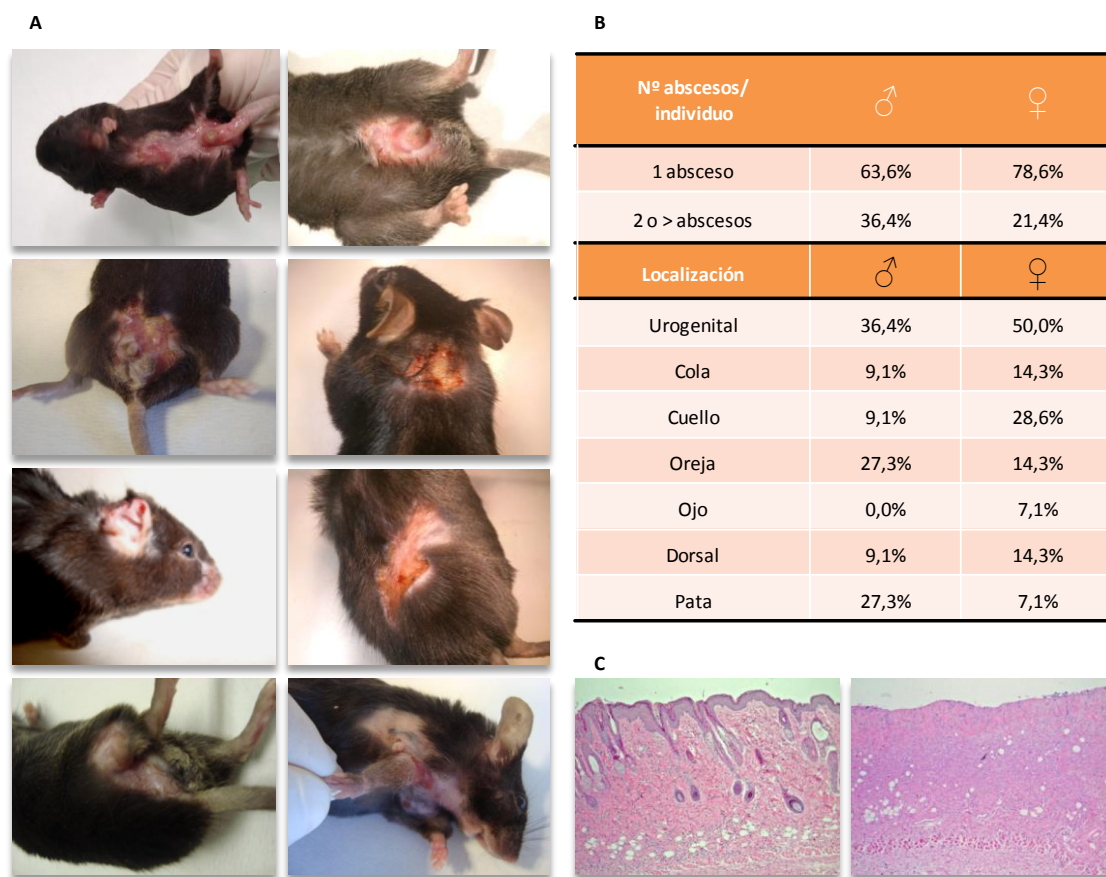
El análisis hematológico no reveló diferencias entre la población de ratones control y ratones deficientes en endoglina en el macrófago. El recuento de las subpoblaciones de leucocitos para ambas líneas se encuentra dentro de la normalidad. El número de plaquetas en el ratón control es ligeramente superior al rango de referencia, estando dentro de la normalidad para los ratones deficientes en endoglina.

| Parámetro                              | $Eng^{wt/wt}LysMCre$<br>(n = 5) | $Eng^{fl/fl}LysMCre$<br>(n = 7) | Rango de normalidad |
|----------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Leucocitos totales ( $\times 10^9/l$ ) | $5,67 \pm 0,20$                 | $5,37 \pm 0,13$                 | [6 – 15]            |
| Linfocitos, ( $\times 10^9/l$ )        | $4,50 \pm 0,17$                 | $4,08 \pm 0,12$                 | [3.4 – 7.44]        |
| Monocitos, ( $\times 10^9/l$ )         | $0,35 \pm 0,03$                 | $0,34 \pm 0,04$                 | [0.0 – 0.6]         |
| Granulocitos ( $\times 10^9/l$ )       | $0,82 \pm 0,09$                 | $0,78 \pm 0,03$                 | [0.5 – 3.8]         |
| Eritrocitos, ( $\times 10^{12}/l$ )    | $9,16 \pm 0,10$                 | $9,36 \pm 0,02$                 | [7 – 12]            |
| Hemoglobina, g/l                       | $142,40 \pm 2,40$               | $148,95 \pm 0,29$               | [122 – 162]         |
| Hematocrito %                          | $38,88 \pm 0,40$                | $40,86 \pm 0,09$                | [35 – 45]           |
| Plaquetas ( $\times 10^9/l$ )          | $408,76 \pm 11,55$              | $460,34 \pm 4,04$               | [200 – 450]         |

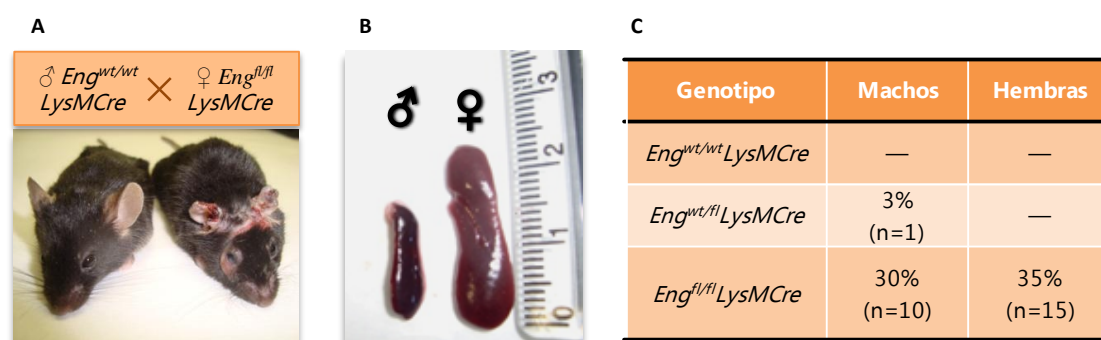
**Tabla 17. Análisis hematológico de los ratones  $Eng^{wt/wt}LyzCre$  y  $Eng^{fl/fl}LyzCre$ .** Los valores se muestran como el valor promedio  $\pm$  SEM (*n* indica el número de ratones por cada grupo). Los rangos de referencia para cada parámetro se muestran en la columna de la derecha.

### 5.5 Los ratones deficientes en endoglina en el macrófago desarrollan infecciones espontáneas.

Todos los ratones experimentales son fértiles y con un desarrollo embrionario normal. En general presentan un aspecto sano, pero en determinados individuos se observó la aparición de infecciones espontáneas en tejidos blandos como piel y mucosas en ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* que no tenían una buena evolución: se observaba la aparición de abscesos y rápidamente se extendía la superficie de la zona afectada (Figura 48). Mayoritariamente los individuos afectados presentaban 1 absceso que podría localizarse en diferentes zonas del cuerpo, siendo la más habitual la zona del abdomen cercana a los genitales pudiendo afectar a cola y patas traseras, seguida de la zona del cuello pudiendo afectar a ojos y orejas. Todos los animales estaban estabulados en la misma habitación y bajo las mismas condiciones. Las infecciones se presentaban mayoritariamente en ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* reproductores de ambos sexos (Figura 48 B), habiéndose identificado en menor medida en ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* que cohabitaban con sus hermanos de camada. Dentro de las parejas reproductoras, aquellas dónde ambos individuos eran deficientes para la expresión de endoglina en macrófago, se podía observar que la infección podía transmitirse al *partner*, si bien esto no sucedía cuando la pareja del individuo afecto era un ratón control (*Eng<sup>wt/wt</sup>LysMCre*). En la Figura 49 observamos una pareja destinada a la producción de ratones *Eng<sup>wt/fl</sup>LysMCre* dónde la hembra *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* presenta una infección alrededor de las orejas que afecta al ojo derecho y el macho (*Eng<sup>wt/wt</sup>LysMCre*) permanece imparable. Estas diferencias iban acompañadas de una divergencia en el tamaño del bazo, dónde podemos observar que la hembra presentaba esplenomegalia.



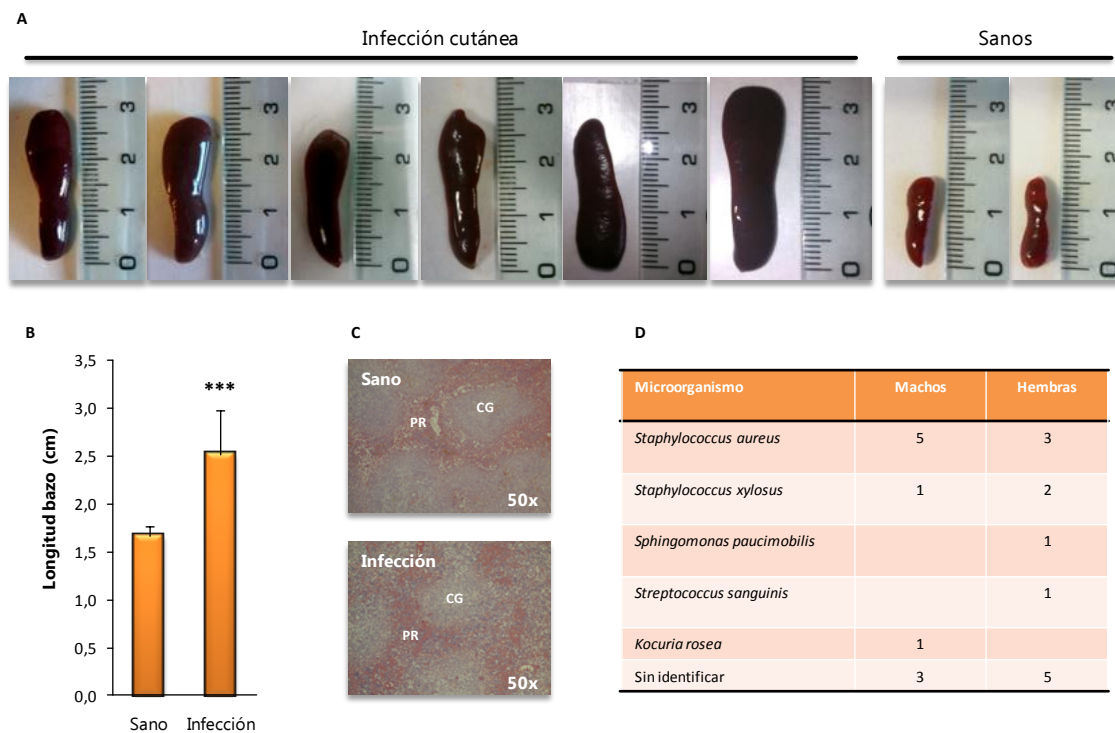
**Figura 48. Frecuencia de abscesos y localización de las infecciones.** (A) En la figura se muestran algunas de las infecciones cutáneas que se detectaron en ratones  $Eng^{f/f}LysMCre$ . (B) En la tabla se muestra el porcentaje de individuos que presentaba un único absceso o bien más de dos, y el sexo de los individuos afectados. También se muestra la frecuencia de localización en el cuerpo, siendo la mayoritaria la zona urogenital para ambos sexos. (C) Tinción por hematoxilina-eosina de zona de la piel sana (izquierda) donde se observa una normal estratificación de la epidermis y la dermis; y zona de tejido afectada por una infección (derecha), donde puede observarse la pérdida de la epidermis.



**Figura 49. Incidencia de infecciones en ratones reproductores.** (A) Pareja de ratones donde se puede observar que la hembra  $Eng^{f/f}LysMCre$  presenta una infección en la zona de las orejas que afecta al ojo derecho, mientras que el macho  $Eng^{wt/wt}LysMCre$  no presenta ningún absceso o herida. La necropsia reveló que la hembra presentaba una esplenomegalia. (B) Frecuencia de infecciones en individuos reproductores. Mayoritariamente las infecciones aparecen en individuos reproductores, siendo principalmente la cepa  $Eng^{f/f}LysMCre$  la más afectada. En la tabla se muestra el porcentaje de individuos reproductores que desarrollaron infecciones durante el periodo 2011-2014.

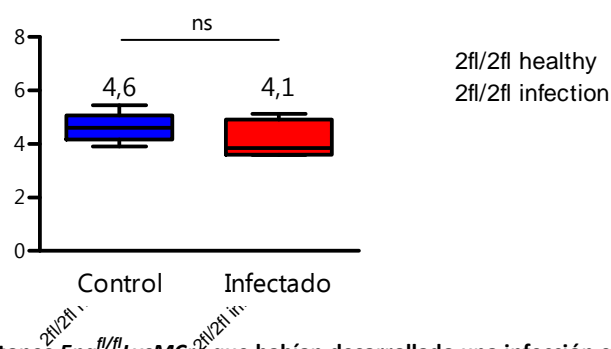
A todos los ratones en los que se detectó una infección, se procedió con el aislamiento de una porción de tejido para su análisis microbiológico y se les realizó una necropsia. En la

necropsia, el aspecto de los órganos no mostraba ninguna alteración, a excepción de la observación de algún ganglio linfático inflamado y que en más del 95% de los individuos se observó una esplenomegalia, considerando como tal que la longitud del bazo no fuera inferior a 2 cm (Figura 50 A-B). La tinción por hematoxilina-eosina de los bazos de ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* con infección no reveló ninguna diferencia histológica con los bazos de ratones que presentaban un aspecto sano (Figura 50 C). En el análisis microbiológico de los tejidos afectados se aislaron diversos microorganismos patógenos oportunistas como *Staphylococcus aureus*, *S. xylosus* o *Sphingomonas paucimobilis*, siendo el *S. aureus* predominante (Figura 50 D).



**Figura 50. Longitud del bazo y microorganismos identificados. (A)** Bazos extraídos tras realizar la necropsia a individuos que presentaban una infección. En las imágenes se muestra la longitud del bazo. Como bazos control se muestran dos imágenes de bazo de ratón *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* que presentaban un aspecto sano. **(B)** Promedio de la longitud del bazo en ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* sanos (n=10) y en aquellos que desarrollaron una infección espontánea (n=22). \*\*\* $p < 0,001$ . **(C)** Tinción de hematoxilina-eosina en bazo de ratón *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* sano e infectado. CG: centro germinal; PR: Pulpa roja **(D)** Microorganismos identificados en las muestras de piel afectadas por una infección mediante las tiras de detección bioquímica API®strips.

Un aumento de los niveles de sEng circulantes ha sido vinculado a determinadas enfermedades infecciosas (Dietmann *et al.*, 2009; Conroy *et al.*, 2015), es por ello que los niveles de sEng en suero se evaluaron en los ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* que habían cursado con una infección (n=7) y como control se evaluaron los niveles presentes en el suero de ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* que presentaban un aspecto sano (n=14) (Figura 51). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.



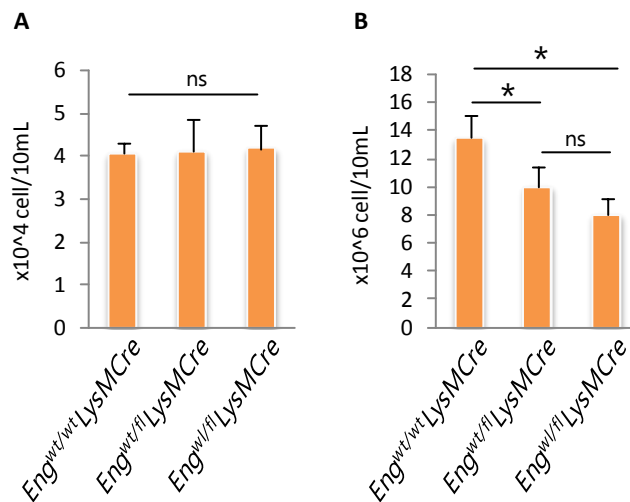
**Figura 51. Niveles de sEng en suero de ratones  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  que habían desarrollado una infección espontánea.** Los niveles de sEng fueron evaluados en el suero de ratones  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  sanos (n=14) y en aquellos que habían presentado infecciones espontáneas (n=7). Las cajas representan el percentil 10 – 90 y las líneas verticales el percentil 5 – 95. La línea horizontal dentro de la caja representa la mediana cuyo valor está indicado sobre la distribución de datos de cada grupo. No se observan infecciones estadísticamente significativas.

## 5.6 Análisis de la respuesta inmunitaria en ratones $Eng^{fl/fl}LysMCre$ .

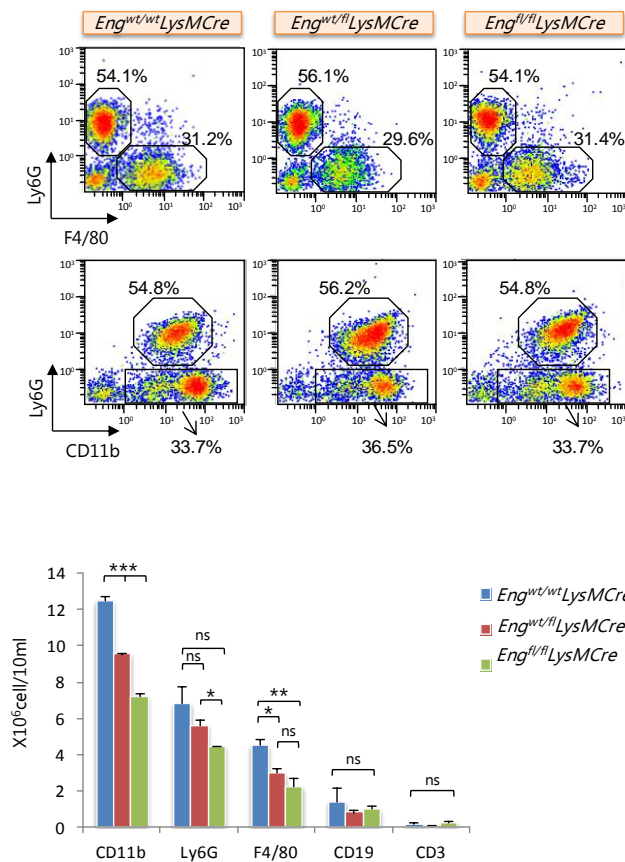
### 5.6.1 Reclutamiento de leucocitos tras una peritonitis mediada por Zymosan.

Para evaluar el efecto de la ausencia de expresión de endoglina en macrófagos, en primer lugar evaluamos el reclutamiento de leucocitos de sangre periférica a la cavidad peritoneal utilizando un modelo *in vivo* de inflamación aguda, el conocido como ZIP o *Zymosan Induced Peritonitis*. Indujimos una peritonitis inyectando Zymosan en la cavidad peritoneal de los ratones y transcurridas 24 horas realizamos el recuento total de células presentes en la cavidad peritoneal (Figura 52). El número de células tras ZIP era menor en los ratones deficientes en endoglina comparado con los ratones control, siendo estos valores intermedios en los ratones haploinsuficientes en endoglina en el macrófago. Los niveles de células  $CD11b^+$ ,  $F4/80^+$ ,  $Ly6G^+$ ,  $CD19^+$  y  $CD3^+$  se analizaron mediante citometría de flujo en la cavidad peritoneal tras la peritonitis mediada por Zymosan (24h). Las células del linaje mielóide, principalmente granulocitos ( $CD11b^+Ly6G^+F4/80^-$ ) y macrófagos ( $CD11b^+Ly6G^-F4/80^+$ ), son las predominantes en la cavidad peritoneal (Figura 53 A). Si bien, no se observan diferencias marcables en el porcentaje de macrófagos presentes en la cavidad peritoneal de las tres líneas murinas analizadas, el recuento total de células mieloides sí que presenta diferencias significativas (Figura 53 B). El número de células mieloides es proporcional a los niveles de expresión de endoglina, siendo las diferencias significativas en el número de granulocitos presentes en la cavidad peritoneal de ratones  $Eng^{wt/fl}LysMCre$  y  $Eng^{wt/wt}LysMCre$ , y en el número total de macrófagos entre los ratones deficientes en endoglina ( $Eng^{wt/fl}LysMCre$  y  $Eng^{fl/fl}LysMCre$ ) y los ratones control o  $Eng^{wt/wt}LysMCre$ , no habiendo diferencias entre los ratones  $Eng^{wt/fl}LysMCre$  y  $Eng^{fl/fl}LysMCre$ , pero sí una menor cantidad en ratones  $Eng^{fl/fl}LysMCre$ . Las poblaciones de linfocitos B ( $CD19^+$ ) y linfocitos T ( $CD3^+$ ) no presentan

diferencias significativas, pero estas poblaciones están totalmente desplazadas por el infiltrado de células mieloides.



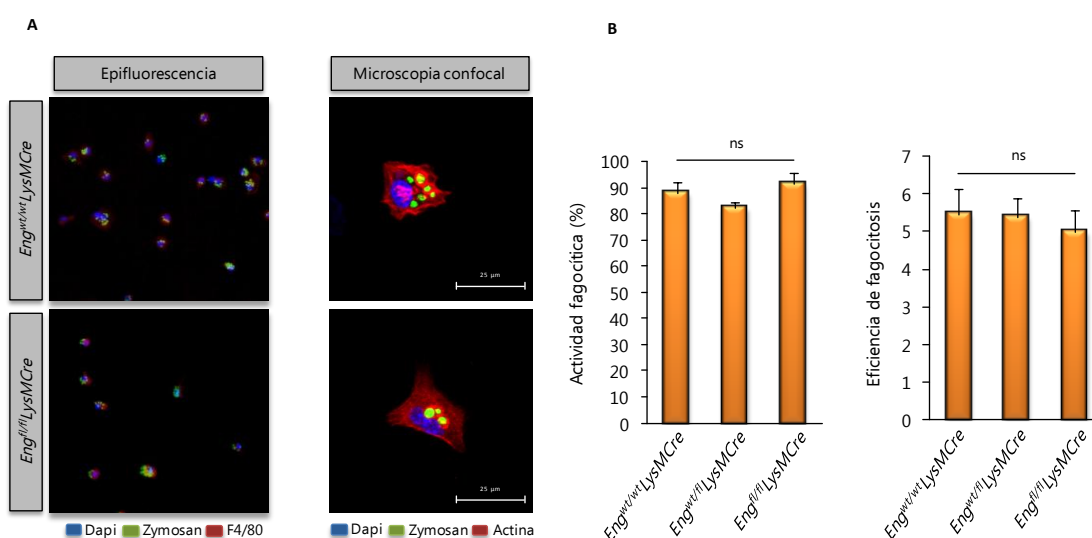
**Figura 52. La deficiencia en la expresión de endoglina en el macrófago altera el reclutamiento leucocitario.** El número de células presentes en la cavidad peritoneal fue analizado mediante un contador de células en los ratones experimentales en condición basal **(A)** y transcurridas 24 horas de la inyección del agente inflamatorio Zymosan **(B)**. Un evento se consideró positivo si presentaba un diámetro > 5,7  $\mu$ m Los valores se muestran como la mediana  $\pm$  SEM;  $n = 6 - 7$  por genotipo.



**Figura 53. La deficiencia en endoglina se traduce en un menor reclutamiento de células mieloides mediado por una peritonitis inducida por Zymosan. (A)** Perfiles de citometría representativos de la tinción F4/80 vs Ly6G y CD11b vs Ly6G del total de células aisladas de la cavidad peritoneal. En los paneles *dot-plot* se muestran los porcentajes de células positivas presentes en las áreas delimitadas. Se analizaron los exudados de las cavidades peritoneales tras 24 horas de la inyección de zymosan. **(B)** El número total de células CD11b<sup>+</sup>, Ly6G<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup> se calculó utilizando la fórmula: % de células positivas x 0,01 x n<sup>o</sup> total de células obtenidos en el panel B de la figura R24. Se analizaron 5 individuos por genotipo. El gráfico muestra la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; ns = no significativo.

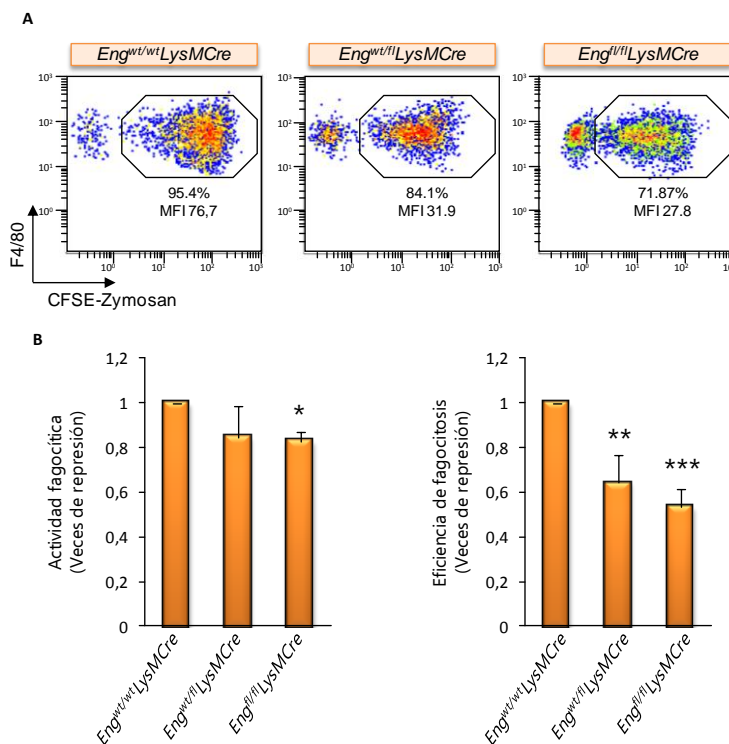
### 5.6.2 Actividad fagocítica en macrófagos de la cavidad peritoneal.

La fagocitosis es una de las principales funciones efectoras del macrófago en el sistema inmunitario y frente a la defensa de microorganismos patógenos. Por eso, la evaluación de la actividad fagocítica de los macrófagos, en ausencia de la expresión de endoglina presenta un interés especial. La fagocitosis fue evaluada en los macrófagos peritoneales mediante el uso de partículas de Zymosan fluorescentes. En los ensayos *in vitro*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los macrófagos peritoneales extraídos de los distintos grupos de ratones experimentales, aunque se observa una ligera tendencia de inhibición en la eficiencia fagocítica de los macrófagos peritoneales aislados de los ratones *Eng<sup>f/f</sup>LysMCre* (Figura 54). Sin embargo, el análisis de la fagocitosis de partículas de Zymosan *in vivo*, reveló una afectación del proceso de fagocitosis ante una reducción o deficiencia de la expresión de endoglina en macrófagos peritoneales (Figura 55). *In vivo*, podemos comprobar que tanto la actividad fagocítica como la eficiencia de fagocitosis, están claramente reducidas en los ratones *Eng<sup>f/f</sup>LysMCre* en comparación con los ratones control (*Eng<sup>wt/wt</sup>LysMCre*). En los ratones heterocigotos (*Eng<sup>wt/f</sup>LysMCre*) nos encontramos con un fenotipo intermedio, donde la actividad fagocítica no presenta diferencias significativas frente a los ratones control, pero sí se observa una disminución en la eficiencia de fagocitosis.



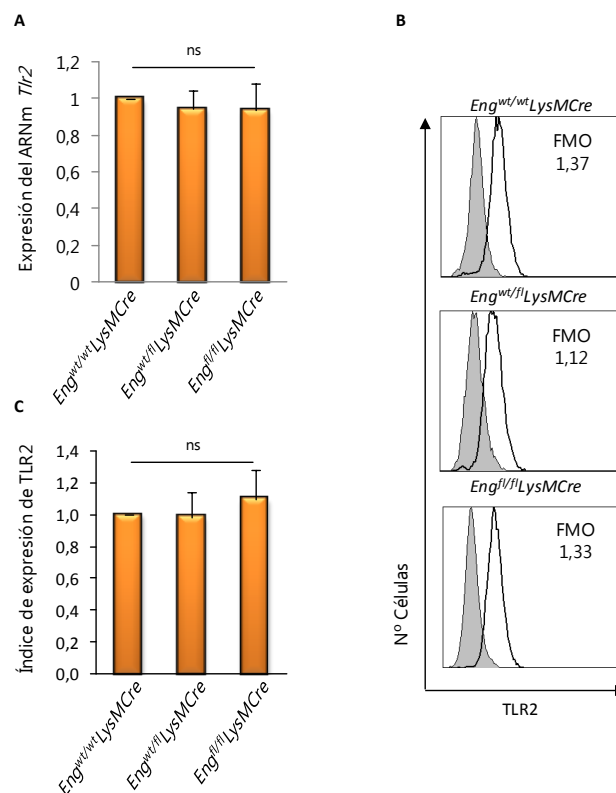


**Figura 54. Fagocitosis *in vitro* de partículas de Zymosan en macrófagos peritoneales. (A)** Imágenes de microscopía de fluorescencia. En las imágenes de la izquierda se pueden observar unos campos representativos de las imágenes captadas con el microscopio de epifluorescencia en macrófagos peritoneales de ratones *Eng<sup>wt/wt</sup>LysMCre* y *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre*. En las imágenes de la derecha se muestra un macrófago representativo de cada genotipo con las partículas de Zymosan incorporadas (microscopía confocal). **(B)** La actividad y eficiencia fagocítica se evaluó en los macrófagos peritoneales cultivados *in vitro* durante 90 minutos en presencia de partículas de zymosan. Un mínimo de 10 campos escogidos al azar, con un mínimo de 150 células por condición fueron analizados. El experimento se repitió en 3 ocasiones. En el gráfico se muestra el promedio de 3 experimentos ( $N=3$ ). ns=no significativo.



**Figura 55. Fagocitosis *in vivo* de partículas de zymosan. (A)** Los ratones fueron inyectados i.p. con una solución salina que contenía 50µg de partículas Zymosan (500µl PBS). Transcurridos 90 minutos de la inyección de las partículas, se realizó un lavado peritoneal para extraer las células de la cavidad peritoneal. Las muestras fueron procesadas para su análisis mediante citometría de flujo. En los paneles se muestra la señal emitida por las partículas de Zymosan marcadas con la sonda CFSE en la población de macrófagos peritoneales (F4/80<sup>+</sup>). La ventana delimitada en cada panel muestra las células F4/80<sup>+</sup> que han incorporado partículas de Zymosan. En los paneles se muestra el porcentaje de células con actividad fagocítica y el valor de IFM o eficiencia fagocítica. **(B)** La actividad fagocítica fue evaluada en las células F4/80<sup>+</sup>. La actividad fagocítica, representada por el porcentaje de macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) que han incorporado partículas de Zymosan (CFSE<sup>+</sup>) está disminuida en los ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre*, así como la eficiencia de fagocitosis, definida como el número de partículas incorporadas por cada célula y que está representado por la IFM de CFSE en las células F4/80<sup>+</sup>. Los resultados están normalizados frente a los datos obtenidos en los ratones *Eng<sup>wt/wt</sup>LysMCre* y se presentan como el valor de la media ± SEM. Los resultados mostrados son la unificación de 3 experimentos independientes ( $N=3$ ) con duplicados para cada condición. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$  respecto a los controles.

De forma complementaria al ensayo de fagocitosis, se analizaron los niveles de expresión de TLR2, el receptor de las partículas de Zymosan. Tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína en membrana, no se observaron diferencias significativas entre los 3 genotipos de interés (Figura 56).

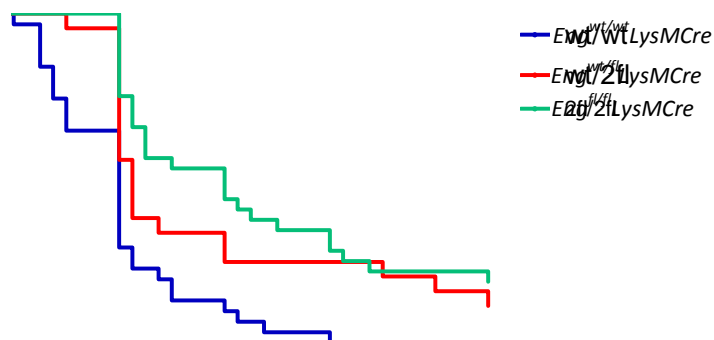


**Figura 56. Niveles de TLR2 en macrófagos peritoneales.** (A) PCR cuantitativa a tiempo real de *Tlr2* a partir del ARNm aislado de macrófagos peritoneales en cultivo de ratones  $Eng^{wt/wt}LysMCre$ ,  $Eng^{wt/fl}LysMCre$  y  $Eng^{fl/fl}LysMCre$ . No se observan diferencias significativas en la expresión de *Tlr2*. El gráfico muestra el valor medio de 4 experimentos independientes (N=4). ns=no significativo. (B) Los macrófagos peritoneales fueron aislados y procesados para analizar mediante citometría de flujo los niveles de expresión de TLR2 en las células F4/80<sup>+</sup>. En los paneles se muestra un histograma representativo para cada genotipo. El valor de FMO (*Fluorescence Minus One*) se indica en la esquina superior derecha. El control negativo para cada muestra está representado por el histograma gris. (C) Índice de expresión de TLR2 en macrófagos peritoneales. Los niveles de TLR2 no se ven afectados en macrófagos deficientes en endoglina. En el gráfico se muestran los resultados normalizados frente a la situación control ( $Eng^{wt/wt}LysMCre$ ). Los datos son el promedio de 3 análisis independientes (N=3). ns = no significativo.

### 5.6.3 Supervivencia a un shock séptico inducido por LPS.

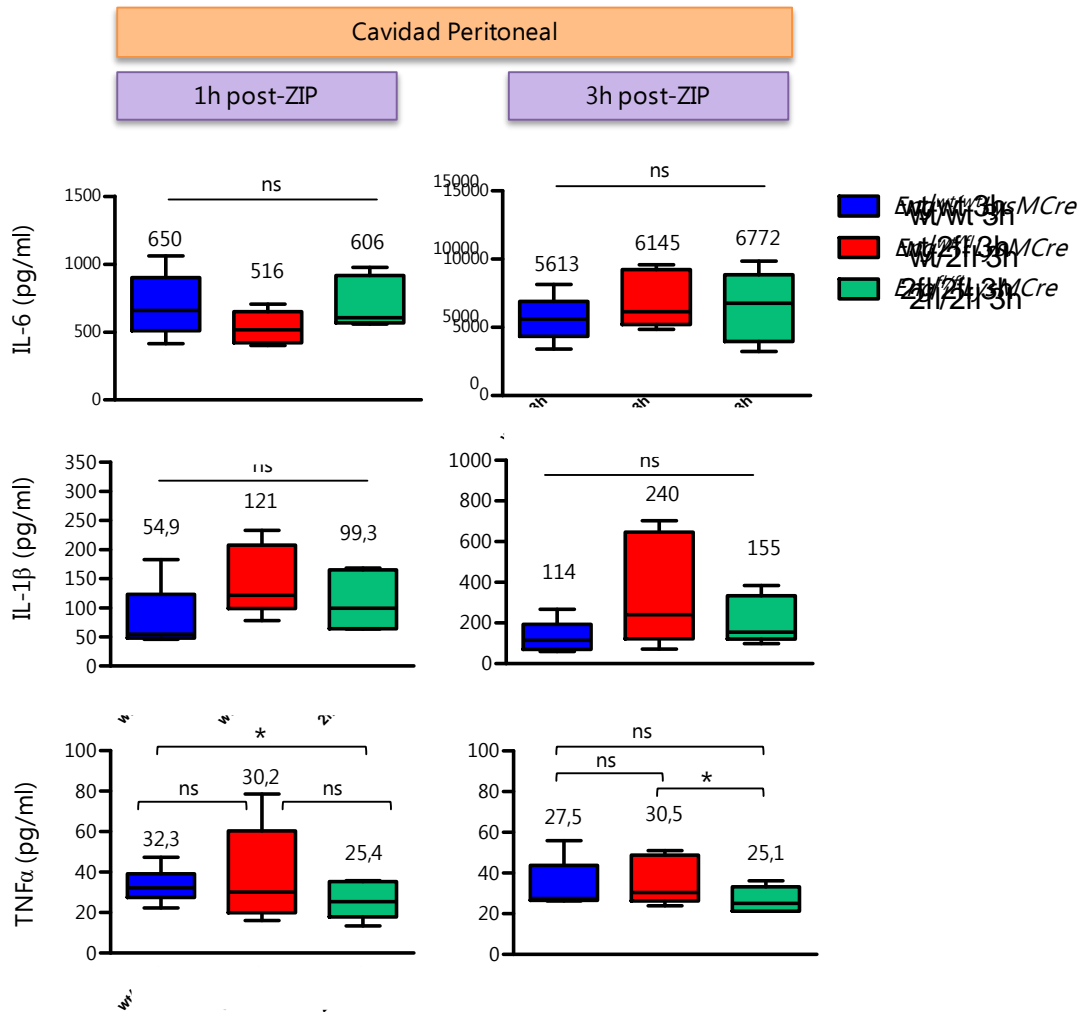
Con el fin de evaluar el papel de endoglina en la respuesta inmune innata a una sepsis experimental, realizamos la inyección i.p. de 40 mg de LPS por kg de peso animal en las tres líneas experimentales. La tasa de mortalidad se siguió durante 5 días (120 horas), momento a partir del cual, los individuos que habían sobrevivido se habían recuperado del shock séptico presentando un estado saludable. La respuesta a la inducción del shock séptico parece estar ralentizada en los ratones  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  ya que los primeros individuos muertos aparecen a las 36 horas de la inyección de LPS, mientras que a las 12 horas ya se contabilizan las primeras bajas en los ratones control (Figura 57). En concordancia con esta ralentización, también observamos una supervivencia ligeramente mayor en los ratones  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  (23,5%) en comparación con la encontrada en los ratones  $Eng^{wt/fl}LysMCre$  (20,8%) o  $Eng^{wt/wt}LysMCre$

(6,0%). Los ratones deficientes en endoglina mieloide parecen ser menos susceptibles al shock séptico inducido por LPS.

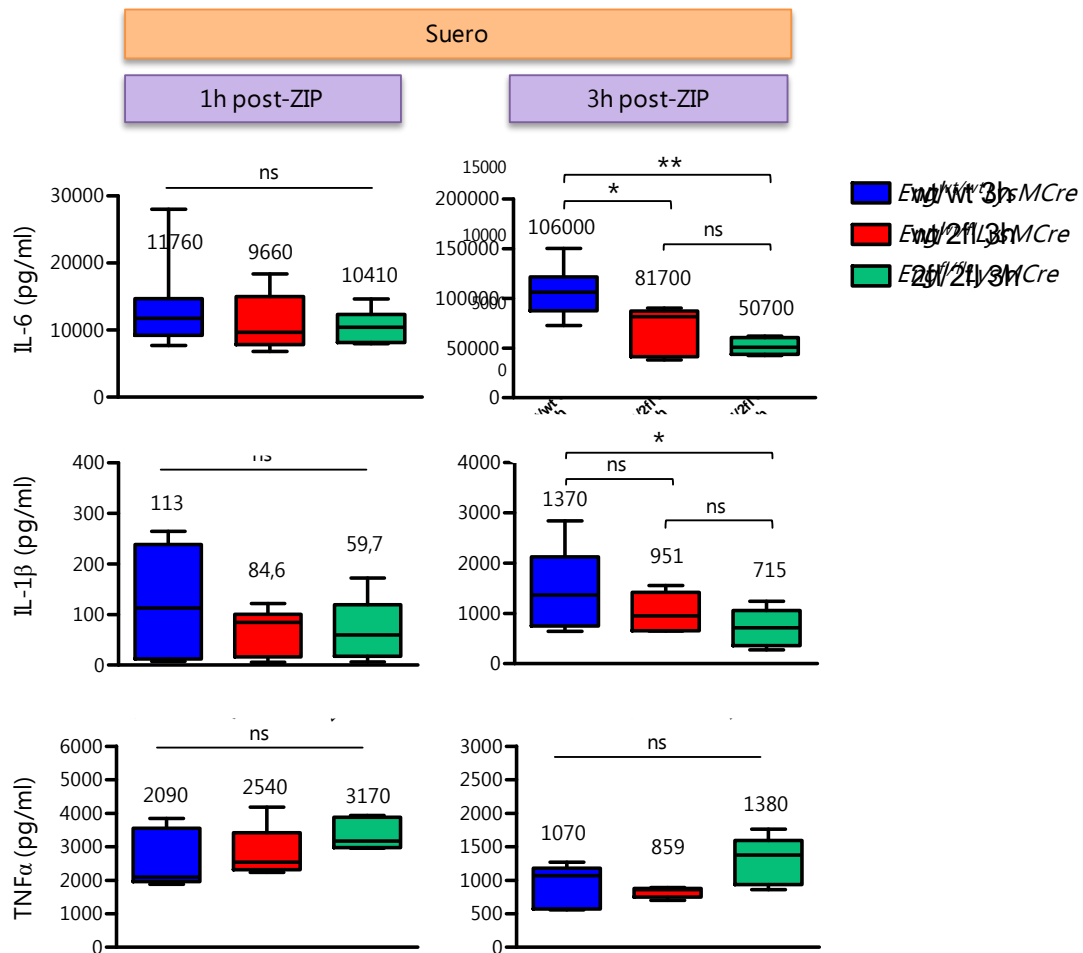


**Figura 57. Ralentización de la mortalidad frente a una sepsis mediada por LPS en ratones  $Eng^{wt/fl}LysMCre$  y  $Eng^{fl/fl}LysMCre$ .** Supervivencia a LPS de ratones control, haploinsuficientes y deficientes para endoglina tras una administración i.p. de LPS (40 mg/kg). El gráfico representa los datos de supervivencia unificados de tres experimentos independientes;  $Eng^{wt/wt}LysMCre$  (n=33),  $Eng^{wt/fl}LysMCre$  (n=24) y  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  (n=34). La supervivencia fue monitorizada durante 5 días tras la administración de LPS. El análisis estadístico se realizó con el test *Log-rank* (*Mantel-Cox*). Las diferencias entre las curvas de supervivencia son estadísticamente significativas con un  $p < 0,01$ .

Una menor respuesta inmunitaria frente al shock séptico podría explicar las diferencias encontradas. Ello nos llevó a la validación de citoquinas características de la respuesta inflamatoria aguda como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ . El análisis de la concentración de citoquinas se realizó mediante la técnica cuantitativa de ELISA, y sus niveles fueron evaluados en los exudados peritoneales y en el suero de los ratones. Los niveles de TNF $\alpha$  en exudados peritoneales de los ratones  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  eran menores tras 1 hora del inicio de la peritonitis mediada por LPS que los observados en los ratones control  $Eng^{wt/wt}LysMCre$  (Figura 58). No se observaron diferencias significativas en los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 tras 1 y 3 horas de la administración de LPS ni en los niveles de TNF $\alpha$  a las 3 horas. No se observaron diferencias en los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 o TNF $\alpha$  en los ratones tras 1 hora de la inyección de LPS (Figura 59). Sin embargo, los niveles de IL-6 a las 3 horas están reducidos en los ratones  $Eng^{fl/fl}LysMCre$ , presentando diferencias estadísticamente significativas entre los tres genotipos analizados. Los niveles de IL-1 $\beta$  a las 3 horas están reducidos de forma significativa en los ratones  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  en comparación con los ratones control, mostrando los ratones  $Eng^{wt/fl}LysMCre$  valores intermedios aunque no significativos. La deficiencia de endoglina en el macrófago, no parece afectar los niveles de TNF $\alpha$  en suero.

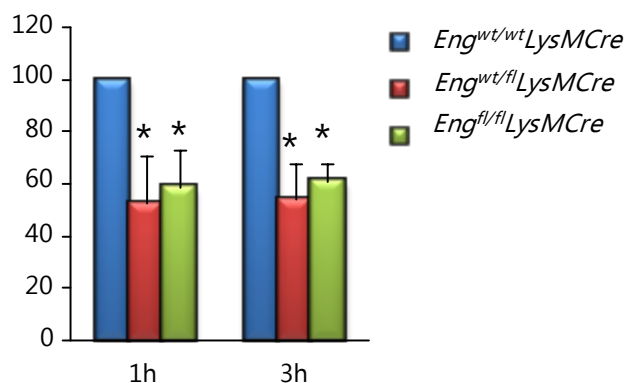


**Figura 58. Niveles de IL-6, IL-1β y TNFα en la cavidad peritoneal tras un shock séptico inducido por LPS.** Los ratones fueron i.p. inyectados con una solución de LPS (40mg/kg). Se extrajo el lavado peritoneal tras 1 y 3 horas de la administración del LPS. El nivel de citoquinas se analizó mediante kits de ELISA. Se analizó un mínimo de 5 animales por grupo. Las diferencias estadísticas se analizaron por el test ANOVA. \* $p < 0,05$ ; ns = no significativo.



**Figura 59. Niveles de IL-6, IL-1β y TNFα en suero tras un shock séptico inducido por LPS.** Los ratones fueron i.p. inyectados con una solución de LPS (40mg/kg). La obtención de sangre se realizó tras 1 y 3 horas de la administración del LPS y fue procesada para el aislamiento del suero. El nivel de citoquinas se analizó mediante kits de ELISA. Se analizaron un mínimo de 5 animales por grupo. Las diferencias estadísticas se analizaron por el test ANOVA. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; ns=no significativo.

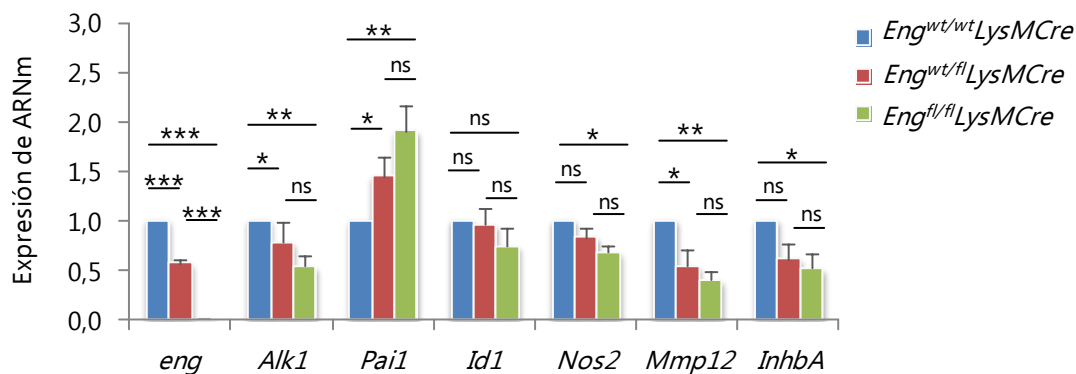
Con el fin de comprobar si había una conexión entre la supervivencia a LPS y una menor producción de citoquinas/quimioquinas, llevamos a cabo un ensayo de migración *in vitro*. Analizamos la capacidad quimioatrayente de los exudados peritoneales tras 1 y 3 horas de la inyección de LPS en la línea SR.D10.CD4<sup>-</sup>.F1. Los exudados peritoneales de los ratones control (*Eng*<sup>wt/wt</sup>*LysMCre*) presentan una mayor capacidad quimioatrayente que aquellos que provienen de los ratones experimentales (*Eng*<sup>wt/fl</sup>*LysMCre* o *Eng*<sup>fl/fl</sup>*LysMCre*) (Figura 60).



**Figura 60. Ensayo de migración celular hacia el exudado de la cavidad peritoneal tras la inducción de un shock séptico mediado por LPS.** En el gráfico se muestra el ensayo de migración *in vitro* en transwell de células SR.D10.CD4<sup>+</sup>.F1 en respuesta a los exudados peritoneales de ratones *Eng*<sup>wt/wt</sup>*LysMCre*, *Eng*<sup>wt/fl</sup>*LysMCre* y *Eng*<sup>fl/fl</sup>*LysMCre* tras 1 y 3 horas de la administración i.p. de LPS (40mg/kg). La cuantificación de las células migradas se realizó por citometría de flujo. El ensayo se realizó en 3 experimentos independientes (N=3) valorando las muestras en duplicados y los resultados se muestran unificados presentando el valor de la media  $\pm$  SEM. El porcentaje de migración se calculó tomando los valores obtenidos en los ratones control como el 100% de migración. \* $p < 0,05$ .

### 5.7 Análisis de la influencia de la delección de *eng* sobre dianas del TGF- $\beta$ .

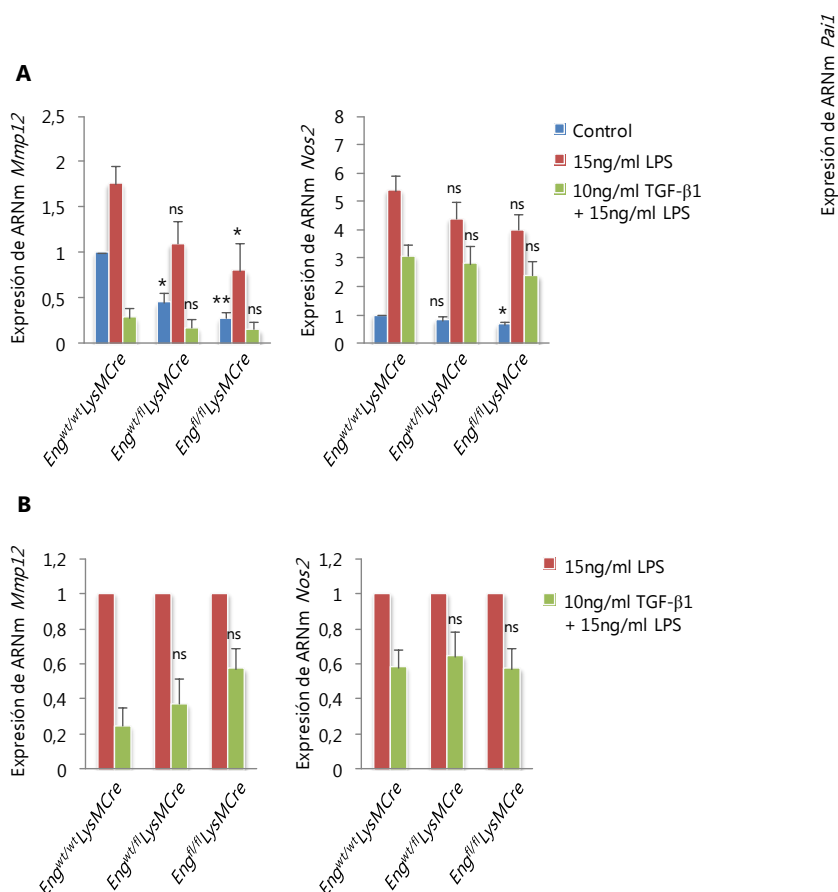
Endoglina es un co-receptor de membrana del TGF- $\beta$ 1 que actúa modulando la señalización de éste, por ello cobraba especial interés validar la expresión de genes diana del TGF- $\beta$ 1 en macrófagos deficientes en endoglina. Se validaron los niveles de expresión de *Id1*, *Pai-1*, *Alk1*, *Nos2*, *Mmp12* y *InhbA*. El análisis de la expresión genética de los macrófagos peritoneales de los ratones control y los ratones experimentales reveló que tanto la ausencia como la haploinsuficiencia de expresión de endoglina afectaba la expresión basal de genes dianas de TGF- $\beta$ 1 en el sistema inmunitario como *Nos2*, *Mmp12* y *InhbA*, así como el de dianas bien establecidas en el contexto endotelial como *Pai-1* (Figura 61). Más concretamente observamos que *Alk1* y *Mmp12* están reprimidos tanto en ausencia como en la haploinsuficiencia de endoglina. La represión de *Nos2* e *InhbA* es estadísticamente significativa en los macrófagos peritoneales de los ratones *Eng*<sup>fl/fl</sup>*LysMCre* comparado con los ratones control, observándose una tendencia que no llega a ser significativa en los ratones *Eng*<sup>wt/fl</sup>*LysMCre*. Los valores de *Id1* no presentan variaciones significativas, y los niveles de *Pai1* aumentan de forma inversamente proporcional a los niveles de expresión de *eng*. En paralelo también se han analizado los niveles de expresión de *eng* como control de las poblaciones de macrófagos analizadas.



**Figura 61. Endogлина modula la señalización de TGF-β1 en macrófagos.** PCR cuantitativa a tiempo real de *eng*, *Alk1*, *Pai1*, *Id1*, *Nos2*, *Mmp12* e *Inhba* en macrófagos peritoneales en cultivo. Los niveles relativos de expresión de ARNm están normalizados frente a los niveles de *18s* usado como control endógeno. La expresión en los ratones *Eng<sup>wt/wt</sup>LysMCre* es considerada como los valores control de referencia. Los datos se muestran como la media ± SEM de 5 experimentos independientes (N=5). \**p*<0,05; \*\**p*<0,01; \*\*\**p*<0,001; ns = no significativo.

### 5.7.1 Efecto de la expresión de endogлина sobre la inhibición de TGF-β1 en la inducción de *Mmp12* y *Nos2* mediada por LPS.

TGF-β1 inhibe la expresión de *Nos2* y *Mmp12* inducida por LPS en macrófagos (Werner et al., 2000). Los macrófagos peritoneales fueron cultivados durante 16 horas en medio DMEM (condición basal), o bien en medio DMEM suplementado con 15 ng/ml de LPS con o sin un pre-tratamiento de 30 minutos con 10 ng/ml de TGF-β1. Los niveles de *Nos2* y *Mmp12* se indujeron tras 16 horas con el tratamiento de LPS, observando una menor inducción en la expresión de *Mmp12* en los macrófagos peritoneales deficientes en endogлина (*Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre*). Sin embargo, aunque se observa una disminución en la inducción mediada por LPS de *Nos2*, las diferencias no son significativas (Figura 62). El pre-tratamiento con TGF-β1 inhibe la inducción de ambos genes, siendo esta inhibición mucho más acusada en *Mmp12*. No se observan diferencias en la inhibición mediada por TGF-β1 entre los tres genotipos. En el panel B se han representado los datos referentes al pre-tratamiento con TGF-β1 de las células tratadas con LPS, normalizados frente al tratamiento con LPS. No se observan diferencias en las veces de represión mediada por TGF-β1 en *Mmp12* o *Nos2*.



**Figura 62. Expresión de *Nos2* y *Mmp12* tras la inhibición con TGF-β1 de la inducción mediada por LPS.** (A) En el gráfico se muestran los resultados de PCR cuantitativa a tiempo real de *Nos2* y *Mmp12* en macrófagos peritoneales en cultivo (control), tratados con 15ng/ml de LPS durante 16 horas o con un pretratamiento con 10ng/ml de TGF-β1 realizado 30 minutos antes de la adición al medio de LPS. En todas las condiciones se observa una inducción por LPS que es inhibida con el pretratamiento con TGF-β1. Las diferencias estadísticas están reflejadas frente a la misma condición de tratamiento en el ratón control (*Eng<sup>wt/wt</sup>LysMCre*). \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; ns=no significativo. (B) Veces de represión de *Nos2* y *Mmp12* mediado por TGF-β1. Los valores del pretratamiento con TGF-β1 han sido normalizados frente al tratamiento con LPS. La prueba *T* de student se ha realizado comparando los valores del pretratamiento de las muestras con TGF-β1 en los ratones control. ns=no significativo. El experimento se realizó en 3 ocasiones y los datos se muestran como la media + SEM.





# DISCUSIÓN



### V. DISCUSIÓN

#### 1. Ang-2 y sEng: nuevos biomarcadores en HHT.

##### 1.1 Beneficios de un diagnóstico molecular para la evaluación de componentes presentes en sangre.

El diagnóstico de HHT se realiza generalmente a nivel clínico en base a los criterios de Curaçao. Si el paciente no cumple 3 de los 4 criterios se sospecha la HHT y, esto puede darse con relativa frecuencia ya que la penetrancia de la sintomatología HHT es dependiente de la edad (Shovlin *et al.*, 2000; Faughnan *et al.*, 2009). Siempre existe el riesgo de no diagnosticar la HHT siguiendo los criterios clínicos de Curaçao, especialmente en aquellos individuos asintomáticos como los niños o bien algunos adultos jóvenes. Es por ello que en los centros de referencia en HHT, el diagnóstico clínico va acompañado de un diagnóstico genético que confirmará o descartará los casos sospechosos de HHT. Frente a individuos dónde la HHT se sospecha, el cribado genético supone un ahorro económico frente a un cribado clínico (Bernhardt *et al.*, 2012). Cuando los individuos son sospechosos de presentar HHT también se les somete a un examen físico y varias pruebas clínicas de diagnóstico por imagen hasta que se llega a un diagnóstico definitivo. Las pruebas clínicas son costosas, en algunos casos implican exposición a radiaciones y pueden provocar ansiedad en el paciente ante la indeterminación del estado de ser afectado o no. El análisis genético habitual incluye al menos la secuenciación de 3 genes: *ENG*, *ACVRL1* y *SMAD4*. Si bien, la determinación genética se facilita ante la presencia de un caso índice, ante nuevas familias o nuevas mutaciones que previamente no han sido descritas, el diagnóstico genético puede prolongarse mucho en el tiempo y encarecer los costes. Cabe destacar que en un 10-15% de los casos HHT, la mutación no es identificada. La combinación de algunos criterios clínicos, la historia familiar y el análisis de biomarcadores presentes en sangre periférica daría lugar a un diagnóstico más rápido y menos costoso económicamente en aquellos casos dónde el análisis de la mutación no pueda realizarse (Botella *et al.*, 2015). Los factores responsables de ello pueden ser técnicos (ausencia de desarrollo tecnológico en determinados países) o económicos (ausencia de cobertura médica particular del sistema de salud de cada país). En nuestro caso, los niveles de Ang-2 y sEng en plasma nos ha permitido identificar el síndrome HHT y discriminar entre los dos tipos mayoritarios de la enfermedad (HHT1 y HHT2) con un buen valor predictivo.

### 1.2 Diagnóstico de HHT1 y HHT2.

Los niveles de diversas proteínas presentes en plasma han sido evaluados en pacientes HHT (Tabla 1), pero hasta la fecha, ninguno de los trabajos ha podido establecer una correlación con el síndrome de HHT que dé lugar a un diagnóstico molecular definitivo. Las valoraciones de Ang-2 y sEng realizadas en la población HHT y el análisis discriminante de los datos, nos han permitido establecer una fórmula diagnóstica para HHT que nos permite discernir entre los dos tipos principales de HHT. La fiabilidad predictiva para HHT1 es de un 90,6% y de un 83,3% para HHT2 mediante la combinación de la valoración de Ang-2 y sEng (Tabla 12). La fórmula diagnóstica mediante la combinación de ambos componentes tuvo como resultado la obtención de una patente para el diagnóstico de HHT a través de muestras de plasma (Patente nº 200803174). Un valor añadido a estos dos componentes, en relación con la HHT y otras enfermedades, es que en ambos casos sería la primera enfermedad o síndrome donde los niveles están disminuidos en relación con la población control. Por ejemplo, un aumento de los niveles de ambos componentes ha sido asociado a procesos tumorales (Fagiani *et Christofori*, 2013; Pérez-Gómez *et al.*, 2010). En el caso concreto de sEng, se ha observado que el aumento de su concentración en plasma está asociado además a otras enfermedades caracterizadas por una disfunción vascular como preeclampsia, hipercolesterolemia, arteriosclerosis, hipertensión, diabetes mellitus, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio y psoriasis (Venkatesha *et al.*, 2006; Nachtigal *et al.*, 2012; Blazquez-Medela *et al.*, 2010; Yanavitski *et Givertz*, 2011; Cruz-Gonzalez *et al.*, 2008; Pohl *et al.*, 2011). Y a otras enfermedades infecciosas que también cursan con una disfunción vascular como malaria y dengue (Dietmann *et al.*, 2009; Conroy *et al.*, 2015). Un aumento de los niveles de Ang-2 circulantes también se han asociado a procesos no tumorales como sepsis (Siner *et al.*, 2009). La disminución en Ang-2 y sEng en plasma es por tanto una peculiaridad de la HHT que no sólo nos permite identificar el tipo de HHT sino que puede descartar otras afecciones como inflamación, sepsis, determinados procesos tumorales o preeclampsia.

Otro aspecto clave a resaltar es que el valor predictivo de la función discriminante sería de utilidad para iniciar la secuenciación de *ENG* o *ACVRL1* en aquellos casos donde no se conoce la mutación familiar, repercutiendo de forma favorable en los costes derivados de la secuenciación. Además de esto, el diagnóstico molecular a través de la valoración de los niveles de Ang-2 y sEng sería de utilidad para establecer el diagnóstico de HHT puesto que no hemos observado una dependencia de la penetrancia o severidad de los síntomas clásicos en HHT como las epistaxis o los sangrados GI.

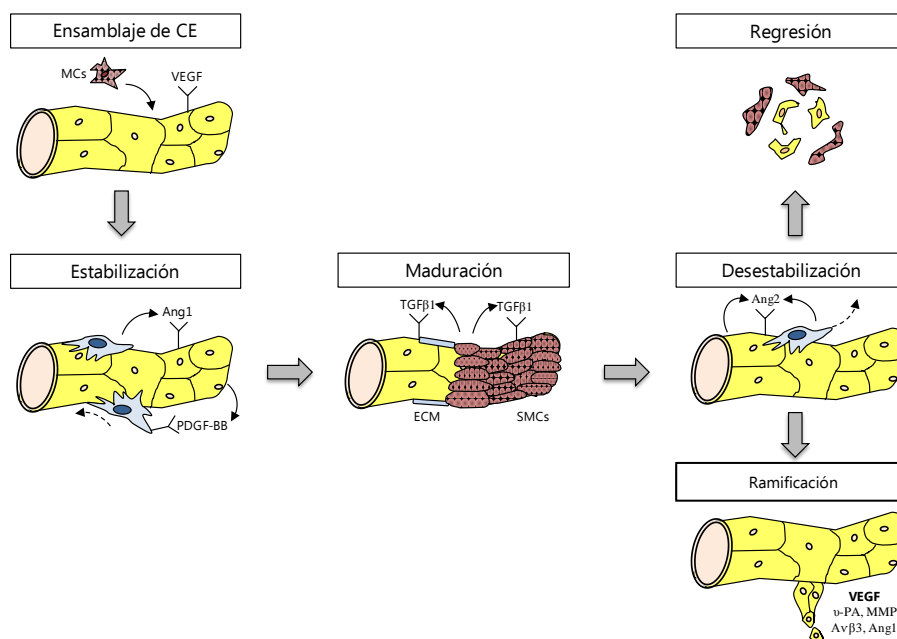
### 1.3 Implicaciones biológicas de niveles reducidos de Ang-2 en el plasma de pacientes HHT.

Uno de los primeros compuestos solubles que nos planteamos validar fue Ang-2, ya que se había demostrado previamente que la haploinsuficiencia en *ENG* o *ACVRL1* en BOECs de pacientes HHT resultaba en una represión de su expresión (Fernández-L *et al.*, 2007). Los genes diferencialmente expresados dan lugar a una expresión proteica alterada, que en el caso de compuestos solubles puede ser detectada en plasma utilizando test sanguíneos de uso común. Fernández-L y colaboradores (2007) evaluaron los niveles de Ang-2 en plasma de pacientes HHT y de ratones *eng*<sup>+/-</sup> comprobando que estos eran menores que los niveles circulantes presentes en el plasma de los individuos sanos no-HHT y los ratones *eng*<sup>+/+</sup>. En nuestro trabajo hemos evaluado los niveles de Ang-2 ampliando el tamaño de la población y analizando los niveles de Ang-2 por separado en los principales tipos de HHT. De este modo, hemos podido comprobar que tanto los individuos HHT1 como los HHT2, presentan menores niveles de Ang-2 comparados con una población control no-HHT y, que existen diferencias entre ambos tipos de HHT siendo menores en la población HHT2.

La Ang-2 es un factor proangiogénico estructuralmente homólogo a la Ang-1 que bloquea la forforilación del receptor Tie-2 (Maisonpierre *et al.*, 1997), un receptor tirosina quinasa para Ang-1. Ang-2 se expresa de forma activa durante el remodelado vascular que tiene lugar en la embriogénesis, la inflamación o la angiogénesis tumoral (Gale *et al.*, 2002; Lemieux *et al.*, 2005; Scholz *et al.*, 2007) y sus niveles se han utilizado como valor pronóstico de leucemia (Schliemann *et al.*, 2007), mieloma múltiple (Medinger *et al.*, 2015) y sepsis (Siner *et al.*, 2009). Ang-2 es casi exclusivamente producida por las células endoteliales y actúa de forma autocrina (Scharpfenecker *et al.*, 2005). Las células endoteliales la almacenan en los cuerpos de Weibel-Palate desde dónde puede ser rápidamente liberada para activar la respuesta de las células endoteliales a estímulos angiogénicos e inflamatorios (Fiedler *et al.*, 2006).

Las células endoteliales quiescentes tienen una tasa de recambio que puede variar desde meses a años, y solo proliferan frente a un estímulo angiogénico (Carmeliet, 2003). Tanto la hipoxia, como el TGF- $\beta$  como VEGF son los principales inductores de la expresión de Ang-2 en la microvasculatura (Mandriota *et al.*, 1998). VEGF, también conocido como factor de permeabilidad vascular, es una citoquina que induce la proliferación y migración de las células endoteliales para formar nuevos vasos y aumenta la permeabilidad vascular. El papel de Ang-1 es la estabilización de los vasos en el endotelio quiescente, mientras que Ang-2 ejerce una función contraria en la que desestabiliza los vasos pudiendo dar lugar a dos procesos: activación de la angiogénesis en presencia de estímulos angiogénicos o de factores

de supervivencia endotelial como VEGF o, regresión vascular en ausencia de dichos estímulos. (Carmeliet, 2000; Figura 63). Diversos estudios han propuesto que la haploinsuficiencia de *ENG* y *ACVRL1*, altera la vía de señalización de TGF- $\beta$ 1, dando lugar a una angiogénesis y un remodelado vascular anómalo, donde factores como VEGF y Ang-2 juegan un papel principal en la angiodisplasia presente en HHT (López-Novoa *et al.* Bernabeu, 2010). La menor expresión de Ang-2 podría contribuir a la clínica de HHT puesto que se verían afectados los procesos de activación endotelial y las células endoteliales responderían con menor eficiencia a estímulos angiogénicos como el VEGF. O dicho de otra manera, es bien conocido que endoglin no es indispensable para la vasculogénesis pero es necesaria para un correcto proceso de angiogenesis inducido por VEGF (Liu *et al.*, 2014; Arthur *et al.*, 2000; Bourdeau *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2013), y a la deficiente respuesta a VEGF observada en los pacientes HHT, podría estar contribuyendo la menor expresión de Ang-2. En ensayos futuros sería de interés analizar el papel de Ang-2 durante el proceso de formación de las MAVs.



**Figura 63. Papel de Ang2 en los procesos de angiogénesis.** El VEGF inicia el ensamblaje de las células endoteliales (CE), el PDGF-BB recluta los pericitos (PC) y las células de musculatura lisa (CML), mientras que Ang1 y TGF- $\beta$ 1 estabilizan el vaso que se está formando. Ang2 desestabiliza el vaso formado dando lugar a una angiogénesis en presencia de estímulos angiogénicos, o bien dará lugar a la regresión vascular en ausencia de dichos estímulos o factores de supervivencia endotelial. Adaptado de Carmeliet (2000).

### 1.4 Implicaciones biológicas de niveles reducidos de sEng en el plasma de pacientes HHT.

En HHT1, cabría esperar menores niveles de sEng circulante comparando con individuos control, puesto que la HHT1 es el resultado de una haploinsuficiencia en endoglin (Abdalla *et al.* Letarte, 2006). Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente (Tabla 1), existen

resultados contradictorios en la valoración de compuestos solubles aislados de sangre periférica de pacientes HHT. Con los niveles de sEng nos encontramos en la misma situación a raíz de nuestros resultados. El primer estudio realizado en 2005 (Letarte *et al.*, 2005) sugiere que no existen diferencias en los niveles de sEng en plasma de pacientes HHT (HHT1 = 0,52 ng/ml y HHT2 = 0,70 ng/ml) comparados con una población control (0,57 ng/ml). Sin embargo, nuestros resultados indican que los niveles de endoglina soluble en la población HHT1 son inferiores a los hallados en la población control, alrededor de un 50% menos, estando también disminuidos en la población HHT2 con diferencias estadísticamente significativas. Estas diferencias son coherentes si asumimos que los niveles de sEng en plasma se correlacionan con los niveles de expresión de endoglina en la superficie de las células endoteliales. Trabajos previos estimaron una deficiencia en la expresión de endoglina en la superficie de monocitos en cultivo y células endoteliales de pacientes HHT1 y, aunque en menor grado, también se observó una deficiencia en las células aisladas de pacientes HHT2 (Fernandez-L *et al.*, 2005; Fernandez-L *et al.*, 2006; Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004). En pacientes HHT1, la expresión de endoglina se encuentra reducida en aproximadamente un 50% en la superficie celular, agravándose dicha deficiencia con la edad y la severidad de la enfermedad (Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004). En HHT2, los niveles de endoglina en membrana pueden encontrarse entre un 90 – 25% de lo expresado en la población control, dependiendo del tipo de mutación, la edad, y la severidad de los síntomas.

La endoglina soluble (sEng) es el resultado de un corte proteolítico en la región extracelular de la proteína. En 2010 se identificó la metaloproteasa de membrana MT1 o MMP14 como la principal metaloproteasa implicada en el corte de endoglina y la liberación al torrente sanguíneo de la isoforma sEng (Hawinkels *et al.*, 2010). Algunos autores indican que el papel de sEng es contrapuesto al ejercido por endoglina de membrana y por tanto ejerce un papel anti-angiogénico (Venkatesha *et al.*, 2006; Hawinkels *et al.*, 2010; Castonguay *et al.*, 2011). De momento no queda muy claro cuál es el efecto del aumento de sEng en sangre sobre procesos fisiológicos aunque algunos datos *in vitro* indicarían que sEng antagonizaría los efectos de la isoforma larga. La hipótesis más aceptada es que sEng funciona secuestrando (función *scavenger*) ligandos circulantes de la familia del TGF- $\beta$  tales como TGF- $\beta$ 1, BMP9 y BMP10 (Venkatesha *et al.* 2006; Hawinkels *et al.*, 2010; Castonguay *et al.*, 2011).

A priori, podría parecer que los niveles reducidos de sEng en plasma serían beneficiosos para el paciente HHT debido a sus propiedades antiangiogénicas. Sin embargo, la deficiencia en la vía de señalización de TGF- $\beta$ 1/ALK1 presente en los pacientes HHT, predomina sobre los posibles efectos beneficiosos de una menor concentración en plasma de sEng. Aún así, cabe la



posibilidad que una reducción en los niveles de sEng en el paciente HHT, sobre todo en el paciente HHT1, tenga implicaciones en la fisiología vascular. Por ejemplo, los niveles elevados de sEng podrían atenuar la respuesta anti-inflamatoria (Dietmann *et al.*, 2009) mediante el secuestro de TGF- $\beta$ 1 por lo que en pacientes HHT1 se pueden encontrar ante una mayor predisposición a padecer enfermedades inflamatorias. Aunque sería esperable que un paciente HHT1 también mostrara un aumento en los niveles de sEng en correlación con el aumento de la angiogenesis y la actividad de las metaloproteasas en un proceso inflamatorio, sería de interés observar que niveles presentan los pacientes de HHT en estas condiciones y compararlos con una población no-HHT, además de observar la evolución de una enfermedad inflamatoria en el contexto de la HHT.

Otro aspecto a tener en cuenta con respecto a los valores de sEng circulantes y HHT es la condición de fumador. En los análisis de evaluación de sEng en plasma, los individuos fumadores fueron eliminados puesto que sus niveles eran superiores a 6 ng/ml, más del promedio observado en la población control (Tabla 8). Con el número de individuos fumadores analizados (n=3) no tenemos datos suficientes para confirmar esta asociación, así que evaluar los niveles de sEng en plasma en una población de individuos fumadores (tanto HHT como no-HHT) sería de interés para conocer otros factores de riesgo. Los niveles de MMP9 y MMP12 están aumentados en los pulmones de individuos fumadores (Crotty Alexander *et al.*, 2015), y estudios *in vitro* indican que el tratamiento con extractos de tabaco induce la expresión de MMP14 en macrófagos (Li *et al.*, 2013). En conjunto, cabría esperar que el aumento de sEng observado en los individuos fumadores fuera el resultado del aumento de expresión de las metaloproteasas, que disminuirían los niveles de expresión de endoglin en la superficie endotelial. Es ampliamente conocido que el hábito al tabaco influye en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, en el paciente HHT tendría otro añadido y es que podría agravar la sintomatología puesto que actuaría en detrimento de la vía de señalización TGF- $\beta$ /ALK1 y por tanto sería esperable una mayor disfunción endotelial en el individuo HHT fumador.

### 1.5 Búsqueda de nuevos biomarcadores para HHT

La identificación de nuevos componentes solubles en plasma que permitan realizar un panel con varios componentes, aumentaría el valor predictivo del diagnóstico bioquímico que hemos establecido. A su vez, sería interesante correlacionar los niveles de algunos componentes angiogénicos con la severidad de algunos aspectos de la clínica HHT como las epistaxis o los sangrados gastrointestinales. De acuerdo con algunos estudios realizados en un modelo animal, la persistencia de la fase de activación de la angiogenesis puede ser la

responsable de una mayor producción de diversos factores angiogénicos, en particular del VEGF en HHT (Oh *et al.*, 2000). Se ha postulado que el aumento notable de VEGF circulante esté relacionado con la presencia de epistaxis severas o sangrados gástricos en la infancia (Giordano *et al.*, 2009). Sin embargo, no se ha observado una clara relación entre presencia de MAVs en órganos internos y niveles de VEGF circulante. El VEGF se ha analizado en varias ocasiones en la población HHT encontrándose generalmente altos niveles en plasma aunque existe una variabilidad entre las diferentes determinaciones (Tabla 1). En diversas publicaciones no queda bien establecido si los niveles de VEGF elevados en algunos individuos son el desencadenante de la aparición de MAVs, o bien el aumento en sangre de VEGF es el reflejo de una actividad angiogénica descontrolada como en epistaxis y sangrados GI. Un estudio realizado en niños no observó diferencias en los niveles de VEGF circulantes entre la población HHT y la población control, sin embargo un niño hospitalizado con sangrados GI presentaba unos niveles elevados de VEGF en sangre (Giordano *et al.*, 2009). Aunque VEGF probablemente no pueda ser establecido como un marcador temprano de HHT, sería de interés establecer su relación con la penetrancia de la sintomatología y su severidad. Finalmente, conocer los niveles plasmáticos de VEGF supone una ventaja antes de iniciar una terapia anti-angiogénica con Avastin (anticuerpo anti-VEGF) ya que dependiendo de los niveles iniciales se podría pautar dosis de Avastin adecuadas. Por otra parte, la determinación de los niveles de VEGF circulantes en los pacientes tratados con Avastin durante el tiempo de retirada del fármaco, puede ayudar a controlar la duración del efecto antiangiogénico.

Los niveles de TGF- $\beta$ 1 reportados en la población HHT muestran una gran variabilidad, tanto dentro de la población HHT como los hallados en la población control (Tabla 1). El tipo de muestra analizada (suero o plasma), la discriminación entre la forma latente y la activa, la variabilidad interindividual, la contaminación de las muestras con el TGF- $\beta$ 1 liberado por las plaquetas, entre otros, pueden estar influenciando en la variabilidad observada. Es por ello que debido a su poca reproducibilidad, de momento, el TGF- $\beta$ 1 no es un candidato muy apropiado como biomarcador en HHT.

El uso de miRNAs como biomarcadores en diversas patologías ha aumentado en los últimos años (Botella *et al.*, 2015), pero en la actualidad, su aplicabilidad para establecer un diagnóstico rápido y eficaz probablemente no es viable en muchos laboratorios de análisis clínico en la mayor parte de hospitales debido a su complejidad y los bajos niveles de miRNAs en plasma. Aún así, no dejan de presentar un especial interés debido a que serían posibles candidatos para establecer futuras terapias en diversas enfermedades (van Rooij *et al.*, 2014). En este contexto, el miR-205 que presenta efectos antiproliferativos y antimigratorios y,

dificulta la formación de tubos en cultivo de células endoteliales, es un posible candidato para establecer una terapia antiangiogénica en HHT que normalizara la vasculatura anómala presente en los pacientes.

## 2 Alteraciones inmunológicas en pacientes HHT

### 2.1 Procesos infecciosos asociados al síndrome HHT

A partir de la revisión de las historias clínicas de los pacientes HHT que acudieron al centro de referencia en España (Hospital de Sierrallana) son varios los procesos infecciosos detectados y de diferente naturaleza. En concreto, han sido detectados 5 casos de abscesos cerebrales que suponen una incidencia del 2,7% en la población HHT, muy superior a lo estimado en la población general que se estima sea inferior al 0,02% (Nicolosi *et al.*, 1991; Dupuis-Girod *et al.*, 2007). La mayor incidencia de abscesos cerebrales en la población HHT está en concordancia con estudios previos dónde se establece que los pacientes HHT presentan una mayor predisposición a desarrollar abscesos cerebrales (Hall, 1994; Dong *et al.*, 2001; Shovlin *et al.*, 2008(b); Mylona *et al.*, 2012). La causa más probable es que la presencia de MAVs pulmonares facilite la diseminación de bacterias a través de la circulación debido a que no pasan por el filtrado de la red capilar, o bien las bacterias proliferan en zonas isquémicas del cerebro como consecuencia de un trombo que atraviesa el filtro pulmonar por la existencia de fístulas (Shovlin *et al.*, 2010). Sería esperable por tanto una mayor incidencia de abscesos cerebrales en pacientes HHT1 puesto que presentan una mayor incidencia de MAVs pulmonares en comparación con la población HHT2 (Berg *et al.*, 2003). En la población analizada todos los pacientes eran portadores de mutaciones en *ENG*, por lo que nosotros también hemos observado una clara predisposición de los pacientes HHT1 a desarrollar abscesos cerebrales en comparación con la población HHT2 en la que no hemos registrado ningún caso. Un dato remarcable es que el desarrollo de abscesos cerebrales no parece estar potenciado por el hábito de fumar en la población analizada, en contraposición con otros estudios dónde se había encontrado una mayor incidencia de abscesos cerebrales en pacientes HHT fumadores (Silva *et al.*, 2013). Un aspecto llamativo es que una paciente desarrolló un absceso cerebral en ausencia de MAVs pulmonares observables, si bien las microfístulas son también una vía de paso, pero además presentaba una MAV hepática. El análisis microbiológico identificó *Peptrostreptococcus* y *Bacteroides fragilis*. *Peptrostreptococcus* es una bacteria gram+ que se localiza en boca, piel y forma parte de la flora intestinal. *B. fragilis* es una bacteria gram(-) que se localiza en la flora humana del colon y es el causante del 90% de las infecciones de origen intestinal como las peritonitis, donde *Peptrostreptococcus* también

es uno de los microorganismos habituales (Brook *et al.*, 2008). Las bacteremias de origen dental son consideradas una de las principales causas de abscesos cerebrales en pacientes HHT (Shovlin *et al.*, 2008) ya que la naturaleza de los microorganismos aislados es predominantemente microorganismos microaerófilos y bacterias anaerobias características de las infecciones endo y periodontales (Shovlin *et al.*, 2008(b); Mathis *et al.*, 2012). Dichos microorganismos pasarían a través de las MAVs pulmonares colonizando así el tejido cerebral. Sin embargo, el origen del absceso cerebral en la paciente HHT1 de 43 años es probablemente intestinal y estaría relacionado con la presencia de una MAV hepática identificada en la paciente. Si bien, cabe destacar que en algunos abscesos cerebrales cuyo origen ha sido atribuido a un proceso dental, se han aislado *Peptostreptococcus* spp y *Bacteroides* spp (Shovlin *et al.*, 2008(b)). Hasta la fecha, éste sería el primer caso reportado en HHT en el que un absceso cerebral tendría un origen intestinal, donde los microorganismos presentes en la circulación portal hepática se diseminarían por la circulación sistémica a través de la MAV presente en hígado. Aún así, es obligatorio el paso pulmonar para llegar al cerebro, por lo que probablemente la paciente presentaba microfístulas pulmonares que pasan inadvertidas en las pruebas diagnósticas de paso de burbujas o *Ecobubble*. En la gran mayoría de abscesos cerebrales presentes en la cohorte HHT analizada, el microorganismo no ha sido identificado, pero todos ellos presentaban una MAV pulmonar por lo que una infección de origen bucal sería la teoría más aceptable.

En referencia a las infecciones extracerebrales de mayor interés en el contexto de la HHT, se ha identificado un total de 6 casos de osteomielitis (3,2 %), 3 casos de abscesos cutáneos (<2%) , 7 casos de infecciones relacionadas con el aparato digestivo (3,8%) y 1 endocarditis (0,5%). En 2 de 3 casos de osteomielitis el agente causal fue el patógeno oportunista *S. aureus*, en concordancia con previos estudios donde se ha observado que osteoartritis, septicemias y espondilodiscitis están asociadas a infecciones por *S. aureus* (Blanco *et al.*, 1998; Duval *et al.*, 2001; Dupuis-Girod *et al.*, 2007). Un dato a resaltar es la espondilodiscitis que se presentó en una paciente HHT2 secundaria a un episodio de tuberculosis que tuvo lugar con varios años de anterioridad. Este tipo de “reactivaciones” del patógeno son características de individuos inmunodeficientes y, la recurrencia de infecciones extracerebrales en pacientes HHT ha sido reportada por otros autores (Musso *et al.*, 2014). Varios autores indican que las infecciones recurrentes que ellos observaban eran principalmente debidas a *S. aureus*, un colonizador típico de la mucosa nasal (Duval *et al.*, 2001; Dupuis-Girod *et al.*, 2007) y estarían relacionadas con una duración mayor de las epistaxis. Además, las infecciones por *S. aureus* podrían relacionarse con el taponamiento

nasal usado para epistaxis severas, ya que el taponamiento puede causar lesiones en la mucosa nasal que favorecerían la proliferación de *S. aureus* (Dupuis-Girod *et al.*, 2007). Tanto en abscesos cutáneos como en infecciones asociadas al sistema digestivo como úlceras y peritonitis, podemos concluir que estas afectarían por igual a pacientes HHT1 y HHT2, y a excepción de 1 caso todos ellos presentan afección de algún órgano interno. La mayor incidencia de úlceras o peritonitis podría estar relacionada con la presencia de telangiectasias en la mucosa gástrica. Sin embargo no parece ser un factor de riesgo los sangrados GI puesto que sólo estaban presentes en una paciente de 35 años (tabla 13). Sería interesante para estudios futuros observar si la presencia de sangrados GI podría favorecer la aparición temprana de úlceras y/o peritonitis debido a que la paciente de 35 años era una de las más jóvenes (superada sólo por un paciente HHT2 de 26 años que también presentaba una MAV hepática), siendo el promedio de aparición en la población analizada de 41 años. Finalmente, registramos un caso de endocarditis causada por *S. viridans* en un paciente HHT2. El origen más probable de la infección es la MAV hepática que probablemente ha facilitado la diseminación de la bacteria a la circulación sistémica, colonizando el tejido cardíaco ya que es el primer paso tras la salida de la sangre venosa hepática. No es un caso fortuito, que el individuo afectado de endocarditis sea un paciente HHT2, ya que la incidencia de MAVs hepáticas es mayor en estos pacientes que no en los pacientes HHT1 (Letteboer *et al.*, 2006).

Una condición que debería tenerse en cuenta es la edad de inicio de las infecciones cerebrales y extracerebrales en la población HHT. En la bibliografía no hay publicaciones donde se haya especificado cual es el promedio de edad relacionado con la aparición de diversas infecciones, sin embargo, es probable que sea más temprana en la población HHT. En contraposición con ello, Musso y colaboradores (2014) indicaban que los pacientes HHT con complicaciones extracerebrales eran de avanzada edad, frágiles y afectados de otras dolencias. Sin embargo, en la población HHT analizada no se observa una mayor predisposición a desarrollar infecciones severas en relación con una mayor edad del paciente, sino que parece ser todo lo contrario; la condición HHT estaría favoreciendo la aparición temprana de infecciones. En abscesos cerebrales la edad promedio de aparición es de 37 años, en infecciones extracerebrales (excluyendo las del aparato digestivo) es de 48,8 años y en infecciones asociadas al sistema digestivo nos encontramos con un promedio de 41 años.

En conclusión, hemos observado que la HHT está asociada a una mayor incidencia de enfermedades infecciosas. Aún así consideramos que el estudio realizado en base a la historia clínica puede estar subestimando la incidencia real de infecciones severas en la población HHT: en determinados casos las infecciones fueron diagnosticadas y tratadas en el Hospital de

Sierrallana y, en otras ocasiones las infecciones eran referidas por el paciente. Si el paciente HHT ha sido admitido en el Hospital de Sierrallana para su seguimiento y proviene de otra comunidad autónoma, es probable que no todas las alteraciones infecciosas hayan sido reflejadas en la historia clínica.

Es por ello, que la condición HHT debería de ser considerada no sólo un riesgo para la aparición de hemorragias internas derivadas de las MAVs presentes en órganos internos, sino también un factor de riesgo para la aparición de infecciones de alto riesgo para el individuo como abscesos cerebrales, osteomielitis, sepsis y endocarditis. Además de ello, el paciente HHT presenta una mayor recurrencia de infecciones tanto severas como de menor riesgo para la vida del individuos como son las úlceras, peritonitis y abscesos cutáneos.

## 2.2 El mayor riesgo de infecciones severas y/o infecciones recurrentes en HHT es independiente de una IP.

Las inmunodeficiencias primarias (IP) deben sospecharse en personas que tienen “demasiadas infecciones” causadas por patógenos normales, infecciones recurrentes o crónicas (difíciles de erradicar) e infecciones por gérmenes oportunistas o no habituales. También se debería descartar la IP en cualquier persona que haya presentado dos o más infecciones graves que hayan supuesto una amenaza para su vida (Ruiz-Contreras *et al.*, 2003). A menudo, es posible acercarse al diagnóstico de una IP mediante pruebas sencillas de laboratorio como el hemograma, el perfil bioquímico general, la cuantificación de inmunoglobulinas y la radiología de tórax (Ruiz-Contreras *et al.*, 2003). Las IP tienen una incidencia que oscila entre 1/10.000 – 1/100.000 de los nacidos vivos. Las manifestaciones clínicas de una IP se inician, casi siempre, en algún momento de la primera infancia. Sin embargo, no es excepcional que alguna de éstas comience a manifestarse en niños mayores o incluso en adultos (Sicherer *et Winkelstein*, 1998), como sucede con los déficit aislados de IgA. Es por ello que de forma paralela al estudio de las historias clínicas, se ha tenido en cuenta los análisis hematológicos y bioquímicos generales de los pacientes HHT y, la valoración de las inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA.

El valor promedio del recuento de leucocitos totales y de sus subpoblaciones estaba dentro de los rangos de referencias para ambos tipos de HHT (Tabla 15). Si bien, algunos pacientes estaban por debajo del límite de normalidad para leucocitos total (11-12% HHT2; 4% varones HHT1), granulocitos (6,5 – 17,8% HHT2; 4% mujeres HHT1) y linfocitos (16 – 16,7% HHT1; 16,1% varones y 4,4% mujeres HHT2). En relación a la deficiencia en linfocitos, un estudio realizado en pacientes HHT en Francia, reveló que en la cohorte HHT analizada no se

observó ninguna variación en el número de linfocitos B pero sí una linfopenia derivada de un menor número de linfocitos CD4 y CD8 y, de células NK (Guilhem *et al.*, 2013). Resulta llamativo el número de pacientes HHT con linfopenia, alrededor de un 43% y tres veces mayor de lo que hemos observado en nuestra población. Una linfopenia asociada a HHT también ha sido reportada en pacientes con abscesos cerebrales (Mathis *et al.*, 2012). El origen de la linfopenia descrito por otros autores y que también hemos observado nosotros, muy probablemente es adquirido ya que en ratones *Eng<sup>+/-</sup>* no se ha observado una diferencia en linfopoyesis pero sí en mielopoyesis (Cho *et al.*, 2001). Guilhem y colaboradores indican que la causa probable de la linfopenia observada en la población HHT sea secundaria al suplemento con hierro ya que el 72% de los pacientes con linfopenia recibía una terapia de hierro frente al 29% de los pacientes HHT que presentaban unos valores normales de linfocitos en sangre. Los autores descartan que la linfopenia esté asociada a una elevada tasa de pérdida de sangre o anemia. En nuestra población faltaría por correlacionar si en el momento del análisis los pacientes HHT estaban recibiendo un suplemento de hierro, pero de momento esos datos no son accesibles. Sí que hemos observado una mayor prevalencia de anemia (Hb<12,0 g/dl) en los individuos HHT de la cohorte analizada que presentaban linfopenia (57,69%), el doble de individuos con anemia de lo observado en pacientes HHT con un recuento de leucocitos normal (23,42%). Los individuos con anemia, muy probablemente estaban recibiendo una terapia con hierro que podría estar afectando a los linfocitos, sin embargo no tenemos explicación para aquellos individuos con unos niveles de hemoglobina y hierro normal y que presentaban linfopenia.

La IP debida a IgA (<5 mg/dl) tiene una incidencia notable en la población, entre 1/200 – 1/1000, por lo que, debido a su relativa frecuencia, podría estar presente en los pacientes HHT que presentan una mayor incidencia de infecciones. La mayor parte de los pacientes con deficiencia selectiva de IgA son asintomáticos. Un grupo de ellos, sin embargo, tiene infecciones recurrentes y se ha especulado que puede tener otras deficiencias asociadas de anticuerpos o que son formas que evolucionarán a inmunodeficiencia variable común. Entre un 30-40% de los pacientes con deficiencia sintomática de IgA tienen autoanticuerpos en su suero y un aumento del riesgo de padecer lupus eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide y enfermedad celíaca. Este tipo de IP entre otras ha sido descartado. Los niveles de IgA, IgG e IgM estaban dentro del rango de normalidad para cada inmunoglobulina, a excepción de 3 pacientes que presentaban una concentración en sangre por encima del rango de referencia. Esta alteración, lejos de estar asociada a una inmunodeficiencia, muy probablemente es debida a una infección en curso de poca relevancia en el momento del

análisis. Guilhem y colaboradores (2013) observaron una deficiencia en IgM en pacientes HHT que en su historia clínica presentaban al menos un caso de infección severa, entendiéndose por severa si ha requerido hospitalización. En la cohorte HHT analizada no se ha observado ningún paciente que presente deficiencias en los niveles de IgM, ni en los de IgG o IgA, pero sería recomendable ampliar el tamaño de la población analizada para poder definitivamente descartar una posible deficiencia en Igs como la observada por Guilhem y colaboradores.

### 2.3 Medidas preventivas en HHT: profilaxis, vacunación, transfusiones y fármacos.

#### 2.3.1 Profilaxis antibiótica

Con el fin de prevenir el desarrollo de abscesos cerebrales en pacientes HHT que presentan MAVs pulmonares, la *British Society for Antimicrobial Chemotherapy and Dental Formulary Sub-Committee* ha recomendado el uso de una profilaxis antibiótica en pacientes HHT que se sometan a intervenciones dentales (Shovlin *et al.*, 2008(a)). A pesar de la controversia existente en el uso de la profilaxis antibiótica ante procesos dentales para la prevención de endocarditis bacterianas, la profilaxis antibiótica previa a los procesos dentales en pacientes HHT sigue recomendándose debido a su elevada asociación.

A medida que se vaya profundizando en el conocimiento del agente causal y el origen de determinadas infecciones severas en la población HHT, probablemente la profilaxis antibiótica se recomiende para otros procesos médicos además de los procesos dentales o bien no sea recomendada únicamente a pacientes HHT con MAVs pulmonares. En referencia a esto último, se encuentra el caso de la paciente HHT de 43 años que desarrolló un absceso cerebral y no presentaba MAVs pulmonares pero sí una MAV hepática. O bien, aunque no incluido en el apartado de resultados de la presente tesis porque está en elaboración, recientemente hemos detectado un caso de septicemia en una paciente HHT1 en el que el patógeno aislado era *Candida albicans*. La paciente estuvo hospitalizada durante más de 4 semanas en coma inducido en la UCI. La paciente refirió haberse realizado un frotis vaginal en consulta ginecológica 4 o 5 días anteriores a los episodios de fiebre. Este hecho nos estaría indicando que otro tipo de procesos de ámbito clínico podrían suponer un riesgo a desarrollar infecciones severas como una sepsis y, probablemente una profilaxis antibiótica sería recomendable. O en su defecto asesorar al paciente para ante cualquier percepción de estado febril tras una intervención dental o consulta ginecológica en la que se haya realizado un frotis vaginal, debería de acudir al médico en la mayor brevedad posible para prevenir una complicación grave en caso de diagnosticarse un absceso cerebral u otra infección severa.



### 2.3.2 Vacunación

Antes de proceder a establecer un plan de vacunación preventiva en HHT es importante descartar que la predisposición a infecciones en pacientes HHT observada, no estaba vinculada a una IP. En pacientes sospechosos de IP no se deben administrar vacunas de virus vivos (Ruiz-Contreras et al 2003). Las IP han sido descartadas en la cohorte HHT analizada. En relación a ello, recientemente se ha publicado una serie de vacunas que serían recomendables en la población HHT adulta e infantil, incluyendo vacunas que no están cubiertas por nuestro Sistema Nacional de Salud (SNS), pero que deberían de administrarse en los pacientes HHT al ser considerados una población de riesgo (Rodríguez-García et al., 2015). Sin embargo sería interesante evaluar los efectos de la vacuna BCG (*Bacillus* de Calmette y Guérin o vacuna contra la tuberculosis) en la población HHT infantil, debido a que en niños con deficiencias del sistema fagocítico, esta vacuna está contraindicada (Comité Asesor de Vacunas de la AEP, 2001). A pesar de que se ha observado una deficiencia en la actividad fagocítica en células de pacientes HHT (Cirulli et al., 2006) y una deficiencia fagocítica en macrófagos de ratón deficientes en endogлина (Figura 55), no es esperable que haya efectos sobre el paciente HHT vacunado ya que la vacuna se prepara a partir de extracto atenuado de *Mycobacterium bovis* y, la actividad fagocítica reportada en pacientes HHT o en los macrófagos de ratón, está afectada pero no anulada. Aún así, debido a la variabilidad interindividual sería interesante observar a nivel clínico la evolución de niños HHT a los que se le ha administrado la vacuna BCG.

### 2.3.3 Fármacos

El corte de endogлина de membrana de las células endoteliales está potenciado por la citoquina TNF- $\alpha$  (Li et al., 2003), por lo que los niveles de endogлина ya disminuidos en los pacientes HHT1 (y en menor medida en los pacientes HHT2) (Sanz-Rodríguez et al., 2004; Fernández-L et al., 2005) combinados con un proceso inflamatorio incrementan el riesgo de generar células endoteliales con una cantidad de endogлина insuficiente o bien nula durante el proceso inflamatorio. Este efecto transitorio llamado fenotipo “*endoglin protein null*” aumentaría los riesgos de desarrollar una lesión vascular. Es por ello que las terapias antiinflamatorias con fármacos anti-TNF $\alpha$  podrían ser beneficiosas ya que podrían disminuir el corte proteolítico de endogлина dando lugar a un efecto beneficioso en los pacientes HHT1. Esta aproximación de momento no sería útil para pacientes HHT2 puesto que aún quedan incógnitas por descubrir sobre el efecto de los estímulos inflamatorios en ratones *Acvr11<sup>-/-</sup>*. Sin embargo, una disminución de los niveles de endogлина en la superficie de las células endoteliales en pacientes HHT2 se sumaría al detrimento en la vía de señalización TGF-

$\beta$ /Alk1/Smad1/5 *per se* deficiente en HHT2. Sea con el fin de una nueva terapia en estudio para pacientes HHT1, como para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria crónica en el paciente HHT, el tratamiento debe aplicarse bajo supervisión médica y antes de iniciarlo descartar que no haya ninguna infección latente o activa, ya que los anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  tienen un efecto potente sobre la respuesta inmunitaria.

El tratamiento con el agente inmunosupresor tacrolimus (FK506), de uso común en pacientes que han recibido un trasplante, es una terapia farmacológica con grandes expectativas para la disminución de epistaxis, telangiectasias y sangrados GI en el paciente HHT (Albiñana *et al.*, 2011). Los autores sugieren elegir al tacrolimus como inmunosupresor de elección en pacientes transplantados, debido a su efecto positivo, no sólo en la inmunosupresión, sino en la mejoría de los síntomas relacionados con la HHT: epistaxis, telangiectasias, tal y como se observó en el caso de una paciente HHT transplantada de hígado y tratada con tacrolimus como agente inmunosupresor. De igual modo que en el caso de los fármacos basados en terapias anti-TNF- $\alpha$ , un posible ensayo clínico para analizar los efectos del tacrolimus sobre individuos HHT que cursan con epistaxis o sangrados GI severos que afectan su calidad de vida, debería ser controlado de forma exhaustiva para evitar el desarrollo de infecciones severas en los pacientes HHT que iniciaran el ensayo. En este sentido se ha iniciado un tratamiento para la hipertensión pulmonar primaria con dosis bajas de Tacrolimus, por debajo de las necesarias para conseguir un efecto inmunosupresor total y que se traduce en una mejora de la hipertensión. En este grupo de pacientes hay reclutado un paciente HHT2 ya que ciertas mutaciones en *ACVRL1* (exón 10) predisponen a hipertensión pulmonar primaria. El ensayo preliminar ha llevado a considerar el tacrolimus como medicamento huérfano para la hipertensión pulmonar primaria por la FDA (Sponsor *Selten Pharma, Inc; 14435C Big Basin Way #246;Saratoga, CA 95070*).

#### 2.3.4 Modificación de las guías internacionales de manejo del paciente HHT.

La guía internacional para el diagnóstico y manejo del paciente HHT describe el consenso alcanzado por diversos profesionales (clínicos y genéticos) especializados en HHT para establecer las técnicas de diagnóstico y de prevención de las complicaciones médicas asociadas al síndrome, al igual que se enumeran los tratamientos más aceptados para epistaxis, sangrados GI, MAVs pulmonares, hepáticas y cerebrales (Faughnan *et al.*, 2009). Aunque se han reportado varios estudios sobre la incidencia de infecciones en pacientes HHT (Dupuis-Girod *et al.*, Guilhem *et al.*, 2013) y varios *case reports* que especifican la naturaleza de las infecciones, su evolución y el tratamiento aplicado para resolverla, aún no se ha llegado a un consenso oficial del método preventivo, del método de diagnóstico o del tratamiento para

infecciones severas en HHT. En un futuro sería de interés para la mejora de calidad de vida del paciente HHT ampliar las guías internacionales añadiendo un apartado sobre infecciones. Por ejemplo, el tratamiento con antibióticos en un paciente HHT al que se le ha diagnosticado un absceso cerebral, debería de ser diferente al que se utiliza en la población general puesto que la naturaleza de los microorganismos causantes es diferente (al menos mientras que se identifique el microorganismo implicado). Los abscesos cerebrales de la población HHT están caracterizados por la presencia de gérmenes aneróbicos (como *Sptreptococcus* spp.) y, en los casos en que el absceso cerebral tenía recidivas, el principal agente causal es *Staphylococcus* spp. Sin embargo, la población control que desarrolla abscesos cerebrales, presenta unas características clínicas y bacteriológicas diferentes con más localizaciones cerebrales únicas (*more solitary brain localizations*), ausencia de infecciones por *Staphylococcus* y un intervalo de recurrencia significativamente mayor (Mathis *et al.*, 2012). En el caso de infecciones extracerebrales aún faltaría información para poder profundizar en la relación entre la localización de las MAVs en órganos internos y el tipo de infección, pero una puesta en común mejoraría el conocimiento de estas afecciones en el paciente HHT y sentaría las bases para analizar en detalle dichas afecciones.

### 3 La haploinsuficiencia en endogлина y Alk-1 altera la expresión de genes implicados en la respuesta inmune

#### 3.1 Evidencias previas de una alteración inmunológica en pacientes HHT.

A pesar que varias publicaciones sugieren que los pacientes HHT presentan una mayor predisposición a desarrollar procesos infecciosos que en algunos casos dan lugar a complicaciones serias para la salud como abscesos cerebrales, septicemia u osteomielitis, su función inmunológica no ha sido analizada en detalle. Existen algunos detalles claves que hacen sospechar una deficiencia en la respuesta inmune de los pacientes de HHT, por ejemplo la evolución de los abscesos cerebrales. Por lo anteriormente expuesto, es evidente la relación entre la presencia de una MAV pulmonar y el desarrollo de un absceso cerebral (Shovlin *et al.*, 2008(b)). Sin embargo, en un estudio realizado en 1994, se observó que los pacientes de HHT con abscesos cerebrales presentaban una mayor mortalidad (40%) que la observada en la población general (Hall, 1994). Afortunadamente, gracias al avance en técnicas diagnósticas y al seguimiento especializado de los pacientes de HHT en los centros de referencia, la supervivencia frente a un absceso cerebral ha aumentado de forma espectacular siendo prácticamente del 100%. No obstante, en el 80% de los casos el individuo no ha podido incorporarse a su puesto de trabajo debido a deficiencias neurológicas persistentes (Shovlin *et*

*al.*, 2008(b)) y, en su conjunto, estos datos hacen especular que una posible deficiencia en la respuesta inmunitaria podría estar contribuyendo a la evolución y recuperación del absceso cerebral. Además de esto, la recurrencia en procesos infecciosos observada por varios autores indican que factores asociados con una deficiencia en el sistema inmune explicarían el mayor riesgo de infecciones en HHT.

Además de los datos a nivel clínico, otro aspecto importante es que la expresión de Endogлина y Alk-1 se induce durante la transición monocito-macrófago y esta inducción presenta dos características: por un lado es dependiente de la edad, viéndose afectada en células de individuos en edad avanzada y, por otro lado, su inducción es deficiente en las células de pacientes HHT (Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004). Endogлина y Alk1 son dos miembros del sistema de señalización de TGF- $\beta$  y sus funciones en el sistema vascular mediante la regulación de la señalización de TGF- $\beta$  están bien establecidas. TGF- $\beta$  es una citoquina pleiotrópica con un papel esencial en la regulación del sistema inmune, por lo que sería esperable que la expresión de endogлина y Alk1 en el macrófago estuviera influenciando la respuesta de estas células a TGF- $\beta$ . Así pues, no es de extrañar que la haploinsuficiencia en endogлина y ALK1 en el macrófago de los pacientes HHT tuviera efectos a nivel de la respuesta inmunitaria. Con el fin de evaluar si existen funciones en el macrófago de pacientes HHT que pudiesen verse alteradas por la haploinsuficiencia en endogлина y Alk-1, uno de los objetivos planteados fue analizar la expresión génica en macrófagos diferenciados *in vitro* a partir de la fracción de MNCs de muestras de sangre periférica de pacientes HHT y de donantes sanos no HHT.

### 3.2 Expresión génica diferencial y alteración de procesos biológicos.

El análisis de la expresión génica en macrófagos mediante la técnica de *microarrays* de ADN, nos ha permitido identificar genes cuya expresión se ve alterada en células de pacientes HHT. Se analizaron las dianas comunes entre ambos tipos de HHT en comparación con las muestras de individuos control, con el objetivo de encontrar dianas comunes en HHT que pudieran explicar una posible alteración de la respuesta inmunitaria. La fracción de MNCs de sangre periférica está constituida principalmente por linfocitos T, monocitos y macrófagos. También se localizan pequeñas poblaciones de células NK, DCs y progenitores endoteliales (EPCs, *endothelial progenitor cells*) (Isner *et al.*, 2001). La expresión de ALK-1 en leucocitos de sangre periférica no ha sido analizada en profundidad, pero endogлина no se expresa en leucocitos circulantes a excepción de una pequeña fracción de linfocitos T CD4 activados (Schmidt-Weber *et al.*, 2005). La muestra se enriqueció en monocitos mediante su selección por adherencia a placa y se mantuvieron durante 48 horas en cultivo para asegurarnos unos

niveles de expresión de endoglina y ALK-1 considerables puesto que el monocito en circulación no expresa endoglina (O'Connell *et al.*, 1992; Lastres *et al.*, 1992; Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004).

El análisis de la expresión génica diferencial en macrófagos de pacientes HHT mostró que 27 genes estaban inducidos y 184 estaban reprimidos en comparación con las células provenientes de donantes sanos (Anexo 1, Tabla 2 y 3). El listado de genes inducidos es bastante discreto y en su mayoría constituido por genes implicados en el metabolismo o reparación del ADN. El número de anotaciones de genes codificantes para las distintas subunidades de hemoglobina es el más elevado con un total de 9 anotaciones. La hemoglobina se sintetiza principalmente en los precursores eritroides en MOR, pero un estudio reciente muestra que las MNCs en condiciones de hipoxia o estrés oxidativo inducen la expresión de hemoglobina como un mecanismo protector (Brunyanszki *et al.*, 2015). La presión parcial de O<sub>2</sub> en los pacientes HHT suele estar disminuida debida a la presencia de MAVs pulmonares, por lo que podría estar incidiendo sobre la inducción de genes codificantes de hemoglobina en las MNCs y, probablemente, la anemia crónica que se presenta en gran parte de los pacientes HHT debido a los sangrados nasales y GI, podría estar contribuyendo. Además de esto, algunos autores indican que el paciente HHT presentaría un estado inflamatorio persistente que estaría infravalorado, por lo que las células se verían sometidas a un mayor estrés oxidativo que las de un individuo sano (Dingenouts *et Goumans*, 2015). Sería de interés analizar dichas posibles relaciones pero no hemos profundizado en ellas debido a que objetivo principal era analizar genes que estuvieran directamente relacionados con la respuesta inmune.

En el caso del listado de genes reprimidos, en una amplia mayoría son genes relacionados con la respuesta inmune. Tanto es así que el análisis de enriquecimiento funcional del listado de genes inducidos no encontró ninguna función en procesos biológicos afectada, pero la represión de genes en macrófagos de pacientes HHT altera diferentes procesos biológicos relacionados con la respuesta inmune (Anexo 1, Tabla 4). Mas del 81,4% de los genes reprimidos están involucrados en Procesos del Sistema Inmune (GO:0002376), incluyendo la respuesta inmune humoral, la inmunidad innata, activación de leucocitos y respuesta inflamatoria entre otros.

Debido a su interés y la facilidad de su valoración mediante kits de ELISA, los niveles de producción *in vitro* de diversas citoquinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12p40, la quimioquina CCL20, así como TSP-1, fueron analizados. Además de estas proteínas cuyos genes estaban reprimidos, en los análisis se incluyó la valoración de Activina A. Activina A es una citoquina perteneciente a la familia del TGF- $\beta$  que tiene la capacidad de inducir el fenotipo

proinflamatorio en macrófagos inhibiendo la adquisición del fenotipo antiinflamatorio (Sierra-Filardi *et al.*, 2011). Frente a un estímulo inflamatorio como el LPS, se induce la producción de citoquinas proinflamatorias o de la respuesta Th1. Las células de pacientes HHT fueron significativamente menos eficientes en la producción de IL-1, IL-6, IL-12p40, CCL20 y Activina A frente a un estímulo inflamatorio en comparación con las células control. A nivel basal (sin LPS), también se observó una menor producción de TSP-1. La disminución en IL-1, IL-6, IL-12p40, CCL20 y Activina A claramente estará afectando la respuesta inmune Th1, relacionada con una inmunidad celular fuerte y frente a patógenos intracelulares, hecho que podría estar relacionado con la mayor incidencia de infecciones y su recurrencia en los pacientes HHT. La deficiencia en la producción de TSP-1, también estaría participando en una deficiente respuesta inmune en el paciente HHT. El papel de TSP-1 en la respuesta inmune quedó patente cuando se generó un modelo de ratón deficiente en *Thbs1*, ya que presentaba un fenotipo similar, aunque más suave y menos agresivo, al mostrado por los ratones deficientes en *Tgfb1*. Uno de los motivos sería que trombospondina 1 (THBS1) interviene en la activación y liberación del TGF- $\beta$  maduro (Crawford *et al.*, 1998).

### 3.3 Genes de interés para validaciones futuras.

Debido a la accesibilidad a muestras de sangre fresca de pacientes HHT, no todos los genes de interés han podido ser validados. Para ensayos futuros sería procedente la validación de otros genes y los procesos biológicos a los que afectan mediante otras técnicas. Si bien la accesibilidad a las muestras de pacientes va a ser siempre una dificultad a superar puesto que se trata de una enfermedad rara, una posibilidad es realizar futuros ensayos en líneas celulares humanas mieloides o bien en macrófagos diferenciados a partir de monocitos aislados de *buffy coats* y, analizar el efecto en la deficiencia de endoglina o ALK-1 mediante técnicas de silenciamiento con siRNAs o dsRNAs, o bien mediante el uso de anticuerpos dirigidos frente a endoglina o ALK-1. La sobreexpresión de las isoformas L- y S-endoglina en la línea promonocítica humana U937 ha demostrado que la sobreexpresión de la isoforma S-endoglina está relacionada con la inmunosenescencia y en comparación con las células que sobreexpresan L-endoglina, se observa una disminución en la proliferación celular y una menor capacidad de supervivencia frente al estrés oxidativo (Aristorena *et al.*, 2014). Posteriormente se ha observado que la sobreexpresión de L-endoglina promueve la síntesis de Activina A mientras que en células transfectadas con S-endoglina la síntesis de Activina A es deficiente (Blanco *et al.*, 2015).

En el listado de genes reprimidos se ha identificado *CFB* y *C3*, dos genes que codifican proteínas del sistema del complemento. El sistema del complemento es uno de los pilares de

la respuesta inmune innata ya que promueve la inflamación y la destrucción de microorganismos (Abbas *et Lichtman*, 2004). Es por ello que el déficit en factores del complemento da lugar a diversas afecciones. Por ejemplo, el déficit en los primeros factores del complemento (C1q, C1r, C1s, C2, C3, C4) cursan con infecciones recurrentes por bacterias piógenas (observado en abscesos cutáneos en pacientes HHT) y síndromes reumatoides por inmunocomplejos (Ruiz-Contreras *et al* 2003; Grumach *et Kirschfink*, 2014). Mutaciones de ganancia de función en miembros del sistema del complemento como C3 y CFB dan lugar al síndrome urémico hemolítico atípico (Noris *et al.*, 2007).

Otros posibles candidatos serían *TIFAB*, *FCAR*, *LILRA3* y *CMPK2*. *TIFAB* se asocia con TIFA e inhibe la activación de NFκB mediada por TIFA (Matsumura *et al.*, 2004). *FCAR* (CD89) es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas que codifica el receptor de la región Fc de IgA. El receptor es una glicoproteína transmembrana que se expresa en células mieloides como neutrofilos, monocitos, macrófagos y eosinofilos, donde media la respuesta inmunológica frente a patógenos. Interacciona con las partículas opsonizadas con IgA e induce diversos procesos de defensa inmunológicos como fagocitosis y la estimulación de la producción de mediadores inflamatorios. *LILRA3* codifica un miembro de la familia de inmunoreceptores que se expresan predominantemente en monocitos y células B, y en menores niveles en monocitos y células B. Actúa como un receptor soluble del MHC-I. *CMPK2* probablemente interviene en la diferenciación terminal de células monocíticas.

En los genes reprimidos se han identificado algunos marcadores de secuencia expresada o EST (*Expressed sequence tag*), en una de ellas está ubicado el *MIR146A*. *MIR146A* es NF-κB dependiente y su inducción está mediada por citoquinas proinflamatorias como IL-1b, TNFα y agentes inflamatorios como LPS (Taganov *KD, et al.* 2006). MiR-146 inhibe la señalización via TLRs y de citoquinas. En el cluster de integración de células B (*BIC*), se localiza el *MIR155HA*. MiR-155-5p se expresa en células B y T activadas y en monocitos/macrófagos. MiR-155-5p es uno de los miRNAs mejor caracterizados e interviene en la diferenciación del linaje hematopoiético, la respuesta inmune, inflamación e infecciones virales (Elton *et al.*, 2013). La acción de ambos miRNAs en términos generales sería la inhibición de procesos de la respuesta inmune y por tanto su represión no estaría implicada en una deficiencia en la respuesta inmunitaria, pero la expresión de ambos miRNAs depende de señales inflamatorias por lo que su represión indicaría que estas señales son deficientes en el paciente HHT. Por otro lado, la represión de miRNAs podría ser una adaptación ya que la respuesta está comprometida en HHT, y se tiende a disminuir la expresión de los represores.

En definitiva, el análisis de los *microarrays* de ADN nos ha mostrado una serie de genes reprimidos en los macrófagos de pacientes HHT que intervienen en la respuesta inmune innata, algunos de ellos intervienen en la respuesta inflamatorio y/o directamente en la destrucción de microorganismos facilitando los procesos de fagocitosis. Esto podría explicar la deficiencia observada en fagocitosis en monocitos y PMN de pacientes HHT publicada por Cirulli y colaboradores (2006). Y en su conjunto, la represión de los diversos genes podría explicar la mayor incidencia y recurrencia de infecciones observada en los pacientes HHT.

## 4 Expresión de endoglina en macrófagos de ratón

### 4.1 La transición monocito-macrófago.

El macrófago juega un papel esencial en la modulación de las respuestas locales inflamatorias, el proceso y la presentación de antígeno y la eliminación de restos celulares y células apoptóticas (Unanue *et Allen*, 1987; Verschoor *et al.*, 2012). Los macrófagos tisulares pueden tener dos orígenes, principalmente la población se mantiene por autorenovación a partir de precursores de origen embrionario y, frente a un estímulo inflamatorio, a partir del infiltrado de monocitos de sangre periférica. En términos generales, los monocitos infiltrados sufrirán continuos procesos de diferenciación que al final se traducen en la reposición y reemplazo de los macrófagos de tejido. En este contexto, los monocitos circulantes de sangre periférica son un paso intermedio del proceso de diferenciación. Desde su migración hacia los tejidos a través de la vasculatura, éstas células continúan con su proceso de diferenciación a macrófago maduro. Esta diferenciación se traduce en cambios morfológicos, fenotípicos y funcionales y está influenciada por el ambiente local (Witsell *et Schook*, 1991; Verschoor *et al.*, 2012). Una aproximación a dicho proceso de diferenciación puede imitarse *in vitro* cultivando los monocitos de sangre periférica en la presencia de suero (Musson, 1983; Davies *et Gordon*, 2005). Este proceso de diferenciación es concomitante con la expresión de moléculas asociadas al proceso de maduración que no se expresan en monocitos circulantes pero sí se expresan en macrófagos diferenciados. Estas moléculas no solo son importantes para estudiar el proceso de diferenciación del macrófago, sino también para determinar funciones únicas en el macrófago que no son ejecutadas por el monocito.

### 4.2 Endoglina como marcador de la diferenciación de monocitos de ratón.

En el presente trabajo se ha analizado la expresión de endoglina durante la transición monocito/macrófago de ratón. De hecho, endoglina se identificó hace más de 20 años como una molécula inducida durante la diferenciación monocito/macrófago humano (Lastres *et al.*, 1992; O'Connell *et al.*, 1992). Algunos autores no han podido detectar endoglina en placas



ateroscleróticas de ratón mediante técnicas de inmunohistoquímica y han considerado que los macrófagos de ratón no expresan endoglina (Nachtigal *et al.*, 2012). Diversos autores han analizado y detectado la presencia de endoglina mediante el uso de inmunohistoquímica en tejidos de ratón, identificando claramente su expresión en células endoteliales pero no en macrófagos tisulares (Arthur *et al.*, 2000; Bourdeau *et al.*, 2001; Meurer *et al.*, 2011; Strasky *et al.*, 2011). Recientemente, los transcritos de endoglina en macrófagos de ratón han sido detectados mediante la técnica semi-cuantitativa de RT-PCR (Aristorena *et al.*, 2014). Debido a que los procesos de fijación de los tejidos realizados en la preparación de las muestras para la realización de las técnicas de IHQ/IHF puede enmascarar la detección de endoglina, nosotros decidimos realizar el análisis de detección de la expresión de endoglina a nivel proteico mediante la técnica de citometría de flujo. Hemos comprobado que sí se produce una inducción de la expresión de endoglina durante la transición monocito/macrófago tanto en ensayos *in vitro* como durante una transición *in vivo* promovida por un proceso inflamatorio. A su vez, hemos detectado la expresión de endoglina en macrófagos residentes de tejido aislados de hígado, alvéolos y cavidad peritoneal de ratones C57Bl6/J.

### 4.3 Diversidad en los niveles de expresión de endoglina y F4/80 entre diferentes macrófagos tisulares.

Un dato colateral extraído de la expresión de endoglina es la observación de diferentes niveles de expresión de F4/80 en los macrófagos tisulares. En concreto hay dos poblaciones de macrófagos en la cavidad peritoneal: los LPM o macrófagos residentes de la cavidad peritoneal se identifican como F4/80<sup>alto</sup>Ly6G<sup>neg</sup> y, los SPM (en su mayoría macrófagos derivados de monocitos procedentes de sangre periférica, véase Ghosn *et al.*, 2010) son F4/80<sup>bajo</sup>Ly6G<sup>neg</sup>. Es destacable el hecho de unos mayores niveles de expresión de F4/80 en los LPM en comparación con las células de Kupffer y los macrófagos alveolares, siendo la alta expresión de F4/80 en los LPM una posible característica única a los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal. Gracias a los datos obtenidos de diferentes trabajos, se ha podido comprobar que la expresión de F4/80 puede variar dependiendo del macrófago tisular que se analice siendo alta en las células de Kupffer y débil en los macrófagos alveolares (Gordon *et al.*, 2011). La elevada expresión de F4/80 en LPM es una característica que permite distinguirlos de los SPM (Gohsn *et al.*, 2010). El F4/80 es una molécula transmembrana con un gran dominio extracelular que se expresa en una gran variedad de macrófagos murinos a excepción de los macrófagos de la zona marginal en bazo y los osteoclastos y cuya función continúa siendo un misterio. En resumen, independientemente de los niveles de expresión de F4/80 que expresen los macrófagos todos ellos son positivos para la expresión de endoglina, por lo que endoglina

se confirmaría como un importante marcador de superficie de macrófagos (no expresado en monocitos), tanto en humano como en ratón.

Los niveles de expresión de endoglina varían según la población analizada, siendo los más altos en las células de Kupffer, intermedios en los LPM y débiles en los macrófagos alveolares. Podría ser que esta variabilidad estuviera relacionada con la vida media del macrófago residente de tejido, por ejemplo, los macrófagos alveolares presentan un mayor ratio de renovación que las células de Kupffer. De este modo, endoglina no sólo sería un marcador de la diferenciación de monocito a macrófago, sino que su expresión estaría correlacionada con la tasa de renovación de los macrófagos tisulares. Sin embargo, hasta la fecha, el papel de endoglina en la regulación de las funciones biológicas del macrófago es desconocido.

#### 4.4 Dinámica de SPM y LPM durante una peritonitis inducida por Zymosan.

La cavidad peritoneal es un ambiente único dónde cohabitan e interaccionan diferentes tipos celulares. En la estirpe C57Bl6 la mayor parte de células peritoneales son macrófagos (50%) y células B (>40%) (Goshn *et al.*, 2010), por lo que es una fuente ideal para obtener macrófagos. El modelo de inducción de una peritonitis mediante inyección de Zymosan, también conocido como modelo ZIP (*Zymosan Induced Peritonitis*), se utilizó para analizar la expresión de endoglina durante el reclutamiento de monocitos a la cavidad peritoneal y durante su diferenciación a macrófagos. La población de macrófagos en la cavidad peritoneal está constituida por dos subclases: los LPM que identificamos como F4/80<sup>alto</sup> Ly6G<sup>neg</sup> y, los SPM que se distinguen por sus menores niveles de expresión de F4/80 (F4/80<sup>bajo</sup> Ly6G<sup>neg</sup>). Los LPM son los macrófagos predominantes en la cavidad peritoneal, siendo la relación LPM/SPM de 10/1. Los LPM son considerados los macrófagos residentes de tejido ya que se mantienen por autorenovación y los SPM provienen de los monocitos de sangre periférica que han infiltrado a la cavidad peritoneal (Cassado *et al.*, 2015). En nuestro ensayo hemos evaluado la dinámica de ambas poblaciones mediante citometría de flujo analizando las poblaciones en situación basal (sin estímulo inflamatorio) y a las 12, 24, 36 horas y, 7 y 14 días tras inducir la peritonitis con zymosan. La inyección de zymosan recluta las células inflamatorias a la cavidad peritoneal, la cual sigue un perfil típico de una respuesta inflamatoria aguda dónde se observa un primer flujo de granulocitos (F4/80<sup>neg</sup> CD11b<sup>alto</sup> Ly6G<sup>pos</sup>), seguido de un flujo de monocitos detectable a las 12 horas e identificado como F4/80<sup>neg</sup> CD11b<sup>alto</sup> Ly6G<sup>neg</sup>. A las 12 horas se pudo comprobar que la población de LPM y la pequeña porción de SPM era indetectable, habían desaparecido de la cavidad peritoneal. Este fenómeno en el cual desaparecen los macrófagos residentes tras un daño tisular o una infección, valga la redundancia, es conocido como reacción de

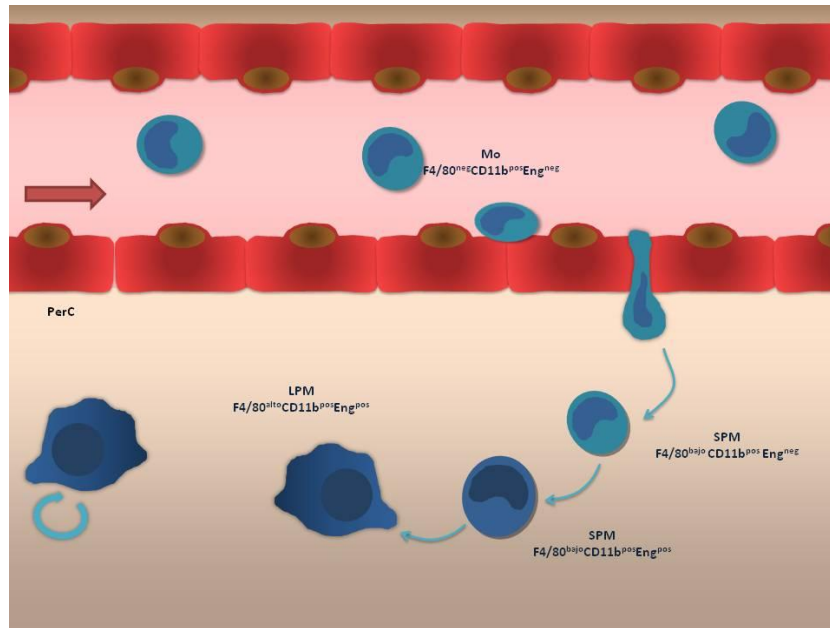
desaparición (*Disappearance reaction*). Es un fenómeno no muy bien establecido pero se cree que los macrófagos residentes desaparecen porque ha aumentado su adhesión a los tejidos, emigran hacia el drenaje linfático o mueren (Barth *et al.*, 1995). Los LPM son las únicas células que desaparecen de la cavidad peritoneal y parece ser que más que debido a una muerte celular, estos migran hacia el omentum (Ghosn *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). A las 24 horas se observa una nueva población de macrófagos (F4/80<sup>bajo</sup>Ly6G<sup>neg</sup>) SPM que se han diferenciado a partir de los monocitos infiltrados y que se corresponden con los SPM descritos por Ghosn y colaboradores (2010). Los SPM se caracterizan por una menor expresión de F4/80 en membrana y esto los diferencia de los LPM o macrófagos residentes. A medida que el estímulo inflamatorio desaparece, el porcentaje de granulocitos disminuye y los SPM son las células mieloides predominantes en la cavidad peritoneal. A los 7 días de la inyección de zymosan se observa una población con elevada expresión de F4/80 que parece aumentar en número a los 14 días. Esta población se correspondería con los LPM según los niveles de F4/80 expresados y parece diferenciarse a partir de los SPM. No tenemos pruebas suficientes para corroborar que los SPM presentes en la cavidad peritoneal se estén diferenciando a LPM ya que deberíamos descartar que éstos no se estuvieran diferenciando a partir de los precursores presentes en la cavidad. Sin embargo, a nivel de los perfiles de citometría parece que los nuevos LPM (7 y 14 días) derivan de los SPM presentes en la cavidad peritoneal ya que se observa un aumento progresivo en la expresión de F4/80 a partir de la población de SPM. Por otro lado, otros trabajos realizados en la cavidad peritoneal demuestran que aún durante una respuesta inflamatoria, los macrófagos residentes se mantienen localmente por una autorenovación (Davies *et al.*, 2011), confirmando que la repoblación de macrófagos tisulares no deriva de los monocitos reclutados (Davies *et al.*, 2011; Liddiard *et al.*, 2011). Pero posteriormente, en otros tejidos se ha observado que tras un episodio de inflamación, los macrófagos recuperados muestran una elevada tasa de proliferación en respuesta a M-CSF para repoblar los tejidos inflamatorios (Davies *et al.*, 2013). A pesar de posibles diferencias en determinados tejidos o fluidos corporales en el adulto y en un estado basal o de reposo, la mayor parte de los macrófagos tisulares se mantienen por un proceso de auto-renovación local (Geissmann *et al.*, 2010). En el contexto de una inflamación, diversos estudios han demostrado que los precursores monocíticos circulantes, en particular el subtipo Ly6C<sup>alto</sup>, viajan hacia los tejidos inflamados y realizan contribuciones sustanciales a la población de macrófagos en cada uno de los compartimentos (Verschoor *et al.*, 2012). Los datos del análisis de citometría durante el reclutamiento de células a la cavidad peritoneal y la observación de las poblaciones SPM y LPM podría estar indicando que los monocitos inflamatorios estarían contribuyendo a la

repopulación de los macrófagos residentes en la cavidad peritoneal, siendo hasta la fecha esta la primera indicación.

#### 4.5 Inducción de endoglina durante el reclutamiento de monocitos y su diferenciación a SPM.

De los ensayos de peritonitis inducida por Zymosan, podemos deducir que endoglina no se expresa en las primeras etapas de diferenciación del monocito *in vivo*. Por ejemplo, según nuestros datos, la expresión de endoglina sería ausente durante la trans migración endotelial del monocito, y sólo podría ser detectable en membrana ya en macrófagos bien diferenciados identificados como F4/80<sup>bajo</sup>Ly6G<sup>alto</sup> o SPM. Los SPM expresan endoglina en superficie tras varias horas después de la extravasación de monocitos al foco de inflamación. Los SPM constituyen una excelente fuente de macrófagos inflamatorios para realizar estudios puesto que tras una peritonitis son la población predominante. Sin embargo, el papel de endoglina en esta estirpe de macrófagos no puede analizarse hasta que no han transcurrido 3 días de su reclutamiento a la cavidad peritoneal puesto que su detección en membrana es nula como mínimo durante las primeras 48 horas. Los SPM recientemente diferenciados son F4/80<sup>pos</sup>Eng<sup>neg</sup> (Figura 64). La ausencia de endoglina a nivel proteico está respaldada por una menor expresión del ARNm de *eng* observada en los macrófagos diferenciados tras 24 horas de la inyección de zymosan (Figura 64). Se ha observado una inducción de los niveles de expresión de endoglina en los macrófagos presentes en el tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide en comparación con los niveles observados en muestras de tejido sinovial en individuos sanos (Szekanecz *et al.*, 1995)

La expresión de endoglina durante la diferenciación *in vivo* del monocito es compatible con su participación en el tráfico celular hacia los tejidos diana. La endoglina endotelial se ha descrito como una molécula implicada en la señalización de integrinas/proteínas de matriz extracelular (Tian *et al.*, 2012) que también promueve la adhesión leucocitaria al endotelio vascular (Rossi *et al.*, 2013). Ambos procesos están implicados en inflamación y extravasación, aunque el papel de endoglina en el monocito/macrófago, dentro de este contexto no ha sido analizado. Sin embargo, según apuntan los datos mostrados, ya que los monocitos no expresan endoglina, no va a contribuir al proceso de trans migración.



**Figura 64. Expresión de endoglina durante la diferenciación de SPM a LPM en la cavidad peritoneal.** Los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal en su mayoría constituidos por los LPM se mantienen por autorenovación. Los LPM expresan endoglina y se caracterizan y diferencian de la población SPM (minoritaria en estado de reposo) por sus elevados niveles de expresión de F4/80 en membrana. Tras un estímulo inflamatorio, como la inyección de zymosan, los monocitos (Mo) son reclutados a la cavidad peritoneal y allí tendrá lugar su diferenciación a macrófagos SPM caracterizada por el inicio de la expresión de F4/80. Endoglina, es un marcador de la diferenciación de macrófagos murinos ya que se expresa en macrófagos residentes (LPM), no se expresa en Mo circulantes y en la superficie de los SPM se detecta tras unas horas del inicio de la expresión de F4/80.

La expresión de endoglina en los macrófagos maduros sugieren que podría tener un papel regulador de la señalización del TGF- $\beta$  en estas células. El TGF- $\beta$  ejerce una acción proinflamatoria en los monocitos actuando como quimioatrayante y estimulando la producción de mediadores inflamatorios. Pero cuando los monocitos se han diferenciado a macrófagos, el TGF- $\beta$  actúa principalmente como una molécula inhibitoria. Dicha función inhibitoria sobre los macrófagos contribuye a la resolución de la inflamación y previene el desarrollo de inmunopatologías (Li *et al.*, 2006). En un primer estudio, analizamos mediante PCR cuantitativa a tiempo real, los niveles de expresión génica de dos de los genes diana más relevantes del sistema de señalización de TGF $\beta$ 1; *Pai1* e *Id1*, genes controlados por el vía de señalización TGF $\beta$ /ALK5/Smad2,3 y TGF $\beta$ /ALK1/Smad1,5,8 respectivamente. *Id1* parece estar activo en ambos subtipos de macrófagos LPM (residentes) y SPM (24horas post-ZIP), mientras que los niveles de *Pai1* están mucho más inducidos en los LPM que en los SPM. La mayor expresión de *Pai1* en células que expresan endoglina en comparación con células dónde no se expresa, estaría en contradicción con trabajos previos dónde se observa que la sobreexpresión de *Pai1* se correlaciona inversamente con la expresión de *eng* (Guerrero-Esteo *et al.*, 1999). Esta aparente contradicción podría explicarse porque los LPM expresan un fenotipo más senescente que los SPM (Cassado *et al.*, 2011). Recientemente, Aristorena y colaboradores

(2014) han comprobado que la senescencia en los macrófagos peritoneales está asociada a un aumento en la ratio S/L endoglina lo que se traduce en un aumento en los niveles de expresión de *Pai-1*. En nuestro análisis no habíamos considerado el efecto de la inmunosenescencia y la proporción entre las isoformas de endoglina. De igual modo que durante los procesos de senescencia endoteliales (Blanco *et al.*, 2008), la S-Eng aumenta promoviendo la señalización vía Smad2,3 y se induce la expresión de *Pai-1* (Aristorena *et al.*, 2014).

#### 4.6 Implicaciones de la expresión de endoglina en macrófagos.

La expresión de endoglina sugiere una implicación en la regulación del sistema de señalización del TGF- $\beta$ . Ya que la acción principal del TGF- $\beta$  sobre el macrófago es principalmente inhibitoria, cabría esperar que su expresión contrarrestara los efectos inhibitorios del TGF- $\beta$  como los observados en otros tipos celulares incluidas las células endoteliales y líneas establecidas como las U-937 (Lastres *et al.*, 1996). Un aspecto llamativo ha sido la mayor expresión de endoglina observada en las BMDMs con fenotipo M2 en comparación con los M1. El fenotipo M2 se caracteriza por sus propiedades pro-angiogénicas y por su actividad en la remodelación tisular. En la presente tesis hemos enfocado el punto de mira sobre la respuesta inmunitaria e inflamatoria por su relación con la incidencia y recurrencia de procesos infecciosos en HHT. Sin embargo, sería de interés analizar cuáles son los efectos de la haploinsuficiencia y/o ausencia de expresión de endoglina en un fenotipo M2. Las MAVs se caracterizan por presentar un infiltrado celular que probablemente esté contribuyendo a la formación y estabilización de la MAV, pero no conocemos el papel de los macrófagos proangiogénicos en la formación de las MAVs y, éste podría verse afectado en los pacientes HHT debido a la haploinsuficiencia en endoglina y Alk1. Durante la resolución de la inflamación, los macrófagos con fenotipo M2 promueven el retorno a la homeostasis mediante la eliminación de las células apoptóticas y restos celulares contribuyendo así a la reparación del tejido (Lucas *et al.*, 2010).

La vacunación frente a endoglina parece ser un tratamiento prometedor como terapia antiangiogénica en cáncer (Jarosz *et al.*, 2013). La administración oral de vacunas de ADN basadas en endoglina da lugar a la inhibición del crecimiento del tumor y la activación del sistema inmune aumentando la expresión de marcadores de linfocitos T y de moléculas coestimuladoras en células dendríticas, así como citoquinas intracelulares. Los macrófagos asociados a tumor o TAMs (*tumor-associated macrophages*) producen factores que promueven la angiogénesis y la proliferación celular del tumor, el remodelado tisular, y disminuyen la respuesta inmune generada frente al tumor (Allavena *et al.*, 2008; Balkwill *et al.*, 2010). Las vacunas dirigidas frente a endoglina estaban concebidas para atacar a

las células endoteliales. Como hemos comprobado por los niveles de expresión de endogлина en el cultivo de BMDMs, los macrófagos M2 expresaban endogлина y en mayor cantidad que en los M1. Los TAMs son asociados al fenotipo M2, por lo que sería interesante observar si tras la vacunación frente a endogлина hay una alteración en el número de TAMs o en su función.

En la respuesta inmune de defensa además de monocitos y macrófagos, otros tipos celulares que ejercen un papel central en la iniciación de la respuesta inflamatoria son los granulocitos y las células dendríticas. Una de las principales funciones de las células dendríticas es la presentación de antígeno y la activación de la respuesta inmune adaptativa. Originariamente se pensaba que las células dendríticas derivaban del CLP (precursor común linfóide) pero posteriormente se ha comprobado que también se pueden originar a partir del linaje mielóide (Vershcoor *et al.*, 2012). Debido a que se diferencian a partir del mismo precursor en MOR que los macrófagos y que ejercen funciones parecidas, se debería en primer lugar comprobar si las células dendríticas expresan endogлина y si la deficiencia en la expresión de endogлина afectaría a sus funciones efectoras frente a una infección o un estímulo inflamatorio.

### 5 Papel de endogлина en las funciones del macrófago.

Debido a que la haploinsuficiencia de la expresión de endogлина en los macrófagos de pacientes HHT podría estar contribuyendo a la mayor incidencia de infecciones en pacientes HHT caracterizada en determinados individuos por su recurrencia, y a que hemos comprobado que endogлина se expresa en macrófagos de ratón, durante la presente tesis se planteó la generación de un modelo deficiente en endogлина en el macrófago. La generación de este modelo nos permite evaluar las respuestas del macrófago en ausencia de la expresión de endogлина, frente a estímulos inflamatorios y sus funciones efectoras como la fagocitosis.

#### 5.1 Nueva herramienta en el estudio de las funciones de endogлина en el macrófago de ratón: modelo deficiente en endogлина en el linaje mielóide.

Con el fin de investigar el papel de endogлина en inflamación y en la función del macrófago, generamos un ratón deficiente en endogлина específicamente en las células mieloides, el ratón *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre*. Para ello se cruzaron los ratones que presentaban el alelo de endogлина floxeado con una cepa transgénica que contenía la recombinasa Cre bajo control del promotor de lisozima conocida como *LysMCre*. Los ratones *LysMCre* expresan el gen de la recombinasa Cre bajo control del promotor de Lisozima 2 (*Lyz2*) promotor específico del linaje mielóide y que se expresa en monocitos, macrófagos y neutrófilos.

Para verificar que la recombinasa Cre elimina los exones 5 y 6 de *eng*, se realizaron varias estrategias. En primer lugar está la detección del alelo *eng*<sup>Δ5-6</sup> en los ratones portadores del alelo *eng*<sup>fl</sup> mediante PCR. A partir de los productos de amplificación por PCR del ADN del tejido de cola mediante la combinación de los primers XY, pudimos comprobar que los ratones *Eng*<sup>wt/fl</sup>*LysMCre* y los ratones *Eng*<sup>fl/fl</sup>*LysMCre* eran portadores del alelo *eng*<sup>Δ5-6</sup>. Sin embargo, el alelo *eng*<sup>Δ5-6</sup> no se detecta en los ratones control o *Eng*<sup>wt/wt</sup>*LysMCre*. También examinamos los niveles de expresión de ARN mensajero y los niveles de proteína de endogлина en los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, comprobando que eran prácticamente indetectables en las células provenientes del ratón *Eng*<sup>fl/fl</sup>*LysMCre* con unos valores de expresión intermedios en el ratón heterocigoto en comparación con los ratones control. Como cabía esperar por la especificidad del promotor *Lyz2*, la expresión de endogлина en el vasculatura de diferentes órganos como pulmón, bazo e hígado se mantiene íntegra.

Las tres líneas experimentales presentan un aspecto sano, son fértiles y presentan una descendencia normal. El proceso de hematopoyesis no parece verse afectado puesto que el análisis hematológico no mostró ninguna diferencia en el recuento leucocitario entre los ratones control y los ratones deficientes en la expresión de endogлина en el macrófago.

## 5.2 La ausencia de endogлина en el macrófago confiere una predisposición al desarrollo de infecciones por oportunistas.

En general todos los ratones presentan un aspecto sano pero observamos la aparición de heridas con abscesos en diversos individuos que habían sido seleccionados como parejas reproductoras para mantener la línea *Eng*<sup>fl/fl</sup>*LysMCre*, por lo que, la deficiencia de endogлина en los macrófagos predispone los animales a desarrollar infecciones por bacterias oportunistas detectadas por la aparición de abscesos en la piel. Las infecciones iban acompañadas por una esplenomegalia que es secundaria a la aparición de una infección aguda. El microorganismo más frecuente aislado de las muestras de las heridas en la piel fue *S. aureus*. Las infecciones por bacterias oportunistas constituyen un problema clínico serio en individuos inmunodeprimidos y neonatos, siendo una de las principales causas de infecciones nosocomiales (de Kraker *et al.*, 2011). *S. aureus* es uno de los patógenos más comunes aislado de pacientes hospitalizados. En ratones inmunocompetentes, la colonización de la piel, el intestino, la mucosa nasal y la faringe por *S. aureus* es asintomática. En ratones inmunocomprometidos o inmunodeficientes, *S. aureus* puede dar lugar a infecciones piogénicas (abscesos) en la conjuntiva ocular y los párpados, en la piel (incluyendo folículos pilosos y glándulas sebáceas) y en el aparato reproductor. *S. aureus* es considerado el clásico oportunista que se beneficia de las heridas presentes en la piel u otros focos de entrada, para



causar una infección. En nuestro modelo, la deficiencia en la expresión de endogлина confiere una mayor susceptibilidad a desarrollar infecciones por bacterias oportunistas tras colocar los individuos con un *partner* para establecer una pareja reproductora. Se localizó un caso en un ratón heterocigoto también seleccionado como reproductor y en un macho  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  que se encontraba en la misma jaula que sus hermanos de camada. No conocemos el origen de la infección pero las pequeñas heridas generadas durante la interacción previa y durante el apareamiento pueden ser las responsables de la aparición de infecciones espontáneas en los ratones  $Eng^{fl/fl}LysMCre$ . Desafortunadamente esto se traducía en una disminución de la producción de animales  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  especialmente si la infección aparecía en la hembra tras estabularla junto al macho reproductor ya que no se quedaba entera en gestación. Si la hembra había sido fecundada y la infección aparecía con posterioridad o, bien era el macho el que presentaba la infección en el momento del parto, los progenitores se comían las crías. Los abscesos localizados en el abdomen alrededor de la zona urogenital son los más comunes en ambos sexos. Siempre se ha localizado una herida en la zona infectada por lo que parece ser la vía de entrada de la bacteria a los tejidos blandos. El hecho de que la infección por un patógeno oportunista sólo se haya identificado en un ratón  $Eng^{wt/fl}LysMCre$  indicaría que hay un efecto umbral por debajo del cual, los niveles de expresión de endogлина en el macrófago, dan lugar a un defecto en la respuesta inmune. Por ejemplo, los modelos animales en HHT indican que la aparición de MAVs en pacientes HHT1 ocurriría tras un fenómeno de pérdida de heterocigosis (Tual-Chalot *et al.*, 2015). Todos los ratones experimentales se encuentran estabulados en la misma habitación y en ambientes controlados libres de microorganismos patógenos, por lo que únicamente nos hemos encontrado con problemas derivados por microorganismos oportunistas. Los factores ambientales son relevantes en la determinación del tipo de infección y su frecuencia. Las condiciones bajo la cual los animales eran estabulados y la flora bacteriana transportada por el personal del estabulario podría explicar la identificación de diferentes bacterias oportunistas. El fenotipo inmunocomprometido observado en los ratones  $Eng^{fl/fl}LysMCre$  estaría en concordancia con la mayor incidencia de infecciones observada en pacientes HHT (Dupuis-Girod *et al.*, 2007; Guilhem *et al.*, 2013). Además de esto, la mayor susceptibilidad a infecciones por bacterias oportunistas sugiere que la expresión de endogлина en el macrófago juega un papel en la regulación de la respuesta inmune innata.

El aumento en los niveles de sEng, la forma circulante de la proteína de membrana, además de estar presente en diversas enfermedades asociadas a una disfunción endotelial, se ha observado en otras enfermedades infecciosas como malaria y dengue (Dietmann *et al.*,

2009; Conroy *et al.*, 2015). Los niveles de sEng fueron evaluados en el plasma de ratones que habían desarrollado una infección y no presentaban ninguna alteración. Este hecho podría deberse a que el aumento de los niveles de sEng en circulación, se debería a una combinación entre el aumento de los procesos de angiogénesis en determinadas patologías y el aumento de la expresión y/o actividad de las metaloproteasas. Malaria y Dengue, son enfermedades infecciosas que también cursan con una disfunción vascular.

### 5.3 Respuesta inmunitaria ante la deficiencia de endoglina en el linaje mieloide.

En el modelo de una peritonitis estéril inducida por la inyección de zymosan, hemos comprobado que la expresión de endoglina en los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal, principalmente LPM, estaría dirigiendo los primeras etapas de inicio de la respuesta inflamatoria. En el modelo ZIP, los ratones *Eng<sup>f/f</sup>LysMCre* presentan una menor capacidad de reclutamiento de células inflamatorias, mostrándose unos valores intermedios en los ratones *Eng<sup>wt/f</sup>LysMCre*, caracterizada por un menor número de granulocitos y macrófagos en la cavidad peritoneal en comparación con los ratones control. Dicha deficiencia en el reclutamiento de células inflamatorias hacia los focos de infección no se debe a un defecto previo en el número de leucocitos presentes en la cavidad peritoneal o en la circulación, puesto que el número de células residentes en la cavidad peritoneal así como el de leucocitos de sangre periférica, no presenta ninguna alteración en los ratones *Eng<sup>wt/f</sup>LysMCre* o *Eng<sup>f/f</sup>LysMCre*. Los macrófagos residentes son unas células claves de la respuesta inmune innata y dirigen la iniciación de la respuesta inmunitaria que se traduce en el reclutamiento de células inflamatorias mediante la secreción de quimioquinas, la activación de la respuesta inflamatoria mediante la secreción de citoquinas inflamatorias y la activación de la respuesta adaptativa mediante la presentación de antígeno (Verschoor *et al.*, 2012). Así que la deficiencia en endoglina en los macrófagos residentes de tejido o de otros compartimentos como la cavidad peritoneal estaría afectando el inicio de la respuesta inmune. La importancia de los macrófagos residentes en la iniciación de la respuesta inflamatoria está ilustrada por trabajos donde la depleción de macrófagos residentes se traduce en una menor producción de quimioquinas y un menor reclutamiento de neutrófilos en modelos de inflamación experimental (Davies *et al.*, 2013).

El papel de la expresión de endoglina en LPM también se estudió en un segundo modelo de inflamación; una inflamación aguda mediada por la inyección de LPS. A las dosis utilizada el LPS induce un shock séptico que en la mayoría de los casos el individuo muere por un fallo multiórgánico. La magnitud de la respuesta inmunitaria en el ratón está relacionada con la capacidad de supervivencia del individuo, a mayor intensidad menor será la supervivencia

puesto que estamos en el contexto de una peritonitis estéril donde el patógeno no es activo. Los ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* y, en menor medida los ratones *Eng<sup>wt/fl</sup>LysMCre*, presentan una mayor supervivencia al shock séptico inducido por LPS que los ratones control, lo que estaría en correlación con una respuesta inflamatoria más débil. Las diferencias eran más notables durante las primeras 12 - 36 horas, hecho que nos estaría indicando que hay una ralentización o pérdida de potencia del inicio de la respuesta inmunitaria mediada por los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal. La endotoxemia mediada por LPS mimetiza la sepsis inducida por las bacterias. En el contexto de una sepsis las quimioquinas y citoquinas son necesarias para dirigir los leucocitos hacia los lugares de inflamación, activar la respuesta inflamatoria e iniciar la respuesta inmune adaptativa (Charo *et al.*, 2006; Coelho *et al.*, 2005). Es por ello que evaluamos los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  en el exudado peritoneal y en el suero de los ratones tras la inducción del shock séptico. En la cavidad peritoneal encontramos una menor secreción de TNF $\alpha$  tras 1 del shock séptico y en todos los individuos se observa una gran inducción de IL-1 $\beta$  e IL-6 a pesar que en todos los individuos se observaba una gran inducción de la expresión de dichas citoquinas a las 3 horas. En el suero se observaron diferencias en los niveles de IL-1 $\beta$  e IL-6 a las 3 horas de la inducción del shock séptico, siendo menores en los ratones deficientes en endoglin. Estas diferencias estarían contribuyendo a una deficiencia en el inicio de la respuesta inmune innata, pero probablemente otras citoquinas/quimioquinas estarían contribuyendo al fenotipo observado.

Por otra parte la importancia en las diferencias de secreción de citoquinas, se pone de manifiesto cuando se analizó se analizó la capacidad quimioatrayente de los exudados peritoneales de los ratones deficientes en endoglin, así como la de los ratones haploinsuficientes a 1 y 3 horas tras la inducción del shock séptico. Los exudados peritoneales muestran claramente una menor capacidad de inducir la migración celular. Este hecho corroboraría la hipótesis que muy probablemente hay una serie de citoquinas/quimioquinas (además de las analizadas) que se ven afectadas ante la deficiencia de endoglin en el macrófago. En algunas valoraciones se observa una tendencia que no es estadísticamente significativa y esto podría deberse a la variabilidad interindividual, por lo que sería necesario un aumento del tamaño de la población analizada. Además, la sepsis es un síndrome muy complejo donde la respuesta inflamatoria implica la participación de diversos sistemas biológicos (complemento, coagulación, cascadas fibrinolíticas y el sistema nervioso autónomo) y tipos celulares, dando lugar a un desequilibrio de la red inflamatoria (Hotchkiss *et al.*, 2003; Rittirsch *et al.*, 2008).

El hecho que la supervivencia tras una sepsis inducida por LPS sea mayor y esté prolongada durante las primeras horas en los ratones deficientes para endoglina podría parecer indicar que los pacientes HHT-1 estarían protegidos frente a la sepsis. Sin embargo, este es un modelo que mimetiza la respuesta inmunitaria que tiene lugar durante una sepsis, por lo que al ser menor en individuos deficientes en endoglina, está indicando que hay una menor respuesta inmunitaria frente al patógeno. En una sepsis humana dónde nos encontramos con el patógeno vivo, esto se traduciría en una mayor capacidad proliferativa del microorganismo, ante una respuesta inmune más débil y, por tanto un mayor riesgo de mortalidad para el paciente HHT.

### 5.3.1 La deficiencia en endoglina determina una menor actividad fagocítica en el macrófago.

Otro modo de analizar el papel de endoglina en las funciones del macrófago es mediante el análisis de la fagocitosis. Los macrófagos residentes juegan un papel central en la respuesta inmune innata para proteger al huésped frente a infecciones, precisamente porque son los primeros fagocitos en encontrar las bacterias que llegan a las zonas estériles (Aderem *et al.*, ; Verschoor *et al.*, 2012). Tanto la actividad fagocítica como la eficiencia de fagocitosis eran dependientes de los niveles de expresión de endoglina en los ensayos *in vivo*. Los niveles de TLR4, el principal receptor de las partículas de zymosan, no están alterados en los macrófagos de ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* o ratones *Eng<sup>wt/fl</sup>LysMCre*. Al observar diferencias en la eficiencia de fagocitosis *in vivo*, esto nos indicaría que podrían verse afectados los procesos de reconocimiento de las partículas opsonizadas por anticuerpos o factores del complemento como C3b que favorecen la fagocitosis mediada por el macrófago.

La menor capacidad fagocítica mostrada por los macrófagos deficientes en endoglina estaría en concordancia con una deficiencia en la actividad fagocítica mostrada por granulocitos y macrófagos de pacientes HHT (Cirulli *et al.*, 2006) y estaría contribuyendo al fenotipo inmunocomprometido mostrado por los pacientes HHT (Dupuis-Girod *et al.*, 2007; Guilhem *et al.*, 2013). En los trastornos del sistema fagocítico, desde el punto de vista clínico las infecciones se manifiestan como neumonías (*Aspergillus* sp., *S. aureus*, *B. cepacia*, *Nocardia* sp.); abscesos subcutáneos, perirrectales o hepáticos (*S. aureus*); abscesos pulmonares o cerebrales (*Aspergillus* sp., *S. aureus*, *Nocardia* sp); adenitis supurada (*S. aureus*, *Serratia*, *Candida*, *Klebsiella*); osteomielitis (*Serratia*, *Aspergillus*, *S. aureus*); y sepsis (*Salmonella* sp., *B. cepacia*)(Ruiz-Contreras *et al.*, 2013), en su gran mayoría infecciones también observadas en la población HHT. Tras la fagocitosis, los macrófagos realizan la presentación de antígeno a las células T regulando así la respuesta inmune adaptativa. Se ha especulado que una alteración

en la respuesta inmune adaptativa derivada de una menor producción de citoquinas Th1 y una linfopenia detectada en determinados pacientes HHT podría contribuir al fenotipo inmunocomprometido observado en HHT (Amati *et al.*, 2006; Guilhem *et al.*, 2013). En relación a ello, sería interesante evaluar el proceso de presentación de antígeno en nuestro modelo con el fin de comprobar si podría alterar la activación o iniciación de la respuesta inmune adaptativa.

En su conjunto, los ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* muestran características compatibles con un fenotipo inmunodeprimido. La causa subyacente a una deficiente respuesta inmunitaria está representada por los macrófagos residentes, donde la expresión de endoglina será necesaria para una correcta iniciación de la respuesta inmunitaria.

#### 5.4 Papel de endoglina en la señalización del TGF- $\beta$ en el macrófago.

La expresión de endoglina en macrófagos maduros, sugiere que endoglina podría también intervenir en el proceso de señalización de TGF- $\beta$  en el macrófago. A grandes rasgos, el TGF- $\beta$ 1 ejerce un papel proinflamatorio actuando como un agente quimioatrayente sobre los monocitos e induciendo la producción de mediadores inflamatorios. Ahora bien, cuando el Mo se ha diferenciado a macrófago, el TGF- $\beta$ 1 actúa principalmente como una molécula inhibitoria. Este papel inhibitorio sobre el macrófago es esencial para resolver la inflamación y prevenir el desarrollo de inmunopatologías, por ejemplo, los macrófagos activados por fagocitosis secretan TGF- $\beta$ 1, mecanismo que ayuda a resolver la inflamación (Li *et al.*, 2006). Algunos patógenos han desarrollado mecanismos para inducir la producción de TGF- $\beta$  en el macrófago de manera que se inhibe la capacidad de eliminarlo y se potencia la proliferación intracelular del parásito. Algunos ejemplos son *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*, *Toxoplasma gondii*, *Micobacteria* (tuberculosis y infecciones oportunistas) y *Candida albicans* (sólo en inmunocomprometidos).

En el sistema inmunológico, TGF- $\beta$  ejerce su señalización principalmente vía ALK5 y TGFBR1 y, el papel del receptor tipo I ALK1 o el correceptor endoglina en las funciones celulares inmunológicas es desconocido (Li *et al.*, 2006). Diversos datos sugieren que Smad3 es el mediador crítico de la acción inhibitoria del TGF- $\beta$  sobre el macrófago. Por ejemplo, la sobreexpresión de Smad3 bloquea la inducción del promotor de iNOS y MMP12 inducida por LPS en macrófagos, además, el mutante dominante negativo de Smad3 palia o disminuye el efecto inhibitorio de TGF- $\beta$  sobre el macrófago activado (Werner *et al.*, 2000). En el endotelio, endoglina modula la señalización del TGF- $\beta$ 1 favoreciendo la interacción con el receptor tipo I ALK1 y promoviendo la señalización vía Smad1/5/8 (Lebrin *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2005). La

expresión de endoglina y ALK1 en macrófagos humanos (Lastres *et al.*, 1992; O'Connell *et al.*, 1992; Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004) sugiere la existencia de la vía de señalización TGF- $\beta$ /ALK1/Smad1/5/8 en macrófagos. En 1996, Lastres y colaboradores generaron una línea de transfectantes estables de las isoformas L- y S- endoglina en la línea pro-monocítica U937. Los autores comprobaron que la sobreexpresión de L-endoglina, y con menor intensidad la sobreexpresión de S-endoglina, contrarrestaban los efectos del TGF- $\beta$ 1 sobre la inhibición de la proliferación celular, la formación de agregados celulares mediado por la fosforilación de PECAM-1, disminuyendo la síntesis de fibronectina mediada por TGF- $\beta$ 1 e inhibiendo la adhesión celular promovida por esta citoquina. Posteriormente, nuevos estudios realizados en los transfectantes estables de las isoformas L- y S-endoglina muestran que ambos transfectantes presentan una expresión génica diferencial que afecta principalmente funciones biológicas relacionadas con el movimiento celular y, una expresión diferencial de INHBA, un miembro de la familia del TGF- $\beta$  (Blanco *et al.*, 2015). Además, la sobreexpresión de la isoforma S-endoglina otorgaría un fenotipo senescente caracterizado por una disminución en la proliferación y supervivencia celular (Aristorena *et al.*, 2014).

En base a los datos anteriormente expuestos, uno de los objetivos planteados era comprobar qué efectos tenía la deficiencia en la expresión de endoglina sobre la señalización del TGF- $\beta$ 1 en el macrófago. En un primer lugar, los niveles de expresión de diversas dianas del TGF- $\beta$  fueron analizadas en los macrófagos de ratones *Eng<sup>wt/wt</sup>LysMCre*, *Eng<sup>wt/fl</sup>LysMCre* y *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre*. *Pai-1* e *Id1* están controlados por las vías de señalización TGF- $\beta$ /ALK5/Smad2/3 y TGF- $\beta$ /ALK1/Smad1/5/8 respectivamente. Mientras que los niveles de expresión de *Id1* parecen ser independientes de los niveles de expresión de endoglina, los niveles de expresión del ARNm de *Pai-1* son mucho más elevados en los ratones deficientes en la expresión de endoglina. Esta sobreexpresión estaría en concordancia con trabajos previos dónde se ha observado que los niveles de *Pai-1* y endoglina están inversamente correlacionados (Guerrero-Esteo *et al.*, 1999). Como Smad3 es un mediador crítico en la acción inhibitoria del TGF- $\beta$  sobre el macrófago (Werner *et al.*, 2000) estos datos sugieren que endoglina podría modular la señalización del TGF- $\beta$  contrarrestrando la señalización vía ALK5/Smad2/3. En relación con la patología HHT, tanto la haploinsuficiencia como la ausencia de expresión de endoglina en el macrófago, da lugar a una represión de la expresión de *Alk1*. Estos datos están en línea con trabajos anteriores dónde se observó que las células provenientes de pacientes HHT1 también mostraban una disminución en los niveles de expresión de *ALK1* (Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004; Fernandez-L *et al.*, 2007). Además de estos 3 genes estudiados ampliamente en la señalización del TGF- $\beta$  en el contexto endotelial, también se analizaron los niveles de *Nos2*, *Mmp12* y

*InhbA*, todos ellos marcadores de la activación del macrófago (Werner *et al.*, 2000; Sierra-Filardi *et al.*, 2011). Tanto *Mmp12* como *Nos2* y *InhbA* están reprimidos en los macrófagos deficientes en endogлина, mostrando valores intermedios en los macrófagos aislados de ratones heterocigotos. *Nos2* ayuda al control de las infecciones por *S. aureus* (Mantovani *et al.*, 2004) y MMP12 interviene en la eliminación de *S. aureus* en el fagolisosoma del macrófago (Houghton *et al.*, 2009). La disminución de la expresión de *Nos2* y *Mmp12* en el ratón *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* influiría negativamente en la eliminación de las bacterias dentro del macrófago.

La inducción de *Pai1* junto a la represión de *Alk1*, *Nos2*, *Mmp12* e *InhbA* en los macrófagos deficientes en endogлина sugiere que endogлина actuaría contrarrestando el papel inhibitorio ejercido por TGF- $\beta$  vía ALK5/Smad2/3. Sería esperable por tanto que endogлина promoviese la señalización de TGF- $\beta$ /ALK1/Smad1/5/8, pero no tenemos datos suficientes para confirmarlo, por lo que sería apropiado analizar los niveles de expresión de *Pai1* e *Id1* tras tratar el cultivo de macrófagos con dosis de TGF- $\beta$ 1 y tiempos que estimulen uno u otra vía de señalización con el fin de comprobar que efecto tiene la ausencia de expresión de endogлина en el macrófago.

Para investigar el papel de endogлина sobre la acción del TGF- $\beta$ 1 en macrófagos, los macrófagos aislados de la cavidad peritoneal fueron cultivados durante 24 horas en presencia de 15 ng/ml de LPS y, en paralelo las células fueron pretratadas durante 30 minutos con 10 ng/ml de la citoquina recombinante TGF- $\beta$ 1. De acuerdo con estudios previos, el LPS induce la expresión de *Mmp12* y *Nos2* siendo menor siendo significativamente menor la inducción de *Mmp12* en los macrófagos de ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre*. La inducción en *Nos2* es menor en ausencia de la expresión de endogлина aunque las diferencias no lleguen a ser significativas. Tal y como se esperaba, el TGF- $\beta$ 1 inhibe la expresión de *Nos2* y *Mmp12*, siendo esta mucho más potente en los niveles de expresión de *Mmp12*, en contra de lo esperado su inhibición parece ser independiente de los niveles de expresión de endogлина en macrófagos ya que no se observan diferencias significativas. Probablemente, el efecto inhibitorio del TGF- $\beta$ 1 sobre *Mmp12* es tan marcado que sería interesante observar los niveles de expresión a tiempos inferiores. Por otro lado, los macrófagos son menos eficientes en la expresión de *Mmp12* frente a un estímulo inflamatorio, lo que estaría indicando una menor activación en ausencia de endogлина. *Nos2* presenta una disminución en los macrófagos deficientes en endogлина, no llega a ser significativa la diferencia, pero sería interesante repetir este ensayo ampliando el tamaño muestras, para llegar a una diferencia significativa, apoyando la idea de una menor eficiencia en el control de las infecciones, en ausencia de expresión de endogлина.

En vista de estos resultados, nos parecería adecuado, analizar el papel de endogлина en el macrófago, sobre la señalización de TGF- $\beta$ , en ausencia de LPS u otro compuesto inflamatorio. Al igual que se ha probado en el endotelio, dos tipos de estímulos a probar serían: dosis bajas de TGF- $\beta$ 1 (de 0,1 a 1ng/ml) tiempos cortos (de 1 a 3 horas) para observar activación de la vía de señalización TGF- $\beta$ /Alk1/Smad1/5/8; y dosis altas (5-10 ng/ml) y tiempos largos (16-24 horas) para evaluar la vía TGF- $\beta$ /Alk5/Smad2/3.

## 6 Futuros desarrollos en el modelo

### 6.1 S-endogлина e inmunosenescencia en HHT.

El aumento de la isoforma S-endogлина ha sido asociado a la senescencia del macrófago y su sobreexpresión afecta la diferenciación de la línea U937 al fenotipo proinflamatorio M1 (Aristorena *et al.*, 2014). La penetrancia de los síntomas asociados a la HHT aumenta con la edad y este hecho está asociado al envejecimiento celular en general y al aumento del estrés oxidativo inherente a todos los individuos. Este proceso de senescencia celular tanto endotelial como a nivel de macrófagos, se vería agravado en un fenotipo HHT1, puesto que a la haploinsuficiencia de endogлина se sumaría el efecto del aumento en la proporción de S/L-endogлина durante el envejecimiento. En nuestro modelo animal, hemos comprobado que los macrófagos de ratones deficientes en endogлина (haploinsuficiencia y con ausencia completa), presentan mayores niveles de expresión de *Pai1*, marcador de la vía de señalización de TGF- $\beta$ 1 ALK5/Smad2/3, vía predominante en procesos de senescencia frente a la ALK1/Smad1/5/8 que lleva a proliferación. Por tanto, se puede especular con que los procesos de envejecimiento celular endotelial e inmunosenescencia estarían acelerados en los pacientes HHT1. La mayor penetrancia de la sintomatología clásica en pacientes HHT estaría en concordancia con estos datos. Sin embargo, los efectos de la inmunosenescencia en pacientes HHT con los datos presentes en este trabajo no pueden analizarse. Sería necesario comparar las edades en las que tiene lugar la primera manifestación de un proceso infeccioso relevante y contrastarlo con el promedio observado en la población general. Aunque con pocos datos, la edad de inicio o manifestación de algunas infecciones en la cohorte HHT española parecen indicar que infecciones típicas de individuos inmunocomprometidos como la tercera edad y los lactantes, aparecen con precocidad en los pacientes HHT.

Los ensayos de polarización de la línea U937, indican que L-endogлина promueve la diferenciación a un fenotipo M1, mientras que S-endogлина favorece la expresión de marcadores M2 (Aristorena *et al.*, 2014). Los macrófagos M2 o de la vía alternativa son también conocidos como macrófagos proangiogénicos. Las MAVs se caracterizan por presentar



un infiltrado celular. En este contexto, el papel de las diferentes isoformas y su colaboración en el proceso de formación de una MAV no han sido evaluados. Otro punto a responder sería como afectaría la haploinsuficiencia de endogлина o ALK1 en la adquisición de un fenotipo M1 o M2. Si bien, por los datos mostrados podemos deducir que la haploinsuficiencia afectaría las capacidades proinflamatorias del fenotipo M1. Una deficiencia en el fenotipo M2 podría estar afectando los procesos de angiogénesis tras un estímulo inflamatorio o una herida y contribuir así a la aparición de MAVs.

### 6.2 Liberación sEng por inflamación.

En ratones *Eng*<sup>+/-</sup> que desarrollaban blefaritis las lesiones vasculares presentes en párpados dan lugar a un mayor sangrado que aquellos que no presentaban infección (*Torsney et al., 2003*), por lo que se deduce que la inflamación es un desencadenante de las hemorragias. Además de esto, los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> parece que tienen una menor capacidad para resolver los estímulos inflamatorios por lo que el efecto negativo sobre las MAVs y telangiectasias se vería agravado (*Jerkic et al., 2010; Shen et al., 2014*). Este escenario inflamatorio también presentaría un efecto sobre la expresión de endogлина a nivel local puesto que un estímulo inflamatorio como TNF $\alpha$  induce la liberación de sEng en células endoteliales (*Li et al., 2003*). En pacientes HHT1 nos encontraríamos con niveles reducidos de endogлина en la superficie de las células endoteliales que combinados con un proceso inflamatorio darían lugar a células endoteliales con una cantidad de proteína insuficiente durante el periodo inflamatorio. Este estado transitorio también conocido como fenotipo “nulo de endogлина” (“endoglin protein null”) aumentaría el riesgo de desarrollo de lesiones vasculares.

La endogлина soluble actúa secuestrando el TGF- $\beta$  circulante. Según los datos obtenidos en la valoración de los niveles de sEng en plasma de pacientes HHT1 podemos deducir que al haber menos sEng esto se refleja en mayores niveles de TGF- $\beta$ 1 libre. Los niveles de TGF- $\beta$ 1 en los pacientes HHT durante un proceso inflamatorio no han sido valorados, pero ante una menor producción de sEng nos encontraríamos con una mayor cantidad de TGF- $\beta$ 1 libre, por lo que la respuesta inmunitaria y proinflamatoria se vería afectada por una mayor magnitud de inhibición por parte del TGF- $\beta$  libre. Un detrimento en la respuesta inflamatoria frente a una infección se traduciría en una prolongación de la respuesta inflamatoria y, por tanto, estaría contribuyendo a un retraso en la eliminación del agente infeccioso y en último término al desarrollo de pequeñas MAVs que pudieran estar subyacentes.

### 6.3 Qué esperar de un modelo ALK1

El modelo *Knockout* específico de endogлина en el linaje mieloide de ratón desarrollado durante la presente tesis ha podido dilucidar algunos de los aspectos que podrían verse implicados en la mayor incidencia de procesos infecciosos registrados en la población HHT1. Sin embargo quedarían algunas preguntas sin responder en referencia al papel de Alk1 en macrófagos. El papel de ALK1 en el monocito/macrófago es vagamente conocido por lo que los estudios se han centrado en el papel de endogлина en la respuesta inflamatoria. Sabemos que niveles reducidos de Alk1 en la célula endotelial dan lugar a una menor señalización vía Smad1/5/8 en un modelo inducible de Alk1<sup>-/-</sup> (Tual-Chalot *et al.*, 2014). Además de esto, la expresión de endogлина tanto a nivel de ARNm como de proteína está claramente disminuida en las células endoteliales de este modelo, y en macrófagos de origen humano (Sanz-Rodríguez *et al.*, 2004) lo que está indicando que la regulación de su expresión se encuentra *downstream* de Alk1. Estos datos estarían en concordancia con estudios previos en los que se observó que la expresión de endogлина endotelial se encuentra *downstream* de la señalización de BMP9 y por tanto tendría lugar vía Alk1 (Scharpfenecker *et al.*, 2007). Y en sentido inverso, nosotros hemos observado que los niveles de expresión de Alk1 en macrófagos de ratón son dependientes de la expresión de endogлина. Estos datos nos indican que ambas proteínas se regulan mediante una retroalimentación positiva vía Smad1/5/8 y por tanto es esperable observar un fenotipo parecido al del ratón Eng<sup>f/f</sup>LysMCre en un ratón que no exprese Alk1 de forma específica en el macrófago.

Existe una diversidad en la localización de MAVs entre pacientes HHT1 y HHT2, siendo las MAVs pulmonares y cerebrales más frecuentes en los pacientes HHT1 y las MAVs hepáticas y los sangrados GI más frecuentes en HHT2 (Letteboer *et al.*, 2006; Lesca *et al.* 2007; Komiyama *et al.*, 2014). La clave a estas diferencias podría estar relacionada con la expresión de Alk1 y endogлина en el macrófago. La pérdida endotelial de Alk1 en modelo murino inducible (Tual-Chalot *et al.*, 2014) da lugar a sangrados gástricos sin necesidad de aplicar ningún estímulo angiogénico y los ratones *Acvr1-iKO* muestran MAVs en ausencia de dichos estímulos (Park *et al.*, 2009). En primer lugar, esta peculiaridad puede ser debida a que la delicada vasculatura del tracto digestivo puede que requiera una mayor función de Alk1, pero también podríamos encontrarnos con una mayor cantidad de estímulos inflamatorios probablemente por parte de los macrófagos tisulares y la flora intestinal que aún no han sido evaluados. Sin embargo, la delección de endogлина en endotelio (Garrido-Martín *et al.*, 2014) no da lugar a la formación de MAVs en la vasculatura gastrointestinal, en consonancia con la diferente frecuencia de sangrados GI observada entre pacientes HHT1 y HHT2. El papel de los

macrófagos tisulares y la función de Alk1 en los mismos serían objetivos de estudio a tener en cuenta para investigaciones futuras.

# CONCLUSIONES



## VI. Conclusiones

1. Los niveles plasmáticos de Ang-2 y sEng son menores en comparación con los presentes en la población control no-HHT analizada. Por tanto, la combinación de los valores de concentración de Ang-2 y sEng en el plasma permite identificar los individuos afectados del síndrome HHT con una elevada fiabilidad y, además permite discriminar entre los tipos principales de HHT: HHT1 y HHT2.
2. La cohorte de pacientes HHT española, del hospital de referencia de Sierrallana/Valdecilla, presentan una incidencia notable de infecciones graves como abscesos cerebrales, osteomielitis y en menor medida endocarditis y sepsis. Los abscesos cerebrales son prevalentes en pacientes HHT1 no estando relacionado con el hábito del tabaquismo. Para el resto de procesos infecciosos como úlceras gástricas de origen bacteriano, osteomielitis, abscesos cutáneos, sepsis y endocarditis no se observan diferencias en la incidencia entre pacientes HHT1 y HHT2.
3. Se descarta la inmunodeficiencia primaria derivada de una menor concentración de leucocitos en sangre periférica o inmunoglobulinas tipo IgG, IgA o IgM, como causa subyacente de una mayor predisposición a padecer infecciones observada en la población HHT analizada.
4. La haploinsuficiencia en endogлина y ALK-1 da lugar a una alteración de la expresión génica en macrófagos diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica. El análisis funcional reveló que los genes reprimidos en macrófagos de pacientes HHT afectan de forma estadísticamente significativa a diversas funciones biológicas relacionadas con la respuesta inmunitaria.
5. Los macrófagos de pacientes HHT secretan menor cantidad de TSP-1 y de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40 y CCL20 en respuesta a LPS en comparación con aquellas células aisladas de individuos control, tal y como los resultados de los microarrays predicen. Los niveles de producción de Activina A, citoquina que promueve el fenotipo M1 en respuesta a LPS, también están reducidos en macrófagos de pacientes HHT.

6. Los monocitos de sangre periférica de origen murino no expresan endoglina, sin embargo, los macrófagos residentes de tejido analizados como las células de Kupffer, los macrófagos peritoneales (principalmente LPM) y los macrófagos alveolares sí expresan endoglina, observándose diferencias en los niveles de expresión de endoglina entre los diferentes macrófagos tisulares analizados.
7. La expresión de endoglina se induce rápidamente durante la diferenciación *in vitro* de los monocitos de sangre periférica de origen murino y, ésta es concomitante a una mayor expresión de los niveles de CD11b.
8. La extravasación de células a la cavidad peritoneal mediada por un estímulo inflamatorio, induce la transición monocito/macrófago durante la cual los niveles de expresión de endoglina se inducen, si bien con menor rapidez que en los ensayos realizados *in vitro*. La detección de endoglina está restringida a células mieloides F4/80<sup>pos</sup>, por lo que su expresión está vinculada a macrófagos diferenciados y está ausente en granulocitos.
9. El cruce entre la línea *LysMCre* y la línea *Eng<sup>fl/fl</sup>* nos ha permitido generar tres líneas experimentales de ratón: los ratones control o *Eng<sup>wt/wt</sup>LysMCre*, los ratones heterocigotos o *Eng<sup>wt/fl</sup>LysMCre* y los ratones *knockout* específicos de linaje mieloides o *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre*. La delección de endoglina se produce de forma específica en los macrófagos de ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* y *Eng<sup>wt/fl</sup>LysMCre*, manteniéndose íntegra su expresión en otros tipos celulares como el endotelio.
10. Los ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* presentan una mayor predisposición a desarrollar infecciones por patógenos oportunistas como *S. aureus*. Estas infecciones van acompañadas de esplenomegalia que comúnmente se presenta secundaria a un proceso de infección aguda.
11. Los macrófagos de la cavidad peritoneal con una deficiencia en la expresión de endoglina presentan menor actividad y eficiencia fagocítica *in vivo*. La deficiencia observada en los procesos de fagocitosis es independiente de los niveles de TLR2 en la superficie del macrófago.

12. Los ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre*, y en menor medida los ratones *Eng<sup>wt/fl</sup>LysMCre*, muestran un retraso en la mortalidad inducida por un shock séptico mediado por la inyección intraperitoneal de LPS, mostrando además una mayor supervivencia, aunque moderada, en comparación con los ratones control o *Eng<sup>wt/wt</sup>LysMCre*.
13. Los ratones deficientes en la expresión de endoglina en el macrófago, producen una menor cantidad de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en los exudados peritoneales y el suero en comparación con los ratones control tras un shock séptico inducido por LPS. Estas diferencias, aunque moderadas, están reforzadas por la menor capacidad quimioatrayente mostrada por los exudados peritoneales de ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* en los ensayos de quimiotaxis realizados con las células SR.D10.CD4<sup>-</sup>, sugiriendo que la producción de otras quimioquinas pueden estar alterada.
14. En un segundo modelo de peritonitis inducida por Zymosan, se observó un menor infiltrado de células inflamatorias, en su mayoría granulocitos y macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica, en los ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* en comparación con los ratones control, mostrando los ratones heterocigotos (*Eng<sup>wt/fl</sup>LysMCre*) unos valores intermedios.
15. En su conjunto, la expresión de endoglina restringida al macrófago diferenciado, la menor susceptibilidad mostrada por los ratones *Eng<sup>fl/fl</sup>LysMCre* a un shock séptico y su menor efectividad en el reclutamiento de leucocitos inflamatorios tras una peritonitis, sugieren que la expresión de endoglina en el macrófago es relevante en la iniciación de la respuesta inmune.
16. La deficiencia en la expresión de endoglina en macrófagos peritoneales altera la expresión de genes diana del sistema de señalización de TGF- $\beta$ 1 como *Acvr11*, *Pai1*, *Nos2*, *Mmp12* e *InhbA* sugiriendo que endoglina estaría modulando la señalización de TGF- $\beta$ 1 en el macrófago.





# BIBLIOGRAFIA



## VII. BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK, Lichtman AH (2004). *Inmunología celular y molecular*. 5ª Edición. Elsevier España, S.A.
- Abdalla S, Pece-Barbara N, Vera S, Tapia E, Paez E, Bernabeu C, Letarte M (2000). Analysis of ALK-1 and endoglin in newborns from families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Hum Mol Genet* 9:1227-1237.
- Abdollah S, Macías-Silva M, Tsukazaki T, Hayashi H, Attisano L, Wrana JL (1997). TbetaRI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J Biol Chem* 272:27678-27685.
- Aderem A (2003). Phagocytosis and the inflammatory response. *J Infect Dis* 187:s340-s345.
- Aderem A (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593-623.
- Afifi AA, Clark V (1996). *Discriminant analysis*. In: Chapman & Hall/CRC, editor. Computer-aided multivariate analysis. California, Belmont: 243-280.
- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404:193-197
- Albiñana V, Sanz-Rodríguez F, Recio-Poveda L, Bernabéu C, Botella LM (2011). Immunosuppressor FK506 increases endoglin and activin receptor-like kinase 1 expression and modulates transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling in endothelial cells. *Mol Pharmacol* 79:833-843.
- Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani (2008). The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 66:1-9.
- Allen JB, Manthey CL, Hand AR, Ohura K, Ellingsworth L, Wahl SM (1990). Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 171:231-247.
- Allinson KR, Carvalho RL, van den Brink S, Mummery CL, Arthur HM (2007). Generation of a floxed allele of the mouse Endoglin gene. *Genesis* 45:391-395.
- Al-Shahrour, Díaz-Uriarte R and Dopazo J (2004) FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics* 20:578-580.
- Al-Shahrour F, Minguéz P, Tárraga J, Montaner D, Alloza E, Vaquerizas JM, Conde L, Blaschke Ch, Vera J and Dopazo J (2006). BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. *Nucleic Acids Research* 34:472-476.
- Ammon, C., S.P. Meyer, L. Schwarzfischer, S.W. Krause, R. Andreesen, and M. Kreutz. 2000. Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*. 100: 364-369.
- Aristorena M, Blanco FJ, de Las Casas-Engel M, Ojeda-Fernandez L, Gallardo-Vara E, Corbi A, Botella LM, Bernabeu C (2014). Expression of endoglin isoforms in the myeloid lineage and their role during aging and macrophage polarization. *J Cell Sci* 127:2723-2735.
- Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, Charlton R, Parums DV, Jowett T, Marchuk DA, Burn J, Diamond AG (2000). Endoglin, an ancillary TGFbeta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev Biol* 217:42-53.

- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT et al. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 25:25-29
- Ashcroft GS (1999). Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes Infect* 1:1275-1282.
- Attisano L, Cárcamo J, Ventura F, Weis FM, Massagué J, Wrana JL (1993). Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 75:671-680.
- Auffray, C., Sieweke, M.H., Geissmann, F (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27:669-692.
- Bain CC, Scott CL, Uronen-Hansson H, Gudjonsson S, Jansson O, Grip O, Guillems M, Malissen B, Agace WW, Mowat AM (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol* 6:498-510.
- Baldrige MT, King KY, Goodell MA (2011). Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends Immunol* 32:57-65.
- Balkwill F, Mantovani A (2010). Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. *Clin Pharmacol Ther* 87:401-406.
- Barbara NP, Wrana JL, Letarte M (1999). Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. *J Biol Chem* 274:584-594.
- Bartel DP (2009). MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215-233.
- Barth MW, Hendrzak JA, Melnicoff MJ, Morahan PS (1995). Review of the macrophage disappearance reaction. *J Leukoc Biol* 57:361-367.
- Bauvois B, Rouillard D, Sanceau J, Wietzerbin J (1992). IFN-gamma and transforming growth factor-beta 1 differently regulate fibronectin and laminin receptors of human differentiating monocytic cells. *J Immunol* 148:3912-3919.
- Bayrak-Toydemir P, McDonald J, Akarsu N, Toydemir RM, Calderon F, Tuncali T, Tang W, Miller F, Mao R (2006). A fourth locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 7. *Am J Med Genet A* 140:2155-2162.
- Begbie ME, Wallace GMF, Shovlin CL (2003). Hereditary haemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome). A view from the 21st century. *Postgrad Med J* 79:18-24.
- Beger B, Robertson K, Evan A, Grant A, Berg J (2006). Expression of endoglin and the activin receptor-like kinase 1 in skin suggests a role for these receptors in normal skin function and skin tumorigenesis. *Br J Dermatol* 154:379-382.
- Bellón T, Corbí A, Lastres P, Calés C, Cebrián M, Vera S, Cheifetz S, Massagué J, Letarte M, Bernabéu C (1993). Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor- $\beta$ -binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol* 23:2340-2345.
- Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 125:279-284.

- Benzinou M, Clermont FF, Letteboer TG, Kim JH, Espejel S, Harradine KA, Arbelaez J, Luu MT, Roy R, Quigley D, Higgins MN, Zaid M, Aouizerat BE, van Amstel JK, Giraud S, Dupuis-Girod S, Lesca G, Plauchu H, Hughes CC, Westermann CJ, Akhurst RJ (2012). Mouse and human strategies identify PTPN14 as a modifier of angiogenesis and hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Nat Commun* 3:616.
- Berg J, Porteous M, Reinhardt D, Gallione C, Holloway S, Umasunthar T, Lux A, McKinnon W, Marchuck D, Gutmacher A (2003). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a questionnaire based study to delineate the different phenotypes caused by endoglin and ALK1 mutations. *J Med Genet* 40:585-590.
- Berg JN, Gallione CJ, Stenzel TT, Johnson DW, Allen WP, Schwartz CE, Jackson CE, Porteous ME, Marchuk DA (1997). The activin receptor-like kinase 1 gene: genomic structure and mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Am J Hum Genet* 61:60-67.
- Bernhardt BA, Zayac C, Trerotola SO, Asch DA, Pyeritz RE (2012). Cost savings through molecular diagnosis for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Genet Med* 14:604-610.
- Bideau A, Plauchu H, Brunet G, Robert J (1989). Epidemiological investigation of Rendu-Osler disease in France: its geographical distribution and prevalence. *Popul* 44:3-22.
- Blaha M, Cermanova M, Blaha V, Jarolim P, Andrys C, Blazek M, Maly J, Smolej L, Zajic J, Masin V, Zimova R, Rehacek V (2008). Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 197:264-270.
- Blanco FJ, Bernabeu C (2011). Alternative splicing factor or splicing factor-2 plays a key role in intron retention of the endoglin gene during endothelial senescence. *Aging Cell* 10:896-907.
- Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujo B, Velasco S, Rodriguez-Barbero A, Perez-Gomez E, Quintanilla M, López-Novoa JM, Bernabeu C (2008). S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res* 103:1383-1392.
- Blanco FJ, Ojeda-Fernandez L, Aristorena M, Gallardo-Vara E, Benguria A, Dopazo A, Langa C, Botella LM, Bernabeu C (2015). Genome-wide transcriptional and functional analysis of endoglin isoforms in the human promonocytic cell line U937. *J Cell Physiol* 230:947-958.
- Blanco FJ, Santibañez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CP, Bernabeu C (2005). Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol* 204:574-584.
- Blanco P, Schaeverbeke T, Baillet T, Lequen L, Bannwarth B, Dehais J (1998). Rendu-Osler familial telangiectasia angiomatosis and bacterial spondylodiscitis. *Rev Med Interne* 19:938-939.
- Blázquez-Medela AM, García-Ortiz L, Gómez-Marcos MA, Recio-Rodríguez JI, Sánchez-Rodríguez A, López-Novoa JM, Martínez-Salgado C (2010). Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med* 8:86.
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HE (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342:1350-1358.

- Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C (1992). Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J Biol Chem* 267:23301-23308.
- Botella LM, Albiñana V, Ojeda-Fernandez L, Recio-Poveda L, Bernabéu C (2015). Research on potential biomarkers in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet* 6:115.
- Bottalico LA, Wager RE, Agellon LB, Assoian RK, Tabas I (1991). Transforming growth factor-beta 1 inhibits scavenger receptor activity in THP-1 human macrophages. *J Biol Chem* 266:22866-22871.
- Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M (1999). A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 104:1343-1351.
- Bourdeau A, Faughnan ME, McDonald ML, Paterson AD, Wanless IR, Letarte M (2001). Potential role of modifier genes influencing transforming growth factor-beta1 levels in the development of vascular defects in endoglin heterozygous mice with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Pathol* 158:2011-2020.
- Brandes RP, Fleming I, Busse R (2005). Endothelial aging. *Cardiovasc Res* 66:286-294.
- Braverman IM, Keh A, Jacobson BS (1990). Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Invest Dermatol* 95:422-427.
- Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, Barnett JV (1999). Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science*. 283:2080-2082.
- Brunyanszki A, Erdelyi K, Szczesny B, Olah G, Salomao R, Herndon DN, Szabo C (2015). Upregulation and mitochondrial sequestration of hemoglobins occurs in circulating leukocytes during critical illness, conferring a cytoprotective phenotype. *Mol Med* doi: 10.2119/molmed.2015.00187.
- Burke JP, Watson RW, Mulsow JJ, Docherty NG, Coffey JC, O'Connell PR (2010). Endoglin negatively regulates transforming growth factor beta1-induced profibrotic responses in intestinal fibroblasts. *Br J Surg* 97:892-901.
- Bühring HJ, Müller CA, Letarte M, Gougos A, Saalmüller A, van Agthoven AJ, Busch FW (1991). Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. *Leukemia* 5:841-847.
- Cailhier JF, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Ko K, Watson S, Savill J, Hughes J, Lang RA (2005). Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J Immunol* 174:2336-2342.
- Calabrò L, Fonsatti E, Bellomo G, Alonci A, Colizzi F, Sigalotti L, Altomonte M, Musolino C, Maio M (2003). Differential levels of soluble endoglin (CD105) in myeloid malignancies. *J Cell Physiol* 194:171-175.
- Carmeliet P (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9:653-660.
- Carvalho RL, Jonker L, Goumans MJ, Larsson J, Bouwman P, Karlsson S, Dijke PT, Arthur HM, Mummery CL (2004). Defective paracrine signalling by TGFbeta in yolk sac vasculature of endoglin mutant mice: a paradigm for hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Development* 131:6237-6247.

- Cassado Ados A, D'Império Lima MR, Bortoluci KR (2015). Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front Immunol* 6:225.
- Castonguay R, Werner ED, Matthews RG, Presman E, Mulivor AW, Solvan N, Sako D, Pearsall RS, Underwood KW, Seehra J, Kumar R, Grinberg AV (2011). Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *J Biol Chem* 286:30034-30046.
- Chang H, Brown CW, Matzuk MM (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23:787-823.
- Charo IF, Ransohoff RM (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354:610-621.
- Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, Letarte M (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267:19027-19030.
- Chen Y, Hao Q, Kim H, Su H, Letarte M, Karumanchi SA, Lawton MT, Barbaro NM, Yang GY, Young WL (2009). Soluble endoglin modulates aberrant cerebral vascular remodeling. *Ann Neurol*. 66:19-27.
- Chen CZ, Li L, Li M, Lodish HF (2003). The endoglin(positive) sca-1(positive) rhodamine(low) phenotype defines a near-homogenous population of long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Immunity* 19:525-533.
- Chen CZ, Li M, de Graaf D, Monti S, Göttgens B, Sanchez MJ, Lander ES, Golub TR, Green AR, Lodish HF (2002). Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15468-15473.
- Chen KH, Lin CH (2013). Brain abscess as an initial presentation in a patient of hereditary haemorrhagic telangiectasia caused by a novel ENG mutation. *BMJ Case Rep* doi: 10.1136/bcr-2013-008802.
- Chen W, Sun Z, Han Z, Jun K, Camus M, Wankhede M, Mao L, Arnold T, Young WL, Su H (2014). De novo cerebrovascular malformation in the adult mouse after endothelial Alk1 deletion and angiogenic stimulation. *Stroke* 45:900-902.
- Cho SK, Bourdeau A, Letarte M, Zúñiga-Pflücker JC (2001). Expression and function of CD105 during the onset of hematopoiesis from Flk1(+) precursors. *Blood* 98:3635-3642.
- Choi EJ, Chen W, Jun K, Arthur HM, Young WL, Su H (2014). Novel brain arteriovenous malformation mouse models for type 1 hereditary hemorrhagic telangiectasia. *PLoS One* 9:e88511.
- Choi EJ, Walker EJ, Degos V, Jun K, Kuo R, Pile-Spellman J, Su H, Young WL (2013). Endoglin deficiency in bone marrow is sufficient to cause cerebrovascular dysplasia in the adult mouse after vascular endothelial growth factor stimulation. *Stroke* 44:795-798.
- Choi EJ, Walker EJ, Shen F, Oh SP, Arthur HM, Young WL, Su H (2012). Minimal homozygous endothelial deletion of Eng with VEGF stimulation is sufficient to cause cerebrovascular dysplasia in the adult mouse. *Cerebrovasc Dis* 33:540-547.
- Christensen JL, Weissman IL (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14541-14546.



- Cirulli A, Liso A, D'Ovidio F, Mestice A, Paculli G, Gallitelli M, Rizzi R, Specchia G, Sabbà C (2003). Vascular endothelial growth factor serum levels are elevated in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Acta Haematol* 110:29-32.
- Cirulli A, Loria MP, Dambra P, Di Serio F, Ventura MT, Amati L, Jirillo E, Sabbà C (2006). Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT) exhibit a deficit of polymorphonuclear cell and monocyte oxidative burst and phagocytosis: a possible correlation with altered adaptive immune responsiveness in HHT. *Curr Pharm Des* 12:1209-1215.
- Coelho AL, Hogaboam CM, Kunkel SL (2005). Chemokines provide the sustained inflammatory bridge between innate and acquired immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:553-560.
- Cole SG, Begbie ME, Wallace GM, Shovlin CL (2005). A new locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT3) maps to chromosome 5. *J Med Genet* 42:577-582.
- Combadiere C, Potteaux S, Rodero M, Simon T, Pezard A, Esposito B, Merval R, Proudfoot A, Tedgui A, Mallat Z (2008). Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytois and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117:1649-1657.
- Comité Asesor de Vacunas de la AEP (2001). "Vacunaciones en situaciones especiales. Inmunodeficiencias primarias". Manual de Vacunas en Pediatría, 424-425.
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* 93:1159-1170.
- Cymerman U, Vera S, Pece-Barbara N, Bourdeau A, White RI Jr, Dunn J, Letarte M (2000). Identification of hereditary hemorrhagic telangiectasia type I in newborns by protein expression and mutation analysis of endoglin. *Pediatr Res* 47:24-35.
- Dakeishi M, Shioya T, Wada Y, Shindo T, Otaka K, Manabe M, Nozaki J, Inoue S, Koizumi A (2002). Genetic epidemiology of hereditary haemorrhagic telangiectasia in a local community in the northern part of Japan. *Hum Mutat* 19:140-148.
- David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S (2007). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* 109:1953-1961.
- Davies JQ, Gordon S (2005). Isolation and culture of human macrophages. *Methods Mol Biol* 290:105-116.
- Davies LC, Rosas M, Jenkins SJ, Liao CT, Scurr MJ, Brombacher F, Fraser DJ, Allen JE, Jones SA, Taylor PR (2011). Distinct bone marrow-derived and tissue resident macrophage-lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat Commun* 4:1886.
- Davies LC, Rosas M, Smith PJ, Fraser DJ, Jones SA, Taylor PR (2011). A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur J Immunol* 41:2155-2164.
- De Kraker ME, Davey PG, Grundmann H: BURDEN study group (2011). Mortality and hospital stay associated with resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteremia: estimating the burden of antibiotic resistance in Europe. *PLoS Med* 8:e1001104.

- Dietmann A, Helbok R, Lackner P, Fisher M, Reindl M, Iell B, Issifou S, Kremsner PG, Schmutzhard E. (2009). Endoglin in African children with Plasmodium falciparum malaria: a novel player in severe malaria pathogenesis? *J Infect Dis* 200:1842-1848.
- Donaldson JW, McKeever TM, Hall IP, Hubbard RB, Fogarty AW (2014). The UK prevalence of hereditary haemorrhagic telangiectasia and its association with sex, socioeconomic status and region of residence: a population-based study. *Thorax* 69:161-167.
- Dong SL, Reynolds SF, Steiner IP (2001). Brain abscess in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia: case report and literature review. *J Emerg Med* 20:247-251.
- Du C, Sriram S (1998). Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40 production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells. *J Leukoc Biol* 64:92-97.
- Dupuis-Girod S, Giraud S, Decullier E, Lesca G, Cottin V, Faure F, Merrot O, Saurin JC, Cordier JF, Plauchu H (2007). Hemorrhagic hereditary telangiectasia (Rendu-Osler disease) and infectious diseases: an underestimated association. *Clin Infect Dis* 44:841-845.
- Duval X, Djendli S, Le Moing V, Longuet P, Barry B, Lepout C, Vildé JL (2001). Recurrent Staphylococcus aureus extracerebral infections complicating hereditary hemorrhagic telangiectasia (Osler-Rendu-Weber disease). *Am J Med* 110:671-672.
- Elton TS, Selemón H, Elton SM, Parinandi NL (2013). Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene* 532:1-12.
- Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L (1996). MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86:543-552.
- Faughnan ME, Palda VA, Garcia-Tsao G, Geisthoff UW, McDonald J, Proctor DD, Spears J, Brown DH, Buscarini E, Chesnutt MS, Cottin V, Ganguly A, Gossage JR, Guttmacher AE, Hyland RH, Kennedy SJ, Korzenik J, Mager JJ, Ozanne AP, Piccirillo JF, Picus D, Plauchu H, Porteous ME, Pyeritz RE, Ross DA, Sabba C, Swanson K, Terry P, Wallace MC, Westermann CJ, White RI, Young LH, Zarrabeitia R; HHT Foundation International - Guidelines Working Group (2011). International guidelines for the diagnosis and management of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 48:73-87.
- Feng XH, Zhang Y, Wu RY, Derynck R (1998). The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev.* 12:2153-2163.
- Fernandez-L A, Garrido-Martin EM, Sanz-Rodriguez F, Pericacho M, Rodriguez-Babrbero A, Eleno N, Lopez-Novoa JM, Düwell A, Vega MA, Bernabeu C, Botella LM (2007). Gene expression fingerprinting for human hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Hum Mol Genet* 16:1515-1533.
- Fernandez LA, Sanz-Rodriguez F, Blanco FJ, Bernabeu C, Botella LM (2006). Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. *Clin Med Res* 4:66-78.
- Fernandez-L A, Sanz-Rodriguez F, Zarrabeitia R, Pérez-Molino A, Hebbel RP, Nguyen J, Bernabéu C, Botella LM (2005). Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic

- Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res* 68:235-248.
- Fernández-Ruiz E, St-Jacques S, Bellón T, Letarte M, Bernabéu C (1993). Assignment of the human endoglin gene (END) to 9q34 → qter. *Cytogenet Cell Genet* 64:204-207.
- Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, Gale NW, Witzentrath M, Rosseau S, Suttorp N, Sobke A, Herrmann M, Preissner KT, Vajkoczy P, Augustin HG (2006). Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* 12:235-239.
- Finson KW, Parker WL, ten Dijke P, Thorikay M, Philip A (2008). ALK1 opposes ALK5/Smad3 signaling and expression of extracellular matrix components in human chondrocytes. *J Bone Miner Res* 23:896-906.
- Fontalba A, Fernández-Luna JL, Zarrabeitia R, Recio-Poveda L, Albiñana V, Ojeda-Fernández ML, Bernabéu C, Alcaraz LA, Botella LM (2013). Copy number variations in endoglin locus: mapping of large deletions in Spanish families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *BMC Med Genet* 14:121.
- Friedman AD (2002). Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 21:3377-3390.
- Fulbright RK, Chaloupka JC, Putman ChM, Sze GK, Merriam MM, Lee GK, Fayad PB, Awad IA, White RI Jr (1998). MR of hereditary hemorrhagic telangiectasia: prevalence and spectrum of cerebrovascular malformations. *Am J Neuroradiol* 19:477-484.
- Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte MH, Jackson D, Suri C, Campochiaro PA, Wiegand SJ, Yancopoulos GD (2002). Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Dev Cell* 3:411-423.
- Gallione CJ, Richards JA, Letteboer TG, Rushlow D, Prigoda NL, Leedom TP, Ganguly A, Castells A, Ploos van Amstel JK, Westermann CJ, Pyeritz RE, Marchuk DA (2006). SMAD4 mutations found in unselected HHT patients. *J Med Genet* 43:793-797.
- Gallitelli M, Guastamacchia E, Resta F, Guanti G, Sabbà C (2006). Pulmonary arteriovenous malformations, hereditary hemorrhagic telangiectasia, and brain abscess. *Respiration* 73:553-557.
- Gallitelli M, Lepore V, Pasculli G, Di Gennaro L, Logroscino G, Carella A, White RI, Sabbà C (2005). Brain abscess: a need to screen for pulmonary arteriovenous malformations. *Neuroepidemiology* 24:76-78.
- Garrido-Martin EM, Nguyen HL, Cunningham TA, Choe SW, Jiang Z, Arthur HM, Lee YJ, Oh SP (2014). Common and distinctive pathogenetic features of arteriovenous malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia 1 and hereditary hemorrhagic telangiectasia 2 animal models—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34:2232-2236.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 327:656-661.

- Ghosn EE, Cassado AA, Govoni GR, Fukuhara T, Yang Y, Monack DM, Bortoluci KR, Almeida SR, Herzenberg LA (2010). *Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 2568-2573.
- Giordano P, Lenato GM, Pierucci P, Suppressa P, Altomare M, Del Vecchio G, Di Bitonto G, De Mattia D, Guanti G, Sabbà C (2009). Effects of VEGF on phenotypic severity in children with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Pediatr Hematol Oncol* 31:577-582.
- Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, de Bruijn MF, Geissmann F, Rodewald HR (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature* 518:547-551.
- Goossens S, Janzen V, Bartunkova S, Yokomizo T, Drogat B, Crisan M, Haigh K, Seuntjens E, Umans L, Riedt T, Bogaert P, Haenebalcke L, Berx G, Dzierzak E, Huylebroeck D, Haigh JJ (2011). The EMT regulator Zeb2/Sip1 is essential for murine embryonic hematopoietic stem/progenitor cell differentiation and mobilization. *Blood* 117:5620-5630.
- Gordon S, Plüddemann A, Martinez Estrada F (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev* 262:36-55.
- Gordon S, Taylor PR (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5:953-964.
- Göthert JR, Gustin SE, van Eekelen JA, Schmidt U, Hall MA, Jane SM, Green AR, Göttgens B, Izon DJ, Begley CG (2004). Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood* 104:1769-1777.
- Gougos A, Letarte M (1988a). Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 141:1925-1933.
- Gougos A, Letarte M (1988b). Biochemical characterization of the 44G4 antigen from the HOON pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 141:1934-1940.
- Gougos A, Letarte M (1990). Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem* 265:8361-8364.
- Gougos A, St Jacques S, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJ, Bühring HJ, Bernabeu C, van Mourik JA, Letarte M (1992). Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. *Int Immunol* 4:83-92.
- Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G (2003a). Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- $\beta$  receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med* 13:301-307.
- Goumans MJ, Mummery C (2000). Functional analysis of the TGF $\beta$  receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* 44:253-265.
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S, ten Dijke P (2003b). Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGF $\beta$ /ALK5 signaling. *Mol Cell* 12:817-828.
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- $\beta$  type I receptors. *EMBO J* 21:1743-1753.

- Govani FS, Shovlin CL (2010). Fine mapping of the hereditary haemorrhagic telangiectasia (HHT)3 locus on chromosome 5 excludes VE-Cadherin-2, Sprouty 4 and other interval genes. *J Angiogenesis Res* 2:15.
- Govinden R, Bhoola KD (2003). Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 98:257-265.
- Gregory CD, Devitt A (2004). The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically? *Immunology* 113:1-14.
- Gu Y, Jin P, Zhang L, Zhao X, Gao X, Ning Y, Meng A, Chen YG (2006). Functional analysis of mutations in the kinase domain of the TGF-beta receptor ALK1 reveals different mechanisms for induction of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Blood* 107:1951-1954.
- Guerrero-Esteo M, Sanchez-Elsner T, Letamendia A, Bernabeu C (2002). Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 277:29197-29209.
- Guilhem A, Malcus C, Clarivet B, Plauchu H, Dupuis-Girod S (2013). Immunological abnormalities associated with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Intern Med* 274:351-362.
- Guo B, Slevin M, Li C, Parameshwar S, Liu D, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S (2004). CD105 inhibits transforming growth factor-beta-Smad3 signalling. *Anticancer Res* 24:1337-1345.
- Guttmacher AE, Marchuck DA, White RI Jr (1995). Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 333:918-924.
- Guttmacher AE, Marchuck DA, Trerotola SO, Pyeritz RE (2012). Hereditary hemorrhagic telangiectasia. En: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR, eds. *Principles and Practice of Medical Genetics*. 6ª edición. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone.
- Guttmacher AE, McKinnon WC, Upton MD (1994). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: a disorder in search of the genetics community. *Am J Med Genet* 52:252-253.
- Haarmann S, Budihardja AS, Hölzle F, Wolff KD (2007). Subcutaneous temporal abscess as a clinical manifestation of pulmonary arteriovenous malformations in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber disease). *Int J Oral Maxillofac Surg* 36:1211-1214.
- Haitjema T, Disch F, Overtoom TTC, Westermann CJJ (1995). Screening family members of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Med* 99:519-524.
- Han C, Choe SW, Kim YH, Acharya AP, Keselowsky BG, Sorg BS, Lee YJ, Oh SP (2014). VEGF neutralization can prevent and normalize arteriovenous malformations in an animal model for hereditary hemorrhagic telangiectasia 2. *Angiogenesis* 17:823-830.
- Han J, Hajjar DP, Taurus JM, Feng J, Gotto AM Jr, Nicholson AC (2000). Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem* 275:1241-1246.
- Hanes FM (1909). Multiple hereditary telangiectases causing hemorrhage (hereditary hemorrhagic telangiectasia). *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 20:63-73.

- Hawinkels LJ, Kuiper P, Wiercinska E, Verspaget HW, Liu Z, Pardali E, Sier CF, ten Dijke P (2010). Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res* 70:4141-4150.
- Heldin C-H, Miyazono K, ten Dijke P (1997). TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471.
- Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, Low D, Almeida FF, See P, Beaudin AE, Lum J, Low I, Forsberg EC, Poidinger M, Zolezzi F, Larbi A, Ng LG, Chan JK, Greter M, Becher B, Samokhvalov IM, Merad M, Ginhoux F (2015). C-Myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* 42:665-678.
- Hotchkiss RS, Karl IE (2003). The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348:138-150.
- Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, Stapleton M, O'Connor MB, Atissano L, Wrana JL (1996). MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* 85:489-500.
- Houghton AM, Hartzell WO, Robbins CS, Gomis-Rüth FX, Shapiro SD (2009). Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages. *Nature* 460:637-641.
- Hume DA (2008). Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal Immunol* 1:432-441.
- Imai K, Takeshita A, Hanazawa S (2000). Transforming growth factor-beta inhibits lipopolysaccharide-stimulated expression of inflammatory cytokines in mouse macrophages through downregulation of activation protein 1 and CD14 receptor expression. *Infect Immun* 68:2418-2423.
- Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, Lang R, Haniffa M, Collin M, Tacke F, Habenicht AJ, Ziegler-Heitbrock L, Randolph GJ (2010). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 115:e10-e19.
- Isner JM, Kalka C, Kawamoto A, Asahara T (2001). Bone marrow as a source of endothelial cells for natural and iatrogenic vascular repair. *Ann N Y Acad Sci* 953:75-84.
- Italiani P, Boraschi D (2014). From Monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs functional differentiation. *Front Immunol* 5:514.
- Italiani P, Boraschi D (2015). New insights into tissue macrophages: from origin to the development of memory. *Immune Netw* 15:167-175.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
- Jerkic M, Peter M, Ardelean D, Fine M, Konerding MA, Letarte M (2010). Dextran sulfate sodium leads to chronic colitis and pathological angiogenesis in Endoglin heterozygous mice. *Inflamm Bowel Dis* 16:1859-1870.
- Jerkic M, Rodríguez-Barbero A, Prieto M, Toporsian M, Pericacho M, Rivas-Elena JV, Obreo J, Wang A, Pérez-Barriocanal F, Arévalo M, Bernabéu C, Letarte M, López-Novoa JM (2006). Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res* 69:845-854.
- Jessurun GA, Kamphius DJ, Van der Zande FH, Nossent JC (1993). Cerebral arteriovenous malformations in The Netherlands Antilles. High prevalence of hereditary hemorrhagic telangiectasia-related single and multiple cerebral arteriovenous malformations. *Clin Neurol Neurosurg* 95:193-198.

- Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CJ, Marondel I, Yoon SJ, Stenzel TT, Speer M, Pericak-Vance MA, Diamond A, Guttmacher AE, Jackson CE, Attisano L, Kucherlapati R, Porteous ME, Marchuk DA (1996). Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nature Genet* 13:189-195.
- Jonson T, Albrechtsson E, Axelson J, Heidenbland M, Gorunova L, Johansson B, Hoglund M (2001). Altered expression of TGF $\beta$  receptors and mitogenic effects of TGF $\beta$  in pancreatic carcinomas. *Int J Oncol* 19:71-81.
- Kawaguchi T, Fujita S, Yamada H, Nishida Y, Izawa I (1990). Multiple cerebral and pulmonary arteriovenous malformations in association with brain and subcutaneous abscesses: a possible variant of hereditary hemorrhagic telangiectasia-case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 30:272-276.
- Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS (1986). Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 163:1037-1050.
- Kim H, Marchuk DA, Pawlikowska L, Chen Y, Su H, Yang GY, Young WL (2008). Genetic considerations relevant to intracranial hemorrhage and brain arteriovenous malformations. *Acta Neurochir Suppl* 105:199-206.
- Kjeldsen AD, Oxhøj H, Andersen PE, Elle B, Jacobsen JP, Vase P (1999). Pulmonary arteriovenous malformations: screening procedures and pulmonary angiography in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Chest* 116:432-439.
- Kjeldsen AD, Tørring PM, Nissen H, Andersen PE (2014). Cerebral abscesses among Danish patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Acta Neurol Scand* 129:192-197.
- Kjeldsen AD, Vase P, Green A (1999). Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT): a population-based study of prevalence and mortality in Danish HHT patients. *J Intern Med* 245:31-39.
- Koleva RI, Conley BA, Romero D, Riley KS, Marto JA, Lux A, Vary CP (2006). Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor- $\beta$  receptors. *J Biol Chem* 281:25110-25123.
- Komiyama M, Ishiguro T, Umaba R, Suzuki T (2014). Hereditary hemorrhagic telangiectasia in Japanese patients. *J Hum Genet* 59:37-41.
- Kondo M, Weissman IL, Akashi K (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91:661-672.
- Konig HG, Kogel D, Rami A, Prehn JH (2005). TGF- $\beta$ 1 activates two distinct type I receptors in neurons: implications for neuronal NF- $\kappa$ B signaling. *J Cell Bio* 168:1077-1086.
- Koppen S, Korver CR, Dalinghaus M, Westermann CJ (2002). Neonatal pulmonary arteriovenous malformation in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 87:F226-F227.
- Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geisser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:770-774.

- Lagasse E, Weissman IL (1997). Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in *op/op* mice. *Cell* 89:1021-1031.
- Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massagué J (1996). Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 383:832-836.
- Laiosa CV, Stadtfeld M, Graf T (2006). Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification. *Annu Rev Immunol* 24:705-738.
- Lastres P, Bellon T, Cabañas C, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Gougos A, Letarte M, Bernabéu C (1992). Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol* 22:393-397.
- Lastres P, Letamendía A, Zhang H, Rius C, Almendro N, Raab U, López LA, Langa C, Fabra A, Letarte M, Bernabéu C (1996). Endoglin modulates cellular responses to TGF- $\beta$ 1. *J Cell Biol* 133:1109-1121.
- Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM, ten Dijke P (2004). Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J* 23:4018-4028.
- Lemieux C, Maliba R, Favier J, Théorêt JF, Merhi Y, Sirois MG (2005). Angiopoietins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood* 105:1523-1530.
- Lesca G, Olivieri C, Burnichon N, Pagella F, Carette MF, Gilbert-Dussardier B, Goizet C, Roume J, Rabilloud M, Saurin JC, Cottin V, Honnorat J, Coulet F, Giraud S, Calender A, Danesino C, Buscarini E, Plauchu H; French-Italian-Rendu-Osler Network (2007). Genotype-phenotype correlations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: data from the French-Italian HHT network. *Genet Med* 9:14-22.
- Letamendia A, Lastres P, Botella LM, Raab U, Langa C, Velasco B, Attisano L, Bernabeu C (1998). Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor-beta. A comparative study with betaglycan. *J Biol Chem* 273:33011-33019.
- Letarte M, McDonald ML, Li C, Kathirkamathamby K, Vera S, Pece-Barbara N, Kumar S (2005). Reduced endothelial secretion and plasma levels of transforming growth factor-beta1 in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Cardiovasc Res* 68:155-164.
- Letteboer TG, Mager JJ, Snijder RJ, Koeleman BP, Lindhout D, Ploos van Amstel JK, Westermann CJ (2006). Genotype-phenotype relationship in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 43:371-377.
- Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA; CPEP Study Group (2006). Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 355:992-1005.
- Li C, Guo B, Ding S, Rius C, Langa C, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S (2003). TNF alpha down-regulates CD105 expression in vascular endothelial cells: a comparative study with TGF beta 1. *Anticancer Res* 23:1189-1196.
- Li CG, Guo BQ, Wilson PB, Stewart A, Byrne G, Bundred N, Kumar S (2000). Plasma levels of soluble CD105 correlate with metastasis in patients with breast cancer. *Int J Cancer* 89:122-126.



- Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S (2000). CD105 antagonizes the inhibitory signalin of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J* 14:55-64.
- Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, Boak BB, Wendel DP (1999). Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284:1534-1537.
- Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA (2006). Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24:99-146.
- Li L, Zhao XY, Wang BE (2008). Down-regulation of transforming growth factor beta 1/activin receptor-like kinase 1 pathway gene expression by herbal compound 861 is related to deactivation of LX-2 cells. *World J Gastroenterol* 14:2894-2899.
- Liddiard K, Rosas M, Davies LC, Jones SA, Taylor PR (2011). Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *Eur J Immunol* 41:2503-2508.
- Liu Z, Afink GB, ten Dijke P (2012). Soluble fms-like tyrosine kinase 1 and soluble endoglin are elevated circulating anti-angiogenic factors in pre-eclampsia. *Pregnancy Hypertension* 2:358-367.
- Liu Z, Lebrin F, Maring JA, van den Driesche S, van der Brink S, van Dinther M, Thorikay M, Martin S, Kobayashi K, Hawinkels LJ, van Meeteren LA, Pardali E, Korvin J, Letarte M, Arthur HM, Theuer C, Goumans MJ, Mummery C, ten Dijke P (2014). ENDOGLIN is dispensable for vasculogenesis, but required for vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *PLoS One* 9:e86273.
- Liu F, Pouonnot C, Massagué J (1997). Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGFbeta-inducible transcriptional complexes. *Genes Dev* 11:3157-3167.
- López-Novoa JM, Bernabeu C (2010). The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H959-H974.
- Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W, Roers A, Eming SA (2010). Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J Immunol* 184:3964-3977.
- Lux A, Attisano L, Marchuk DA (1999). Assignment of transforming growth factor beta1 and beta3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. *J Biol Chem* 274:9984-9992.
- Madri JA, Pratt BM, Tucker AM (1988). Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. *J Cell Biol* 106:1375-1384.
- Mahmoud M, Allinson KR, Zhai Z, Oakenfull R, Ghandi P, Adams RH, Fruttinger M, Arthur HM (2010). Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin. *Circ Res* 106:1425-1433.
- Mahmoud M, Upton PD, Arthur HM (2011). Angiogenesis regulation by TGFβ signalling: clues from an inherited vascular disease. *Biochem Soc Trans* 39:1659-1666.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davies S, Sato TN, Yancopoulos GD (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277:55-60.
- Mancini ML, Verdi JM, Conley BA, Nicola T, Spicer DB, Oxburgh LH, Vary CP (2007). Endoglin is required for myogenic differentiation potential of neural crest stem cells. *Dev Biol*. 308:520-533.

- Mandriota SJ, Pepper MS (1998). Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res* 83:852-859.
- Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 229:176-185.
- Mantovani A, Sica A, Locati M (2005). Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23:344-346.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25:677-686.
- Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K (2001) Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97:3333-3341.
- Marchuk DA, Guttmacher AE, Penner JA, Ganguly P (1998). Report on workshop on Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Am J Med Genet* 76:269-273.
- Martinez FO, Helming L, Milde R, Varin A, Melgert BN, Draijer C, Thomas B, Fabbri M, Crawshaw A, Ho LP, Ten Hacken NH, Cobos Jiménez V, Kootstra NA, Hamann J, Greaves DR, Locati M, Mantovani A, Gordon S (2013). Genetic programs expressed in resting and IL-4 alternatively activated mouse and human macrophages: similarities and differences. *Blood* 121:e57-e69.
- Massagué J (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791.
- Massagué J (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:169-178.
- Massagué J, Blain SW, Lo RS (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103:295-309.
- Mathis S, Dupuis-Girod S, Plauchu H, Giroud M, Barroso B, Ly KH, Ingrand P, Gilbert B, Godenèche G, Neau JP (2012). Cerebral abscesses in hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical and microbiological evaluation. *Clin Neurol Neurosurg* 114:235-240.
- Mathisen GE, Johnson JP (1997). Brain abscess. *Clin Infect Dis* 25:763-779.
- McAllister KA, Lennon F, Bowles-Biesecker B, McKinnon WC, Helmbold EA, Markel DS, Jackson CE, Guttmacher AE, Pericak-Vance MA, Marchuk DA (1994). Genetic heterogeneity in hereditary haemorrhagic telangiectasia: possible correlation with clinical phenotype. *J Med Genet* 31:927-932.
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al. (1994). Endoglin, a TGF- $\beta$  binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nature Genet* 8:345-351.
- McDonald JE, Miller FJ, Hallam SE, Nelson L, Marchuck DA, Ward KJ (2000). Clinical manifestations in a large hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2 kindred. *Am J Med Genet* 93:320-327.
- McDonald J, Pyeritz RE (2000). Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Última actualización en 2014.
- Medinger M, Halter J, Heim D, Buser A, Gerull S, Stern M, Passweg J (2015). Angiogenic markers in plasma cell myeloma patients treated with novel agents. *Anticancer Res* 35:1085-1090.

- Merwin JR, Anderson JM, Kocher O, Van Itallie CM, Madri JA (1990). Transforming growth factor beta 1 modulates extracellular matrix organization and cell-cell junctional complex formation during in vitro angiogenesis. *J Cell Physiol* 142:117-128.
- Meurer SK, Tihaa L, Borkham-Kamphorst E, Weiskirchen R (2011). Expression and functional analysis of endoglin in isolated liver cells and its involvement in fibrogenic Smad signalling. *Cell Signal* 23: 683-699.
- Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E, Rifkin DB (1989). In vitro angiogenesis on the human amniotic membrane: requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J Cell Biol* 108:671-682.
- Milton I, Ouyang D, Allen CJ, Yanasak NE, Gossage JR, Alleyne CH Jr, Seki T (2012). Age-dependent lethality in novel transgenic mouse models of central nervous system arteriovenous malformations. *Stroke* 43:1432-1435.
- Mo J, Fang SJ, Chen W, Blobe GC (2002). Regulation of ALK-1 signaling by the nuclear receptor LXRbeta. *J Biol Chem* 277:50788-50794.
- Moody JL, Singbrant S, Karlsson G, Blank U, Aspling M, Flygare J, Bryder D, Karlsson S (2007). Endoglin is not critical for hematopoietic stem cell engraftment and reconstitution but regulates adult erythroid development. *Stem Cells* 25:2809-2819.
- Morales C, Megía R, Del Valle A, Mazón A, García Mantilla J, Rama J (1997). La enfermedad de Rendu-Osler-Weber (telangiectasia hemorrágica hereditaria). Presentación de 30 casos. *Acta Otorrinolaring Esp* 48:625-629.
- Morgan T, McDonald J, Anderson CH, Ismail M, Miller F, Mao R, Madan A, Barnes P, Hudgins L, Manning M (2002). Intracranial hemorrhage in infants and children with hereditary hemorrhagic telangiectasia (Osler-Weber-Rendu syndrome). *Pediatrics* 109:E12.
- Morrison SJ, Hemmati HD, Wandycz AM, Weissman IL (1995). The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10302-10306.
- Morrison SJ, Weissman IL (1994). The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1:661-673.
- Mosser DM, Edwards JP (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8:958-969.
- Müller G, Behrens J, Nussbaumer U, Böhlen P, Birchmeier W (1987). Inhibitory action of transforming growth factor beta on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5600-5604.
- Musso M, Capone A, Chinello P, Di Bella S, Galati V, Noto P, Taglietti F, Topino S, Petrosillo N (2014). Extra-cerebral severe infections associated with haemorrhagic hereditary telangiectasia (Rendu-Osler-Weber Disease): five cases and a review of the literature. *Infez Med* 22:48-50.
- Musson RA (1983). Human serum induces maturation of human monocytes in vitro. Changes in cytolytic activity, intracellular lysosomal enzymes, and nonspecific esterase activity. *Am J Pathol* 111: 331-340.
- Mylona E, Vadala C, Papastamopoulos V, Skoutelis A (2012). Brain abscess caused by *Enterococcus faecalis* following a dental procedure in a patient with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Microbiol* 50:1807-1809.

- Naiki Y, Michelsen KS, Zhang W, Chen S, Doherty TM, Arditi M (2005). Transforming growth factor-beta differentially inhibits MyD88-dependent, but not TRAM- and TRIF-dependent, lipopolysaccharide-induced TLR4 signaling. *J Biol Chem* 280:5491-5495.
- Nandan D, Reiner NE (1997). TGF-beta attenuates the class II transactivator and reveals an accessory pathway of IFN-gamma action. *J Immunol* 158:1095-1101.
- O'Connell PJ, McKenzie A, Fiscaro N, Rockman SP, Pearse MJ, d'Apice JF (1992). Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol* 90:154-159.
- Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:2626-2631.
- Osler W (1901). On a family form of recurring epistaxis, associated with multiple telangiectases of the skin and mucous membranes. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital* 12:333-337.
- Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H, Miyazono K (2002). Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor-beta in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol* 193:299-318.
- Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P (2010). Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol* 20:556-567.
- Park S, Dimaio TA, Liu W, Wang S, Sorenson CM, Sheibani N (2013). Endoglin regulates the activation and quiescence of endothelium by participating in canonical and non-canonical TGF- $\beta$  signaling pathways. *J Cell Sci* 126(Pt 6):1392-1405.
- Park SO, Wankhede M, Lee YJ, Choi EJ, Fliess N, Choe SW, Oh SH, Walter G, Raizada MK, Sorg BS, Oh SP (2009). Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest* 119:3487-3496.
- Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L, Vassalli JD (1990). Transforming growth factor-beta 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 111:743-755.
- Pepper MS, Vassalli JD, Orci L, Montesano R (1993). Biphasic effect of transforming growth factor-beta 1 on in vitro angiogenesis. *Exp Cell Res* 204:356-363.
- Pérez-Gómez E, Del Castillo G, Juan Francisco S, López-Novoa JM, Bernabéu C, Quintanilla M (2010). The role of the TGF- $\beta$  correceptor endoglin in cancer. *ScientificWorldJournal* 10:2367-2384.
- Pérez-Gómez E, Eleno N, López-Novoa JM, Ramirez JR, Velasco B, Letarte M, Bernabéu C, Quintanilla M (2005). Characterization of murine S-endoglin isoform and its effects on tumor development. *Oncogene* 24:4450-4461.
- Perlingeiro RC (2007). Endoglin is required for hemangioblast and early hematopoietic development. *Development* 134:3041-3048.
- Plauchu H, De Chadarevian JP, Bideau A, Robert JM (1989). Age-related clinical profile of hereditary hemorrhagic telangiectasia in an epidemiologically recruited population. *Am J Med Genet* 32:291-297.

- Pohl D, Andrýs C, Borská L, Fiala Z, Hamaková K, Ettler K, Krejsek J (2011). Serum levels of a soluble form of endoglin (CD105) is decreased after Goeckerman's therapy of psoriasis. *Acta medica (Hradec Kralove)* 54:59-62.
- Porteous MEM, Burn J, Proctor SJ (1992). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: a clinical analysis. *J Med Genet* 29:527-530.
- Porteous ME, Curtis A, Williams O, Marchuk D, Bhattacharya SS, Burn J (1994). Genetic heterogeneity in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 31:925-926.
- Quintanilla M, Ramirez JR, Pérez-Gómez E, Romero D, Velasco B, Letarte M, López-Novoa JM, Bernabéu C (2003). Expression of the TGF- $\beta$  coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis. *Oncogene*. 22:5976-5985.
- Rendu H (1896). Epistaxis repetees chez un sujet porteur de petits angiomes cutanes et muquez. *Gazette des Hopitaux Civils et Militaires (Paris)* 135:1322-1323.
- Riddick CA, Serio KJ, Hodulik CR, Ring WL, Regan MS, Bigby TD (1999). TGF-beta increases leukotriene C4 synthase expression in the monocyte-like cell line, THP-1. *J Immunol* 162):1101-1107.
- Risau W (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674.
- Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA (2008). Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8:776-787.
- Robbins CS, Swirski FK (2010). The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell Mol Life Sci* 67:2685-2693.
- Rodríguez-García J, Fernández-Santos R, Zarrabeitia-Puente R, García-Erce JA (2015). Vaccination of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Med Clin (Barc)* 144:572-573.
- Rokhlin OW, Cohen MB, Kubagawa H, Letarte M, Cooper MD (1995). Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J Immunol* 154:4456-4465.
- Rossi E, Sanz-Rodriguez F, Eleno N, Düwell A, Blanco FJ, Langa C, Botella LM, Cabañas C, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C (2013). Endothelial endoglin is involved in inflammation: role in leukocyte adhesion and transmigration. *Blood* 121:403-415.
- Ruiz-Contreras J (2003). Inmunodeficiencias primarias. Enfoque y tratamiento iniciales. *An Pediatr Contin* 1:131-138.
- Sabbà C, Pasculli G, Cirulli A, Gallitelli M, Virgilio G, Guastamacchia E, Resta F, Palasciano G (2002). Rendu-Osler-Weber disease: experience with 56 patients. *Ann Ital Med Int.* 17:173-179.
- Sadick H, Hage J, Goessler U, Bran G, Riedel F, Bugert P, Hoermann K (2008). Does the genotype of HHT patients with mutations of the ENG and ACVRL1 gene correlate to different expression of the angiogenic factor VEGF? *Int J Mol Med* 22:575-580.
- Sadick H, Riedel F, Naim R, Goessler U, Hörmann K, Hafner M, Lux A (2005). Patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia have increased plasma levels of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta 1 as well as high ALK1 tissue expression. *Haematologica* 90:818-828.

- Sadick H, Sadick M, Götte K, Naim R, Riedel F, Bran G, Hörmann K (2006). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: an update on clinical manifestations and diagnostic measures. *Wien Klin Wochenschr* 118:72-80.
- Sankar S, Mahooti-Brooks N, Centrella M, McCarthy TL, Madri JA (1995). Expression of transforming growth factor type III receptor in vascular endothelial cells increases their responsiveness to transforming growth factor beta 2. *J Biol Chem* 270:13567-13572.
- Sanz-Rodriguez F, Fernandez-L A, Zarrabeitia R, Perez-Molino A, Ramirez JR, Coto E, Bernabeu C, Botella LM (2004). Mutation analysis in spanish patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia: deficient endoglin up-regulation in activated monocytes. *Clin Chem* 50:2003-2011.
- Seki T, Yun J, Oh SP (2003). Arterial endothelium-specific activin receptor-like kinase 1 expression suggests its role in arterializations and vascular remodeling. *Circ Res* 93:682-689.
- Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG (2005). The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci* 118:771-780.
- Scharpfenecker M, Van Dinther M, Liu Z, Van Bezooijen RL, Zhao Q, Pukac L, Löwik CW, ten Dijke P (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci* 120:964-972.
- She X, Matsuno F, Harada N, Tsai H, Seon BK (2004). Synergy between anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies and TGF- $\beta$  in suppression of growth of human endothelial cells. *Int J Cancer* 108:251-257.
- Sherner O, Meurer SK, Tihaa L, Gressner AM, Weiskirchen R (2007). Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor- $\beta$ 1 and BMP-7 signaling. *J Bio Chem* 282:13934-13943.
- Schliemann C, Bieker R, Thoennissen N, Gerss J, Liersch R, Kessler T, Büchner T, Berdel WE, Mesters RM (2007). Circulating angiopoietin-2 is a strong prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 21:1901-1906.
- Schmierer B, Hill CS (2007). TGF $\beta$ -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:970-982.
- Scholz A, Rehm VA, Rieke S, Derkow K, Schulz P, Neumann K, Koch I, Pascu M, Wiedenmann B, Berg T, Schott E (2007). Angiopoietin-2 serum levels are elevated in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 102: 2471-2478.
- Shah RK, Dhingra JK, Shapshay SM (2002). Hereditary hemorrhagic telangiectasia: a review of 76 cases. *Laryngoscope* 112:767-773.
- Shen F, Degos V, Chu PL, Han Z, Westbrook EM, Choi EJ, Marchuk D, Kim H, Lawton MT, Maze M, Young WL, Su H (2014). Endoglin deficiency impairs stroke recovery. *Stroke* 45:2101-2106.
- Shortman K, Liu YJ (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151-161.
- Shovlin CL (1999). Supermodels and disease: insights from the HHT mice. *J Clin Invest* 104:1335-1336.
- Shovlin CL (2010). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: Pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev* 24:203-219.

- Shovlin CL, Bamford K, Wray D (2008a). Post-NICE 2008: Antibiotic prophylaxis prior to dental procedures for patients with pulmonary arteriovenous malformations (PAVMs) and hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Br Dent J* 205:531-533.
- Shovlin CL, Guttmacher AE, Buscarini E, Faughnan ME, Hyland RH, Westermann CJ, Kjeldsen AD, Plauchu H (2000). Diagnostic criteria for hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber syndrome). *Am J Med Genet* 91:66-67.
- Shovlin CL, Jackson JE, Bamford KB, Jenkins IH, Benjamin AR, Ramadan H, Kulinskaya E (2008b). Primary determinants of ischaemic stroke/brain abscess risks are independent of severity of pulmonary arteriovenous malformations in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Thorax* 63:259-266.
- Shovlin CL, Winstock AR, Peters AM, Jackson JE, Hughes JMB (1995). Medical complications of pregnancy in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Q J Med.* 88:879-887.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, Annunziata N, Doetschman Th (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$ 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699.
- Sicherer SH, Wilkelstein JA (1998). Primary immunodeficiency diseases in adult. *JAMA* 279:58-61.
- Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Blanco FJ, Nieto C, Bragado R, Palomero MI, Bernabéu C, Vega MA, Corbí AL (2011). Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood* 117:5092-5101.
- Sica A, Mantovani A (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122:787-795.
- Silva BM, Hosman AE, Devlin HL, Shovlin CL (2013). Lifestyle and dietary influences on nosebleed severity in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Laryngoscope* 123:1092-1099.
- Siner JM, Bhandari V, Engle KM, Elias JA, Siegel MD (2009). Elevated serum angiopoietin 2 levels are associated with increased mortality in sepsis. *Shock* 31:348-353.
- Sorensen LK, Brooke BS, Li DY, Urness LD (2003). Loss of distinct arterial and venous boundaries in mice lacking endoglin, a vascular-specific TGF $\beta$  coreceptor. *Dev Biol* 261:235-250.
- Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engström U, Wernstedt C, ten Dijke P, Heldin CH (1997). Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 272:28107-28115.
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241:58-62.
- Srinivasan S, Hanes MA, Dickens T, Porteous ME, Oh SP, Hale LP, Marchuck DA (2003). A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. *Hum Mol Genet* 12:473-482.
- St Jacques S, Cymerman U, Pece N, Letarte M (1994). Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factorbeta binding protein of endothelial and stromal cells. *Endocrinology* 134:2645-2657.

- Strasky Z, Vecerova L, Rathouska J, Slanarova M, Brcakova E, Kudlackova Z, Andrys C, Micuda S, Nachtigal P (2011). Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circ J* 75:1747-1755.
- Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakawa M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6062-6067.
- Sunderkotter C, Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172:4410-4417.
- Sutton HG (1864). Epistaxis as an indication of impaired nutrition, and of degeneration of the vascular system. *Medical Mirror* 1:769-781.
- Szekanecz Z, Haines GK, Harlow LA, Shah MR, Fong TW, Fu R, Lin SJ, Rayan G, Koch AE (1995). Increased synovial expression of transforming growth factor (TGF)-beta receptor endoglin and TGF-beta 1 in rheumatoid arthritis: possible interactions in the pathogenesis of the disease. *Clin Immunol Immunopathol* 76:187-194.
- Tabruyn SP, Hansen S, Ojeda-Fernández ML, Bovy N, Zarrabeitia R, Recio-Poveda L, Bernabéu C, Martial JA, Botella LM, Struman I (2013). MiR-205 is downregulated in hereditary hemorrhagic telangiectasia and impairs TGF-beta signaling pathways in endothelial cells. *Angiogenesis* 16:877-887.
- Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12481-12486.
- Takahashi N, Kawanishi-Tabata R, Haba A, Tabata M, Haruta Y, Tsai H, Seon BK (2001). Association of serum endoglin with metastasis in patients with colorectal, breast, and other solid tumors, and suppressive effect of chemotherapy on the serum endoglin. *Clin Cancer Res* 7:524-532.
- Takeuchi M, Alard P, Streilen JW (1998). TGF-beta promotes immune deviation by altering accessory signals of antigen-presenting cells. *J Immunol* 160:1589-1597.
- Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* 23:901-944.
- Ten Dijke P, Arthur HM (2007). Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:857-869.
- Ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E (2008). Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis* 11:89-89.
- Ten Dijke P, Hill CS (2004). New insight into TGF-beta-Smad signaling. *Trends Biochem Sci.* 29:265-273.
- Ten Dijke P, Ichijo H, Franzén P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin CH, Miyazono K (1993). Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 8:2879-2887.
- Ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzén P, Laiho M, Miyazono K, Heldin CH (1994). Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science.* 264:101-104.



- Tenen DG (2003). Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 3:89-101.
- Tian H, Myhre K, Golzio C, Katsanis N, Blobel GC (2012). Endoglin mediates fibronectin/ $\alpha 5\beta 1$  integrin and TGF- $\beta$  pathway crosstalk in endothelial cells. *EMBO J* 31:3885-3900.
- Torsney E, Charlton R, Diamond AG, Burn J, Soames JV, Arthur HM (2003). Mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia has a generalized vascular abnormality. *Circulation* 107:1653-1657.
- Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL (2000). Development of CD8 $\alpha$ -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290:2152-2154.
- Travis MA, Sheppard D (2014). TGF- $\beta$  activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol* 32:51-82.
- Tridandapani S, Wardrop R, Baran CP, Wang Y, Opalek JM, Caligiuri MA, Marsh CB (2003). TGF-beta 1 suppresses myeloid Fc gamma receptor function by regulating the expression and function of the common gamma-subunit. *J Immunol* 170:4572-4577.
- Tsunawaki S, Sporn M, Ding A, Nathan C (1988). Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 334:260-262.
- Tual-Chalot S, Mahmoud M, Allinson KR, Redgrave RE, Zhai Z, Oh SP, Fruttiger M, Arthur HM (2014). Endothelial depletion of Acvrl1 in mice leads to arteriovenous malformations associated with reduced endoglin expression. *PLoS One* 9:e98646.
- Tual-Chalot S, Oh SP, Arthur HM (2015). Mouse models of hereditary hemorrhagic telangiectasia: recent advances and future challenges. *Front Genet* 6:25.
- Turner M, Chantry D, Feldmann M (1990). Transforming growth factor beta induces the production of interleukin 6 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 2:211-216.
- Unanue ER, Allen PM (1987). The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*. 236:551-557.
- Urness LD, Sorensen LK, Li DY (2000). Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet* 26:328-331.
- Valbuena-Diez AC, Blanco FJ, Ojuo B, Langa C, Gonzalez-Nuñez M, Llano E, Pendas AM, Díaz M, Castrillo A, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C (2012). Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation* 126:2612-2624.
- van de Kerkhof PC, Rulo HF, van Pelt JP, van Vlijmen-Willems IM, De Jong EM (1998). Expression of endoglin in the transition between psoriatic uninvolved and involved skin. *Acta Derm Venereol* 78:10-21.
- Van Laake LW, van den Driesche S, Post S, Feijen A, Jansen MA, Driessens MH, Mager JJ, Snijder RJ, Westermann CJ, Doevendans PA, van Echteld CJ, ten Dijke P, Arthur HM, Goumans MJ, Lebrin F, Mummery CL (2006). Endoglin has a crucial role in blood cell-mediated vascular repair. *Circulation* 114:2288-2297.
- Vázquez C, Santana A, Recio L, Bernabeu C, Botella LM (2013). Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia in Las Palmas (Canary Islands) Spain. *Hematology Reports* 5:51.

- Velasco S, Alvarez-Muñoz P, Pericacho M, Dijke PT, Bernabéu C, López-Novoa JM, Rodríguez-Barbero A (2008). L- and S-endoglin differentially modulate TGFbeta1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *J Cell Sci* 121:913-919.
- Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 12:642-649.
- Verschoor CP, Puchta A, Bowdish DM (2012). The Macrophage. *Methods Mol Biol* 844:139-156.
- Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie QW, Nathan C (1993). Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 178:605-613.
- Walshe TE, Dole VS, Maharaj AS, Patten IS, Wagner DD, D'Amore PA (2009). Inhibition of VEGF or TGF- $\beta$  signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1185-1192.
- Wahl SM, Allen JB, Weeks BS, Wong HL, Klotman PE (1993). Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:4577-4581.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB (1987). Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5788-5792.
- Wang C, Yu X, Cao Q, Wang Y, Zheng G, Tan TK, Zhao H, Zhao Y, Wang Y, Harris DCh (2013). Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunol* 14:6.
- Weber F (1907). Multiple hereditary developmental angiomas (telangiectases) of the skin and mucous membranes associated with recurring haemorrhages. *Lancet* ii:160-162.
- Werner F, Jain MK, Feinberg MW, Sibinga NE, Pellacani A, Wiesel P, Chin MT, Topper JN, Perrella MA, Lee ME (2000). Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem* 275:36653-36658.
- White RI Jr, Pollack JS (1994). Pulmonary arteriovenous malformations: diagnosis with three-dimensional helical CT- a breakthrough without contrast media. *Radiology* 191:613-614.
- Wieser R, Wrana JL, Massagué J (1995). GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J* 14:2199-2208.
- Willemsse RB, Mager JJ, Westermann CJ, Overtom TTC, Mauser H, Wolbers JG (2000). Bleeding risk of cerebrovascular malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Neurosurg* 92:779-784.
- Wiseman DM, Polverini PJ, KampDW, Leibovich SJ (1988). Transforming growth factor- $\beta$  (TGF $\beta$ ) is chemotactic for human monocytes and induces their expression of angiogenic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 157:793-800.
- Witsell AL, Schook LB (1991). Macrophage heterogeneity occurs through a developmental mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1963-1967.

- Wooderchak-Donahue WL, McDonald J, O'Fallon B, Upton PD, Li W, Roman BL, Young S, Plant P, Fülöp GT, Langa C, Morrell NW, Botella LM, Bernabeu C, Stevenson DA, Runo JR, Bayrak-Toydemir P (2013). BMP9 mutations cause a vascular-anomaly syndrome with phenotypic overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet* 93:530-537.
- Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J (1994). Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature* 370:341-347.
- Yamashita H, Ichijo H, Grimsby S, Morén A, ten Dijke P, Miyazono K (1994). Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 269:1995-2001.
- Yanavitski M, Givertz MM (2011). Novel biomarkers in acute heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 8:206-211.
- Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, Strauss-Ayali D, Viukov S, Guillems M, Misharin A, Hume DA, Perlman H, Malissen B, Zelzer E, Jung S (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* 38:79-91.
- Zhang Y, Feng X, We R, Derynck R (1996). Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature* 383:168-172.
- Zhang Q, Kandic I, Faughnan ME, Kutryk MJ (2013). Elevated circulating microRNA-210 levels in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia and pulmonary arteriovenous malformations: a potential new biomarker. *Biomarkers* 18:23-29.

**ANEXOS**



*El trabajo realizado durante la presente Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones:*

1. **Ojeda-Fernandez L**, Barrios L, Rodríguez-Barbero A, Recio-Poveda L, Bernabeu C, Botella LM (2010). Reduced plasma levels of Ang-2 and sEng as novel biomarkers in hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT). *Clin Chim Acta* 411:494-499.
2. **Ojeda-Fernández L**, Recio-Poveda L, Aristorena M, Lastres P, Blanco FJ, Sanz-Rodríguez F, Gallardo-Vara E, de las Casas-Engel M, Arthur H, Bernabeu C, Botella LM. Endoglin deletion in myeloid lineage confers immunodeficiency in mice. *PLoS Genetics*. **En revisión.**

*Durante la realización de la presente Tesis Doctoral se ha colaborado en las siguientes publicaciones:*

1. Zarrabeitia R, **Ojeda-Fernandez L**, Recio L, Bernabéu C, Albiñana V, Parra JA, Botella LM. Bazedoxifene, a new orphan drug for the treatment of bleeding in Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia (HHT). *Thrombosis and Haemostasis*. **En revisión.**
2. Botella LM, Albiñana V, **Ojeda-Fernandez L**, Recio-Poveda L, Bernabéu C (2015). Research on potential biomarkers in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet* 6:115.
3. Blanco FJ, **Ojeda-Fernandez L**, Aristorena M, Gallardo-Vara E, Benguria A, Dopazo A, Langa C, Botella LM, BernabeuC (2015). Genome-wide transcriptional and functional analysis of endoglin isoforms in the human promonocytic cell line U937. *J Cell Physiol* 230:947-958.
4. Aristorena M, Blanco FJ, de Las Casas-Engel M, **Ojeda-Fernandez L**, Gallardo-Vara E, Corbi A, Botella LM, Bernabeu C (2014). Expression of endoglin isoforms in the myeloid lineage and their role during aging and macrophage polarization. *J Cell Sci* 127:2723-2735
5. Tabruyn SP, Hansen S, **Ojeda-Fernández ML**, Bovy N, Zarrabeitia R, Recio-Poveda L, Bernabéu C, Martial JA, Botella LM, Struman I (2013). MiR-205 is downregulated in hereditary hemorrhagic telangiectasia and impairs TGF-beta signaling pathways in endothelial cells. *Angiogenesis* 16:877-887.
6. Fontalba A, Fernández-Luna JL, Zarrabeitia R, Recio-Poveda L, Albiñana V, **Ojeda-Fernández ML**, Bernabéu C, Alcaraz LA, Botella LM (2013). Copy number variations in endoglin locus: mapping of large deletions in Spanish families with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *BMC Med Genet* 14:121.



## TABLAS SUPLEMENTARIAS

**Tabla 1. Pacientes incluidos en el análisis de los niveles de sEng y Ang-2; mutación identificada y sintomatología clínica.** Un total de 62 pacientes HHT fueron incluidos en el análisis de los niveles en plasma de sEng y Ang-2. Treinta y dos de ellos fueron diagnosticados genéticamente como HHT1 al ser portadores de una mutación en *ENG*; los 30 pacientes restantes presentan una mutación en *ALK1* y por tanto son HHT2. E: epistaxis, T: telangiectasia, P: MAV pulmonar, H: MAV hepática, C: MAV cerebral, ABS; absceso cerebral, RAE: embolización arterial en retina, AF: fístula aórtica: GB: sangrados gastrointestinales.

| Código    | HHT tipo | Gen         | Locus     | Mutación        | Tipo de mutación | Síntomas clínicos |
|-----------|----------|-------------|-----------|-----------------|------------------|-------------------|
| 07.01.04  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 7    | c.967_968del GT | Delección        | E, T              |
| 07.05.09  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 7    | c.967_968del GT | Delección        | E, T, P           |
| 11.01.04  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 4    | c.392C>T        | Cambio AA        | E, T              |
| 11.02.04  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 4    | c.392C>T        | Cambio AA        | E, T              |
| 11.03.04  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 4    | c.392C>T        | Cambio AA        |                   |
| 15.01.14  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 6    | c.772delT       | Delección        | E, T              |
| 15.02.09  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 6    | c.772delT       | Delección        | E, T, P           |
| 15.03.09  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 6    | c.772delT       | Delección        | E, T, P           |
| 30.01.05  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 5    | c.646A>G        | Cambio AA        | E, T, P, H, ABS   |
| 30.02.05  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 5    | c.646A>G        | Cambio AA        | E, T, P, H, ABS   |
| 31.01.05  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Intrón 11 | c.1686+5 G>C    | <i>Splicing</i>  | E, T, P, H        |
| 31.02.09  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Intrón 11 | c.1686+5 G>C    | <i>Splicing</i>  | E, T, P, H        |
| 42.01.05  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 6    | c.812T>A        | Cambio AA        | E, T              |
| 45.01.06  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 10   | c.1365C>A       | Sin sentido      | E, T, P, H        |
| 45.02.06  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 10   | c.1365C>A       | Sin sentido      | E, T, P, H        |
| 45.03.06  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 10   | c.1365C>A       | Sin sentido      | E, T, P, H        |
| 45.04.07  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 10   | c.1365C>A       | Sin sentido      | E, T, P, C        |
| 45.05.07  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 10   | c.1365C>A       | Sin sentido      | E, T, P, H        |
| 45.10.07  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 10   | c.1365C>A       | Sin sentido      | E, T              |
| 45.12.06  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 10   | c.1365C>A       | Sin sentido      | E, T, H           |
| 49.02.07  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 6    | c.771dupC       | Sin sentido      | E, T              |
| 61.01.06  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 9a   | c.1167C>T       | Cambio AA        | E, T              |
| 65.01.06  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Intrón 11 | c.1689A>G       | <i>Splicing</i>  | E, T, H           |
| 65.02.06  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Intrón 11 | c.1689A>G       | <i>Splicing</i>  | E, T, P, H        |
| 67.01.06  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 9b   | c.1311C>G       | Cambio AA        | E, T, P           |
| 96.01.07  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 4    | c.494C>T        | Cambio AA        | E, T, P, H        |
| 96.02.08  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 4    | c.494C>T        | Cambio AA        | E, T, P, H        |
| 96.04.09  | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 4    | c.494C>T        | Cambio AA        | E, T, P, H        |
| 106.01.08 | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 7    | c.887del C      | Delección        | E, T, P, ABS      |
| AVM*      | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 2    | c.145G>T        | Cambio AA        | E, T, P, C        |
| MAMG*     | HHT1     | <i>ENG</i>  | Intrón 1  | c.68-2A>T       | <i>Splicing</i>  | E, T, P, RAE      |
| HC*       | HHT1     | <i>ENG</i>  | Exón 2    | c.207G>A        | Cambio AA        | E, T, P           |
| 02.03.03  | HHT2     | <i>ALK1</i> | Exón 8    | c.1120C>T       | Cambio AA        | E, T, P, H        |
| 02.09.04  | HHT2     | <i>ALK1</i> | Exón 8    | c.1120C>T       | Cambio AA        | E, T              |
| 02.20.05  | HHT2     | <i>ALK1</i> | Exón 8    | c.1120C>T       | Cambio AA        | E, T              |
| 26.02.04  | HHT2     | <i>ALK1</i> | Exón 3    | c.140G>C        | Cambio AA        | E, T              |
| 36.01.05  | HHT2     | <i>ALK1</i> | Exón 10   | c.1450C>T       | Cambio AA        | E, T              |
| 36.02.05  | HHT2     | <i>ALK1</i> | Exón 10   | c.1450C>T       | Cambio AA        | E, T, AF          |
| 38.01.05  | HHT2     | <i>ALK1</i> | Exón 9    | c.1261T>G       | Cambio AA        | E, T              |



## Biomarcadores plasmáticos y alteraciones de la respuesta inmunitaria en HHT

|           |      |      |          |                     |                 |             |
|-----------|------|------|----------|---------------------|-----------------|-------------|
| 38.03.07  | HHT2 | ALK1 | Exón 9   | c.1261T>G           | Cambio AA       | E, T        |
| 44.03.06  | HHT2 | ALK1 | Exón 8   | c.1205G>A           | Cambio AA       | T, P        |
| 44.04.06  | HHT2 | ALK1 | Exón 8   | c.1205G>A           | Cambio AA       | E, T, H, GB |
| 44.07.07  | HHT2 | ALK1 | Exón 8   | c.1205G>A           | Cambio AA       | E, T        |
| 44.10.07  | HHT2 | ALK1 | Exón 8   | c.1205G>A           | Cambio AA       | E           |
| 46.01.06  | HHT2 | ALK1 | Exón 8   | c.1232G>A           | Cambio AA       | E, T, P, H  |
| 46.02.06  | HHT2 | ALK1 | Exón 8   | c.1232G>A           | Cambio AA       | E, T        |
| 56.01.06  | HHT2 | ALK1 | Exón 7   | c.921_927dupATGCGGC | Duplicación     | E, T, H     |
| 56.02.06  | HHT2 | ALK1 | Exón 7   | c.921_927dupATGCGGC | Duplicación     | E, T, H     |
| 57.01.06  | HHT2 | ALK1 | Exón 8   | c.1135G>A           | Cambio AA       | E, T, H     |
| 62.01.06  | HHT2 | ALK1 | Intrón 9 | c.1378-1G>T         | Cambio AA       | E, T, H, GB |
| 69.01.06  | HHT2 | ALK1 | Exón 6   | c.673_674del AG     | Delección       | E, T, H     |
| 74.01.06  | HHT2 | ALK1 | Exón 3   | c.144-145ins G      | Inserción       | E, T, H     |
| 77.01.06  | HHT2 | ALK1 | Exón 10  | c.1436G>A           | Cambio AA       | E, T        |
| 77.02.06  | HHT2 | ALK1 | Exón 10  | c.1436G>A           | Cambio AA       | E, T        |
| 77.03.06  | HHT2 | ALK1 | Exón 10  | c.1436G>A           | Cambio AA       | E, T        |
| 87.01.07  | HHT2 | ALK1 | Intrón 4 | c.525+1G>A          | <i>Splicing</i> | E, T, P, GB |
| 92.01.07  | HHT2 | ALK1 | Exón 7   | c.1025T>C           | Cambio AA       | E, T, P     |
| 97.01.06  | HHT2 | ALK1 | Exón 7   | c.988G>T            | Cambio AA       | E, T, H     |
| 97.02.07  | HHT2 | ALK1 | Exón 7   | c.988G>T            | Cambio AA       | E, T        |
| 103.01.06 | HHT2 | ALK1 | Exón 7   | c.1030T>C           | Cambio AA       | E, T        |
| 105.01.08 | HHT2 | ALK1 | Exón 7   | c.889del C          | Delección       | E, T, P, H  |
| 109.01.08 | HHT2 | ALK1 | Exón 10  | c.1415G>T           | Sin sentido     | E, T, H     |

\* Pendientes de asignación de código identificativo

**Tabla 2. Listado de genes inducidos en macrófagos de pacientes HHT.** Los genes están clasificados por orden alfabético. Un total de 27 genes se consideraron inducidos en los MNCs de pacientes HHT en comparación con las muestras de donantes sanos. Los criterios de selección fueron un valor  $p < 0,01$  y una *ratio*  $> 1,5$ . (ID=Identidad)

| Símbolo Gen          | Descripción del Gen                                                          | ID Pública | Ratio | ID sonda Affymetrix |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------|------------|-------|---------------------|
| <i>A2M</i>           | alpha-2-macroglobulin                                                        | NM_000014  | 1,71  | 217757_at           |
| <i>ACE</i>           | angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1                   | AW057540   | 1,64  | 227463_at           |
| <i>ADORA2B</i>       | adenosine A2b receptor                                                       | NM_000676  | 1,89  | 205891_at           |
| <i>APOC1</i>         | apolipoprotein C-I                                                           | NM_001645  | 1,89  | 204416_x_at         |
| <i>APOC1</i>         | apolipoprotein C-I                                                           | W79394     | 1,65  | 213553_x_at         |
| <i>APOE</i>          | apolipoprotein E                                                             | NM_000041  | 2,10  | 203382_s_at         |
| <i>ATXN7</i>         | ataxin 7                                                                     | AF032105   | 1,58  | 209964_s_at         |
| <i>DHRS9</i>         | dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9                                | AF240697   | 2,47  | 224009_x_at         |
| <i>DHRS9</i>         | dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9                                | AF240698   | 2,28  | 223952_x_at         |
| <i>DHRS9</i>         | dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9                                | NM_005771  | 2,18  | 219799_s_at         |
| <i>EGR2</i>          | early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)                        | NM_000399  | 1,83  | 205249_at           |
| <i>FBP1</i>          | fructose-1,6-bisphosphatase 1                                                | D26054     | 2,27  | 209696_at           |
| <i>FLJ38717</i>      | FLJ38717 protein                                                             | AK096036   | 1,68  | 1559964_at          |
| <i>HBA1</i>          | hemoglobin, alpha 1                                                          | BC005931   | 3,67  | 211745_x_at         |
| <i>HBA1 /// HBA2</i> | hemoglobin, alpha 1 /// hemoglobin, alpha 2                                  | AF349571   | 3,85  | 211699_x_at         |
| <i>HBA1 /// HBA2</i> | hemoglobin, alpha 1 /// hemoglobin, alpha 2                                  | AF105974   | 3,83  | 209458_x_at         |
| <i>HBA1 /// HBA2</i> | hemoglobin, alpha 1 /// hemoglobin, alpha 2                                  | V00489     | 3,80  | 217414_x_at         |
| <i>HBA1 /// HBA2</i> | hemoglobin, alpha 1 /// hemoglobin, alpha 2                                  | NM_000558  | 3,73  | 204018_x_at         |
| <i>HBA2</i>          | hemoglobin, alpha 2                                                          | T50399     | 3,18  | 214414_x_at         |
| <i>HBB</i>           | hemoglobin, beta                                                             | M25079     | 3,71  | 209116_x_at         |
| <i>HBB</i>           | hemoglobin, beta                                                             | AF059180   | 3,65  | 217232_x_at         |
| <i>HBB</i>           | hemoglobin, beta                                                             | AF349114   | 3,42  | 211696_x_at         |
| <i>HGF</i>           | hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)                     | M77227     | 1,59  | 210997_at           |
| <i>HSD3B7</i>        | hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7 | BC004929   | 1,82  | 222817_at           |
| <i>IRS2</i>          | insulin receptor substrate 2                                                 | BF700086   | 1,55  | 209184_s_at         |
| <i>KLF4</i>          | Kruppel-like factor 4 (gut)                                                  | BF514079   | 1,87  | 221841_s_at         |
| <i>KLF4</i>          | Kruppel-like factor 4 (gut)                                                  | NM_004235  | 1,60  | 220266_s_at         |
| <i>LSP1</i>          | lymphocyte-specific protein 1                                                | NM_002339  | 1,52  | 203523_at           |
| <i>PRAM1</i>         | PML-RARA regulated adaptor molecule 1                                        | AW027174   | 1,90  | 241742_at           |

## Biomarcadores plasmáticos y alteraciones de la respuesta inmunitaria en HHT

|                |                                                              |           |      |             |
|----------------|--------------------------------------------------------------|-----------|------|-------------|
| <i>RPL10</i>   | ribosomal protein L10                                        | AW057781  | 1,60 | 221989_at   |
| <i>SDS</i>     | serine dehidratase                                           | NM_006843 | 1,90 | 205695_at   |
| <i>SLC29A3</i> | solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 3 | NM_018344 | 1,52 | 219344_at   |
| <i>TMEM158</i> | transmembrane protein 158                                    | BF062629  | 1,56 | 213338_at   |
| <i>TNS1</i>    | tensin 1                                                     | AL046979  | 2,54 | 221748_s_at |
| <i>TREM2</i>   | triggering receptor expressed on myeloid cells 2             | NM_018965 | 2,48 | 219725_at   |
| <i>WIPF1</i>   | WAS/WASL interacting protein family, member 1                | BF446719  | 1,59 | 231182_at   |
| <i>ZFP36L2</i> | zinc finger protein 36, C3H type-like 2                      | NM_006887 | 1,58 | 201369_s_at |

**Tabla 3. Listado de genes reprimidos en PBMCs de pacientes HHT.** Los genes están clasificados por orden alfabético. Un total de 184 genes se consideraron inducidos en los PBMCs de pacientes HHT en comparación con las muestras de donantes sanos. Los criterios de selección fueron un valor  $p < 0,01$  y una *ratio*  $> 1,5$ . (ID=Identidad)

| Símbolo Gen              | Descripción del Gen                                                                                                                         | ID Público | Ratio | ID sonda    |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------|-------------|
| <i>LOC28562</i>          | MIR146A host gene Homo sapiens (human).                                                                                                     | AL389942   | -3,27 | 232504_at   |
| ---                      | Transcribed locus                                                                                                                           | BF111326   | -2,69 | 231513_at   |
| <i>IRAK3</i>             | CDNA FLJ13601 fis, clone PLACE1010069                                                                                                       | AL049435   | -2,39 | 213817_at   |
| <i>UTP23</i>             | Full-length cDNA clone CSODI039YF 12 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens (human)                                                  | BE542779   | -2,08 | 238562_at   |
| <i>DERP12</i>            | ---                                                                                                                                         | AB014766   | -2,00 | 1555623_at  |
| ---                      | Transcribed locus                                                                                                                           | BG250585   | -1,84 | 235740_at   |
| ---                      | ---                                                                                                                                         | AL521129   | -1,80 | 227559_at   |
| <i>NDUFA4</i>            | NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 4                                                                                |            |       |             |
| <i>CBLL1 (RNF188)</i>    | Cbl proto-oncogene-like 1, E3 ubiquitin protein ligase                                                                                      | AI824009   | -1,72 | 227187_at   |
| ---                      | Full-length cDNA clone CSODK002YF13 of HeLa cells Cot 25-normalized of Homo sapiens (human)                                                 | AV755522   | -1,58 | 213294_at   |
| ---                      | Transcribed locus                                                                                                                           | H78083     | -1,58 | 240131_at   |
| <i>ACSL1</i>             | acyl-CoA synthetase long-chain family member 1                                                                                              | NM_021122  | -1,56 | 201963_at   |
| <i>ACSL4</i>             | acyl-CoA synthetase long-chain family member 4                                                                                              | NM_022977  | -1,90 | 202422_s_at |
| <i>ADA</i>               | adenosine deaminase                                                                                                                         | X02189     | -2,65 | 216705_s_at |
| <i>ADA</i>               | adenosine deaminase                                                                                                                         | NM_000022  | -2,53 | 204639_at   |
| <i>AHR</i>               | aryl hydrocarbon receptor                                                                                                                   | NM_001621  | -1,76 | 202820_at   |
| <i>BIC MIR155HG</i>      | BIC transcript MIR155 host gene (Homo sapiens)                                                                                              | BG231961   | -1,57 | 229437_at   |
| <i>BIRC3</i>             | baculoviral IAP repeat-containing 3                                                                                                         | U37546     | -1,64 | 210538_s_at |
| <i>C13orf31 LACC1</i>    | chromosome 13 open reading frame 31 laccase (multicopper oxidoreductase) domain containing 1                                                | BC035749   | -2,30 | 1553141_at  |
| <i>C13orf31</i>          | chromosome 13 open Redding frame 31                                                                                                         | NM_153218  | -2,13 | 1553142_at  |
| <i>C15orf48</i>          | chromosome 15 open reading frame 48                                                                                                         | AF228422   | -2,27 | 223484_at   |
| <i>C5orf20 /// TIFAB</i> | chromosome 5 open reading frame 20 /// TIFA-related protein TIFAB TRAF-interacting protein with forkhead-associated domain, family member B | AI554057   | -1,67 | 236673_at   |
| <i>C5orf29 GAPT</i>      | chromosome 5 open reading frame 29 GRB2-binding adaptor protein, transmembrane                                                              | NM_152687  | -1,91 | 1552386_at  |

## Biomarcadores plasmáticos y alteraciones de la respuesta inmunitaria en HHT

|                     |                                                                                                   |           |       |             |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------|-------------|
| <i>CCL20//MIP3A</i> | chemokine (C-C motif) ligand 20                                                                   | NM_004591 | -3,34 | 205476_at   |
| <i>CCL8</i>         | chemokine (C-C motif) ligand 8                                                                    | AI984980  | -2,09 | 214038_at   |
| <i>CD38</i>         | CD38 molecule<br>It is used as a prognostic marker for patients with chronic lymphocytic leukemia | NM_001775 | -2,32 | 205692_s_at |
| <i>CD80</i>         | CD80 molecule                                                                                     | BC042665  | -2,95 | 1554519_at  |
| <i>CDC37L1</i>      | cell division cycle 37-like 1                                                                     | BF510563  | -2,05 | 228561_at   |
| <i>CEP76</i>        | centrosomal protein 76kDa                                                                         | AW002970  | -1,65 | 52285_f_at  |
| <i>CFB</i>          | complement factor B                                                                               | NM_001710 | -1,54 | 202357_s_at |
| <i>CH25H</i>        | cholesterol 25-hydroxylase                                                                        | NM_003956 | -4,17 | 206932_at   |
| <i>CHAC2</i>        | ChaC, cation transport regulator homolog 2 (E. coli)                                              | AI191897  | -1,58 | 235117_at   |
| <i>CKS2</i>         | CDC28 protein kinase regulatory subunit 2                                                         | NM_001827 | -1,53 | 204170_s_at |
| <i>CLEC4E</i>       | C-type lectin domain family 4, member E                                                           | NM_014358 | -2,56 | 219859_at   |
| <i>CLEC4E</i>       | C-type lectin domain family 4, member E                                                           | BC000715  | -2,07 | 222934_s_at |
| <i>CLIC2</i>        | chloride intracellular channel 2                                                                  | AI768628  | -1,54 | 213415_at   |
| <i>CRIM1</i>        | Cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)                                        | AW243081  | -2,01 | 228496_s_at |
| <i>CRIM1</i>        | cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)                                        | BG546884  | -1,82 | 202551_s_at |
| <i>CXCL1</i>        | chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)                    | NM_001511 | -2,42 | 204470_at   |
| <i>CXCL5</i>        | chemokine (C-X-C motif) ligand 5                                                                  | AK026546  | -1,86 | 214974_x_at |
| <i>DDEF2</i>        | development and differentiation enhancing factor 2                                                | NM_003887 | -2,54 | 206414_s_at |
| <i>DDX58</i>        | DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58                                                         | NM_014314 | -1,80 | 218943_s_at |
| <i>DENND4A</i>      | DENN/MADD domain containing 4A                                                                    | BE268538  | -1,72 | 214787_at   |
| <i>DNAJB4</i>       | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4                                                       | BG252490  | -1,68 | 203810_at   |
| <i>DOCK4</i>        | dedicator of cytokinesis 4                                                                        | NM_014705 | -1,74 | 205003_at   |
| <i>EBI3</i>         | Epstein-Barr virus induced gene 3                                                                 | NM_005755 | -1,65 | 219424_at   |
| <i>EMR1</i>         | egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1                                   | NM_001974 | -2,46 | 207111_at   |
| <i>ENPP2</i>        | ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)                                    | L35594    | -2,74 | 209392_at   |
| <i>ENPP2</i>        | ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)                                    | D45421    | -2,39 | 210839_s_at |
| <i>EPB41L3</i>      | erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3                                                      | NM_012307 | -1,58 | 206710_s_at |
| <i>ESF1</i>         | ESF1, nucleolar pre-rRNA processing protein, homolog (S. cerevisiae)                              | AL161659  | -1,76 | 222765_x_at |
| <i>ETV5</i>         | ets variant gene 5 (ets-related molecule)                                                         | NM_004454 | -2,80 | 203349_s_at |
| <i>ETV5</i>         | Ets variant gene 5 (ets-related molecule)                                                         | AW206458  | -1,79 | 230102_at   |
| <i>ETV5</i>         | ets variant gene 5 (ets-related molecule)                                                         | BF060791  | -1,62 | 203348_s_at |

|                                    |                                                                          |           |       |              |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|-------|--------------|
| <i>FAM126B</i>                     | family with sequence similarity 126, member B                            | BC039295  | -1,55 | 1554178_a_at |
| <i>FANCF</i>                       | Fanconi anemia, complementation group F                                  | NM_022725 | -1,65 | 218689_at    |
| <i>FAS</i>                         | Fas (TNF receptor superfamily, member 6)                                 | X83493    | -1,88 | 215719_x_at  |
| <i>FAS</i>                         | Fas (TNF receptor superfamily, member 6)                                 | Z70519    | -1,83 | 216252_x_at  |
| <i>FCAR</i>                        | Fc fragment of IgA receptor                                              | NM_002000 | -2,20 | 207674_at    |
| <i>FEM1C</i>                       | fem-1 homolog c (C. elegans)                                             | AI862658  | -1,68 | 213341_at    |
| <i>FEZ1</i>                        | fasciculation and elongation proteína zeta 1 (zygin I)                   | NM_005103 | -2,10 | 203562_at    |
| <i>FFAR2</i>                       | free fatty acid receptor 2                                               | NM_005306 | -1,81 | 221345_at    |
| <i>FLJ13611</i><br><i>TRAPPC13</i> | hypothetical protein FLJ13611<br>trafficking protein particle complex 13 | NM_024941 | -1,73 | 218674_at    |
| <i>FLJ13611</i><br><i>TRAPPC13</i> | hypothetical protein FLJ13611<br>trafficking protein particle complex 13 | BE222610  | -1,66 | 236526_x_at  |
| <i>FLJ20035</i>                    | hypothetical protein FLJ20035                                            | NM_017631 | -2,10 | 218986_s_at  |
| <i>FNDC3B</i>                      | fibronectin type III domain containing 3B                                | BF444916  | -2,12 | 222693_at    |
| <i>FPRL1</i>                       | formyl peptide receptor-like 1                                           | M88107    | -1,69 | 210772_at    |
| <i>G0S2</i>                        | G0/G1switch 2                                                            | NM_015714 | -1,51 | 213524_s_at  |
| <i>GBP1</i>                        | guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa                 | AW014593  | -2,12 | 231577_s_at  |
| <i>GBP1</i>                        | guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa                 | BC002666  | -1,77 | 202269_x_at  |
| <i>GBP3</i>                        | guanylate binding protein 3                                              | AL136680  | -1,61 | 223434_at    |
| <i>GBP4</i>                        | guanylate binding protein 4                                              | AW392952  | -2,03 | 235574_at    |
| <i>GCH1</i>                        | GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia)                          | NM_000161 | -1,91 | 204224_s_at  |
| <i>GJA3</i>                        | gap junction protein, alpha 3, 46kDa                                     | BF726530  | -3,37 | 239572_at    |
| <i>GJB2</i>                        | gap junction protein, beta 2, 26kDa                                      | M86849    | -4,11 | 223278_at    |
| <i>GPR84</i>                       | G protein-coupled receptor 84                                            | AF237762  | -2,02 | 223767_at    |
| <i>HDGFRP3</i>                     | hepatoma-derived growth factor, related protein 3                        | AB029156  | -1,88 | 209526_s_at  |
| <i>HDGFRP3</i>                     | hepatoma-derived growth factor, related protein 3                        | AL133102  | -1,63 | 216693_x_at  |
| <i>HDGFRP3</i>                     | hepatoma-derived growth factor, related protein 3                        | AK001280  | -1,60 | 209524_at    |
| <i>HERC5</i>                       | hect domain and RLD 5                                                    | NM_016323 | -1,55 | 219863_at    |
| <i>HNMT</i>                        | histamine N-methyltransferase                                            | AU157303  | -1,71 | 228772_at    |
| <i>IFI44</i>                       | interferon-induced protein 44                                            | NM_006417 | -2,01 | 214453_s_at  |
| <i>IFI44L</i>                      | interferon-induced protein 44-like                                       | NM_006820 | -2,78 | 204439_at    |
| <i>IFIH1</i>                       | interferon induced with helicase C domain 1                              | NM_022168 | -1,65 | 219209_at    |
| <i>IFIT1</i>                       | interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1              | NM_001548 | -2,91 | 203153_at    |
| <i>IFIT5</i>                       | interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5              | N47725    | -1,77 | 203595_s_at  |
| <i>IFRD1</i>                       | interferon-related developmental regulator 1                             | AA747426  | -1,62 | 202146_at    |
| <i>IL12B</i>                       | interleukin 12B (natural killer cell stimulatory factor 2, cytotoxic     | NM_002187 | -2,00 | 207901_at    |

## Biomarcadores plasmáticos y alteraciones de la respuesta inmunitaria en HHT

|                            |                                                                                                                                 |           |       |             |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------|-------------|
|                            | lymphocyte maturation factor 2, p40)                                                                                            |           |       |             |
| <i>IL1B</i>                | interleukin 1, beta                                                                                                             | M15330    | -1,66 | 39402_at    |
| <i>IL6</i>                 | interleukin 6 (interferon, beta 2)                                                                                              | NM_000600 | -2,92 | 205207_at   |
| <i>IL7</i>                 | interleukin 7                                                                                                                   | NM_000880 | -1,55 | 206693_at   |
| <i>INDO</i>                | indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase                                                                                             | M34455    | -4,53 | 210029_at   |
| <i>IRAK2</i>               | interleukin-1 receptor-associated kinase 2                                                                                      | AI246590  | -1,59 | 231779_at   |
| <i>IRAK3</i>               | interleukin-1 receptor-associated kinase 3                                                                                      | NM_007199 | -2,03 | 220034_at   |
| <i>ISG15</i>               | ISG15 ubiquitin-like modifier                                                                                                   | NM_005101 | -1,84 | 205483_s_at |
| <i>ITGB8</i>               | integrin, beta 8                                                                                                                | BF513121  | -3,52 | 226189_at   |
| <i>ITPR2</i>               | inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2                                                                                    | AA834576  | -1,61 | 202660_at   |
| <i>KCNJ10</i>              | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 10                                                                   | AW071744  | -1,81 | 228581_at   |
| <i>KCNJ2</i>               | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2                                                                    | AF153820  | -2,82 | 206765_at   |
| <i>KIAA1712</i>            | KIAA1712                                                                                                                        | AI633734  | -1,52 | 228334_x_at |
| <i>KLHL28</i>              | kelch-like 28 (Drosophila)                                                                                                      | AI982758  | -1,89 | 228328_at   |
| <i>KMO</i>                 | kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)                                                                           | BC005297  | -2,53 | 211138_s_at |
| <i>KMO</i>                 | kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)                                                                           | AI074145  | -2,51 | 205306_x_at |
| <i>KMO</i>                 | kynurenine 3-monooxygenase (kynurenine 3-hydroxylase)                                                                           | NM_003679 | -1,76 | 205307_s_at |
| <i>KYNU</i>                | kynureninase (L-kynurenine hydrolase)                                                                                           | BC000879  | -1,53 | 210663_s_at |
| <i>LAMP3</i>               | lysosomal-associated membrane protein 3                                                                                         | NM_014398 | -1,73 | 205569_at   |
| <i>LARP4</i>               | La ribonucleoprotein domain family, member 4                                                                                    | AI743740  | -1,68 | 214155_s_at |
| <i>LILRA1</i>              | leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 1                                                  | AF025529  | -1,69 | 210660_at   |
| <i>LILRA3</i>              | leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (without TM domain), member 3                                               | NM_006865 | -1,95 | 206881_s_at |
| <i>LILRB1</i>              | Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 1                                        | AI681260  | -1,90 | 229937_x_at |
| <i>LILRB2</i>              | leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2                                        | AF004231  | -1,79 | 210146_x_at |
| <i>LINCR/// NEURL3</i>     | likely ortholog of mouse lung-inducible Neutralized-related C3HC4 RING domain protein neutralized E3 ubiquitin protein ligase 3 | AL389981  | -1,94 | 232593_at   |
| <i>LOC129607 CMPK2</i>     | hypothetical protein LOC129607 Cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial                                         | AI742057  | -2,07 | 226702_at   |
| <i>LOC440934</i>           | Hypothetical gene supported by BC008048                                                                                         | AA031832  | -1,90 | 238727_at   |
| <i>LOC641912 LOC644090</i> | hypothetical protein LOC641912 /// hypothetical LOC644090                                                                       | BC040865  | -1,85 | 1562749_at  |

|                                                    |                                                                                          |           |       |              |
|----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------|--------------|
| <i>LOC641912</i><br><i>LOC644090</i>               | hypothetical protein LOC641912 ///<br>hypothetical LOC644090                             | AI732843  | -1,71 | 238319_at    |
| <i>LOC653879</i><br><i>C3</i>                      | complement component 3                                                                   | NM_000064 | -1,59 | 217767_at    |
| <i>USP18</i>                                       | ubiquitin specific peptidase 18                                                          | NM_017414 | -1,91 | 219211_at    |
| <i>LYN</i>                                         | v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral<br>related oncogene homolog                              | AI356412  | -1,82 | 202625_at    |
| <i>LYN</i>                                         | v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral<br>related oncogene homolog                              | M79321    | -1,66 | 210754_s_at  |
| <i>LYN</i>                                         | v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral<br>related oncogene homolog                              | NM_002350 | -1,63 | 202626_s_at  |
| <i>LYRM7</i>                                       | Lym7 homolog (mouse)                                                                     | AA424065  | -1,53 | 240344_x_at  |
| <i>MAP3K8</i>                                      | mitogen-activated protein kinase<br>kinase kinase 8                                      | NM_005204 | -1,78 | 205027_s_at  |
| <i>MCOLN2</i>                                      | mucolipin 2                                                                              | AY083533  | -1,88 | 1555465_at   |
| <i>MCOLN2</i>                                      | mucolipin 2                                                                              | AV713773  | -1,65 | 230110_at    |
| <i>MFAP3</i>                                       | microfibrillar-associated protein 3                                                      | NM_005927 | -1,54 | 1552312_a_at |
| <i>MRPL50</i>                                      | mitochondrial ribosomal protein<br>L50                                                   | BG028213  | -1,72 | 225580_at    |
| <i>MS4A7</i>                                       | membrane-spanning 4-domains,<br>subfamily A, member 7                                    | AF237916  | -2,51 | 224358_s_at  |
| <i>MS4A7</i>                                       | membrane-spanning 4-domains,<br>subfamily A, member 7                                    | AB026043  | -2,23 | 223344_s_at  |
| <i>MS4A7</i>                                       | membrane-spanning 4-domains,<br>subfamily A, member 7                                    | AI301935  | -1,81 | 223343_at    |
| <i>MT1A</i> ///<br><i>MT1M</i> ///<br><i>MT1P2</i> | metallothionein 1A ///<br>metallothionein 1M ///<br>metallothionein 1 pseudogene 2       | AL031602  | -1,65 | 216336_x_at  |
| <i>MT1E</i>                                        | metallothionein 1E                                                                       | BF217861  | -1,72 | 212859_x_at  |
| <i>MT1F</i>                                        | metallothionein 1F                                                                       | M10943    | -1,70 | 217165_x_at  |
| <i>MT1G</i>                                        | metallothionein 1G                                                                       | NM_005950 | -1,67 | 204745_x_at  |
| <i>MT1H</i> ///<br><i>MT1P2</i>                    | metallothionein 1H ///<br>metallothionein 1 pseudogene 2                                 | NM_005951 | -1,88 | 206461_x_at  |
| <i>MT1P2</i>                                       | metallothionein 1 pseudogene 2                                                           | AF333388  | -1,55 | 211456_x_at  |
| <i>MT1X</i>                                        | metallothionein 1X                                                                       | NM_005952 | -1,94 | 208581_x_at  |
| <i>MT1X</i>                                        | metallothionein 1X                                                                       | NM_002450 | -1,72 | 204326_x_at  |
| <i>MT2A</i>                                        | metallothionein 2A                                                                       | NM_005953 | -1,83 | 212185_x_at  |
| <i>MX1</i>                                         | myxovirus (influenza virus)<br>resistance 1, interferon-inducible<br>protein p78 (mouse) | NM_002462 | -1,53 | 202086_at    |
| <i>NAB1</i>                                        | NGFI-A binding protein 1 (EGR1<br>binding protein 1)                                     | NM_005966 | -1,86 | 208047_s_at  |
| <i>NBN</i>                                         | nibrin                                                                                   | AK001017  | -1,77 | 217299_s_at  |
| <i>NDFIP2</i>                                      | Nedd4 family interacting protein 2                                                       | AA019338  | -1,62 | 224802_at    |
| <i>NID1</i>                                        | nidogen 1                                                                                | BF940043  | -2,08 | 202007_at    |
| <i>OAS1</i>                                        | 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40<br>/46kDa                                          | NM_002534 | -1,54 | 205552_s_at  |
| <i>OLIG1</i>                                       | oligodendrocyte transcription<br>factor 1                                                | AL355743  | -3,16 | 228170_at    |
| <i>PBEF1</i>                                       | pre-B-cell colony enhancing<br>factor 1                                                  | BC020691  | -1,95 | 1555167_s_at |
| <i>PBEF1</i>                                       | pre-B-cell colony enhancing                                                              | BF575514  | -1,86 | 217738_at    |



## Biomarcadores plasmáticos y alteraciones de la respuesta inmunitaria en HHT

|                |                                                              |           |       |              |
|----------------|--------------------------------------------------------------|-----------|-------|--------------|
|                | factor 1                                                     |           |       |              |
| <i>PBEF1</i>   | pre-B-cell colony enhancing factor 1                         | NM_005746 | -1,61 | 217739_s_at  |
| <i>PID1</i>    | phosphotyrosine interaction domain containing 1              | NM_017933 | -1,76 | 219093_at    |
| <i>PLSCR1</i>  | phospholipid scramblase 1                                    | NM_021105 | -1,56 | 202430_s_at  |
| <i>POLR3E</i>  | polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E (80kD)     | AK023160  | -1,55 | 222490_at    |
| <i>PPIL4</i>   | peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 4                | BF515889  | -1,58 | 226472_at    |
| <i>PSAT1</i>   | phosphoserine aminotransferase 1                             | BC004863  | -1,52 | 223062_s_at  |
| <i>PSTPIP2</i> | proline-serine-threonine phosphatase interacting protein 2   | NM_024430 | -1,55 | 219938_s_at  |
| <i>PTX3</i>    | pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta         | NM_002852 | -3,38 | 206157_at    |
| <i>QPCT</i>    | glutaminyl-peptide cyclotransferase (glutaminyl cyclase)     | NM_012413 | -1,70 | 205174_s_at  |
| <i>RDX</i>     | radixin                                                      | NM_002906 | -1,86 | 204969_s_at  |
| <i>RNF144B</i> | ring finger 144B                                             | AL575512  | -3,21 | 235549_at    |
| <i>RNF144B</i> | ring finger 144B                                             | AI953847  | -1,90 | 228153_at    |
| <i>RP2</i>     | retinitis pigmentosa 2 (X-linked recessive)                  | NM_006915 | -1,84 | 205191_at    |
| <i>RSAD2</i>   | radical S-adenosyl methionine domain containing 2            | AI337069  | -2,91 | 213797_at    |
| <i>RSAD2</i>   | radical S-adenosyl methionine domain containing 2            | AW189843  | -2,84 | 242625_at    |
| <i>RTN1</i>    | reticulon 1                                                  | NM_021136 | -1,73 | 203485_at    |
| <i>RTP4</i>    | receptor (chemosensory) transporter protein 4                | NM_022147 | -2,09 | 219684_at    |
| <i>SAMSN1</i>  | SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals 1    | AF519621  | -1,54 | 1555638_a_at |
| <i>SIKE</i>    | suppressor of IKK epsilon                                    | AI983535  | -1,59 | 228026_at    |
| <i>SIP1</i>    | survival of motor neuron protein interacting protein 1       | NM_003616 | -1,68 | 205063_at    |
| <i>SLAMF7</i>  | SLAM family member 7                                         | NM_021181 | -2,19 | 219159_s_at  |
| <i>SLAMF7</i>  | SLAM family member 7                                         | AJ271869  | -1,89 | 234306_s_at  |
| <i>SLAMF7</i>  | SLAM family member 7                                         | AL121985  | -1,57 | 222838_at    |
| <i>SLC39A8</i> | solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8        | AB040120  | -3,37 | 209267_s_at  |
| <i>SLC39A8</i> | solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8        | NM_022154 | -3,17 | 219869_s_at  |
| <i>SLC39A8</i> | solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8        | AL049963  | -2,59 | 216504_s_at  |
| <i>SLC8A1</i>  | solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1 | AI741439  | -1,73 | 235518_at    |
| <i>SMPDL3A</i> | sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A                | AA873600  | -1,86 | 213624_at    |
| <i>SNX16</i>   | sorting nexin 16                                             | NM_022133 | -1,75 | 219793_at    |
| <i>SNX16</i>   | sorting nexin 16                                             | AW150236  | -1,58 | 229618_at    |
| <i>SOD2</i>    | superoxide dismutase 2, mitochondrial                        | X15132    | -2,04 | 216841_s_at  |
| <i>SOD2</i>    | superoxide dismutase 2, mitochondrial                        | W46388    | -1,81 | 215223_s_at  |

|                |                                                                              |           |       |              |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------|--------------|
| <i>STEAP4</i>  | STEAP family member 4                                                        | AA650281  | -2,33 | 225987_at    |
| <i>TAF1A</i>   | TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, A, 48kDa | NM_005681 | -1,86 | 206613_s_at  |
| <i>THAP2</i>   | THAP domain containing, apoptosis associated protein 2                       | AL136607  | -1,59 | 223588_at    |
| <i>THAP5</i>   | THAP domain containing 5                                                     | BG500677  | -1,53 | 227636_at    |
| <i>THBS1</i>   | thrombospondin 1                                                             | NM_003246 | -4,17 | 201110_s_at  |
| <i>THBS1</i>   | thrombospondin 1                                                             | AV726673  | -2,99 | 201109_s_at  |
| <i>TNFAIP6</i> | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6                               | NM_007115 | -5,18 | 206026_s_at  |
| <i>TNFAIP6</i> | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6                               | AW188198  | -4,58 | 206025_s_at  |
| <i>TNFRSF9</i> | tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9                         | NM_001561 | -1,77 | 207536_s_at  |
| <i>TNFSF10</i> | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10                        | AW474434  | -2,31 | 214329_x_at  |
| <i>TNFSF10</i> | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10                        | U57059    | -1,85 | 202687_s_at  |
| <i>TNIP3</i>   | TNFAIP3 interacting protein 3                                                | NM_024873 | -2,62 | 220655_at    |
| <i>TRIM13</i>  | tripartite motif-containing 13                                               | AI472310  | -1,64 | 230192_at    |
| <i>TRIM23</i>  | tripartite motif-containing 23                                               | AI021991  | -1,50 | 204732_s_at  |
| <i>TRIM36</i>  | tripartite motif-containing 36                                               | NM_018700 | -2,79 | 219736_at    |
| <i>TRIM5</i>   | tripartite motif-containing 5                                                | AF220028  | -1,69 | 210705_s_at  |
| <i>TRNT1</i>   | tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1                                  | AB063105  | -1,74 | 1552625_a_at |
| <i>TRNT1</i>   | tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1                                  | BE552215  | -1,59 | 222754_at    |
| <i>UBE1L2</i>  | ubiquitin-activating enzyme E1-like 2                                        | NM_018227 | -2,06 | 218340_s_at  |
| <i>UTX</i>     | ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome              | NM_021140 | -1,74 | 203991_s_at  |
| <i>VNN1</i>    | vanin 1                                                                      | NM_004666 | -1,79 | 205844_at    |
| <i>WNT5B</i>   | wingless-type MMTV integration site family, member 5B                        | NM_030775 | -1,51 | 221029_s_at  |
| <i>XRN1</i>    | 5'-3' exoribonuclease 1                                                      | AY137776  | -1,72 | 1555785_a_at |
| <i>YIPF5</i>   | Yip1 domain family, member 5                                                 | AW001618  | -1,61 | 224953_at    |
| <i>ZBTB1</i>   | zinc finger and BTB domain containing 1                                      | NM_014950 | -2,11 | 205092_x_at  |
| <i>ZC3H12A</i> | zinc finger CCCH-type containing 12A                                         | NM_025079 | -1,51 | 218810_at    |
| <i>ZNF200</i>  | zinc finger protein 200                                                      | AU149447  | -1,57 | 214706_at    |
| <i>ZNF267</i>  | zinc finger protein 267                                                      | AU150728  | -1,93 | 219540_at    |
| <i>ZNF304</i>  | zinc finger protein 304                                                      | NM_020657 | -1,89 | 207753_at    |
| <i>ZNF557</i>  | zinc finger protein 557                                                      | NM_024341 | -1,83 | 220444_at    |

**Tabla 4. Grupos funcionales estadísticamente significativos presentes en la lista de genes reprimidos.**

En la siguiente tabla están descritos los grupos funcionales estadísticamente significativos que FatiGO ha identificado en cada uno de los niveles de procesos biológicos en la base de datos GO. El % de anotaciones representa el % de genes del total de los genes reprimidos que están incluidos en el grupo funcional al que hacen referencia. FatiGO utiliza el procedimiento FDR como ajuste del valor p resultante de un *t* test de Fisher.

| Nivel Biológico | Grupo Funcional GO                                             | % anotaciones | FDR                   |
|-----------------|----------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------|
| 2               | <i>Immune System Process</i><br>GO:0002376                     | 81.46%        | $7.74 \cdot 10^{-16}$ |
| 2               | <i>Response to stimulus</i><br>GO:0050896                      | 69.25%        | $1.94 \cdot 10^{-10}$ |
| 3               | <i>Immune Response</i><br>GO:0006955                           | 84.01%        | $1.4 \cdot 10^{-16}$  |
| 3               | <i>Response to biotic stimulus</i><br>GO:0009607               | 83.16%        | $6.92 \cdot 10^{-7}$  |
| 3               | <i>Defense response</i><br>GO:0006952                          | 79.05%        | $6.92 \cdot 10^{-7}$  |
| 3               | <i>Cell activation</i><br>GO:0001775                           | 80,41%        | $2,43 \cdot 10^{-3}$  |
| 3               | <i>Cell proliferation</i><br>GO:0008283                        | 71,65%        | $2,4 \cdot 10^{-3}$   |
| 3               | <i>Response to external stimulus</i><br>GO:0009605             | 73,22%        | $2,4 \cdot 10^{-3}$   |
| 3               | <i>Response to chemical stimulus</i><br>GO:0042221             | 74,66%        | $2,4 \cdot 10^{-3}$   |
| 3               | <i>Response to stress</i><br>GO:0006950                        | 65.59%        | $4,15 \cdot 10^{-2}$  |
| 4               | <i>Response to other organism</i><br>GO:0051707                | 86,49%        | $1,88 \cdot 10^{-7}$  |
| 4               | <i>Humoral immune response</i><br>GO:0006959                   | 88,26%        | $4,1 \cdot 10^{-6}$   |
| 4               | <i>Response to wounding</i><br>GO:0009611                      | 78,31%        | $1,25 \cdot 10^{-3}$  |
| 4               | <i>Positive regulation of biological process</i><br>GO:0048518 | 70,48%        | $1,25 \cdot 10^{-3}$  |
| 4               | <i>Cell-cell signalling</i><br>GO:0007267                      | 74,43%        | $1,45 \cdot 10^{-3}$  |
| 4               | <i>Innate immune response</i><br>GO:0045087                    | 88,66%        | $1,78 \cdot 10^{-3}$  |
| 4               | <i>Adaptative immune response</i><br>GO:0002250                | 88,08%        | $6,92 \cdot 10^{-3}$  |
| 4               | <i>Leukocyte activation</i><br>GO:0045321                      | 81,21%        | $8,33 \cdot 10^{-3}$  |
| 4               | <i>Cell activation during immune response</i><br>GO:0002263    | 96,32%        | $8,56 \cdot 10^{-3}$  |
| 4               | <i>Vitamin metabolic process</i><br>GO:0006766                 | 88,56%        | $1,34 \cdot 10^{-2}$  |
| 4               | <i>Immune effector process</i><br>GO:0002252                   | 84,22%        | $2,25 \cdot 10^{-3}$  |
| 5               | <i>Response to virus</i><br>GO:0009615                         | 91,38%        | $3,37 \cdot 10^{-5}$  |
| 5               | <i>Inflammatory response</i><br>GO:0006954                     | 81,95%        | $4,54 \cdot 10^{-4}$  |
| 5               | <i>Vitamin biosynthetic process</i><br>GO:0009110              | 96,13%        | $4,54 \cdot 10^{-4}$  |
| 5               | <i>Positive regulation of cellular process</i>                 | 73,29%        | $4,54 \cdot 10^{-4}$  |

|   |                                                                        |        |                       |
|---|------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------------|
|   | GO:0048522                                                             |        |                       |
| 5 | <i>Antimicrobial humoral response</i><br>GO:0019730                    | 89,14% | $8,21 \times 10^{-4}$ |
| 5 | <i>Water-soluble vitamin metabolic process</i><br>GO:0006767           | 92,37% | $6,45 \times 10^{-3}$ |
| 5 | <i>Lymphocyte activation</i><br>GO:0046649                             | 82,75% | $8,83 \times 10^{-3}$ |
| 5 | <i>Adaptative immune response (sensu Gnathostomata)</i><br>GO:0002460  | 87,89% | $1,15 \times 10^{-2}$ |
| 5 | <i>Regulation of cell proliferation</i><br>GO:0042127                  | 75,4%  | $1,15 \times 10^{-2}$ |
| 5 | <i>Leukocyte activation during immune response</i><br>GO:0002366       | 96,26% | $1,59 \times 10^{-2}$ |
| 5 | GO:0006733                                                             | 91,96% | $2,05 \times 10^{-2}$ |
| 5 | <i>Nucleotide metabolic process</i><br>GO:0009117                      | 79,95% | $2,05 \times 10^{-2}$ |
| 5 | <i>Taxis</i><br>GO:0042330                                             | 82,72% | $2,68 \times 10^{-2}$ |
| 5 | <i>Aromatic compound catabolic process</i><br>GO:0019439               | 94,65% | $2,91 \times 10^{-2}$ |
| 6 | <i>Water-soluble vitamin biosynthetic process</i><br>GO:0042364        | 96,78% | $1,13 \times 10^{-3}$ |
| 6 | <i>Antimicrobial humoral response (sensu Vertebrata)</i><br>GO:0019735 | 90,28% | $1,24 \times 10^{-3}$ |
| 6 | <i>Positive regulation of cell proliferation</i><br>GO:0008284         | 84,32% | $1,87 \times 10^{-3}$ |
| 6 | <i>Positive regulation of protein metabolic process</i><br>GO:0051247  | 89,49% | $4,31 \times 10^{-3}$ |
| 6 | <i>Natural killer cell activation</i><br>GO:0030101                    | 96,01% | $5,53 \times 10^{-3}$ |
| 6 | <i>Hemoglobin metabolic process</i><br>GO:0020027                      | 98,08% | $7,46 \times 10^{-3}$ |
| 6 | <i>Lymphocyte activation during immune response</i><br>GO:0002285      | 96,54% | $2,58 \times 10^{-2}$ |
| 6 | <i>Positive regulation of signal transduction</i><br>GO:0009967        | 84,62% | $2,58 \times 10^{-2}$ |
| 6 | <i>T-helper 1 type immune response</i><br>GO:0042088                   | 96,23% | $2,58 \times 10^{-2}$ |
| 6 | <i>Chemotaxis</i><br>GO:0006935                                        | 83,83% | $3,21 \times 10^{-2}$ |
| 6 | <i>Nucleotide biosynthetic process</i><br>GO:0009165                   | 83,34% | $3,57 \times 10^{-2}$ |
| 6 | <i>Cytokine metabolic process</i><br>GO:0042107                        | 87,8%  | $4,37 \times 10^{-2}$ |
| 7 | <i>Hemoglobin biosynthetic process</i><br>GO:0042541                   | 98,29% | $4,15 \times 10^{-2}$ |
| 7 | <i>Age-dependent response to reactive oxygen species</i><br>GO:0001315 | 99,48% | $4,3 \times 10^{-2}$  |
| 7 | <i>Natural killer cell mediated immunity</i><br>GO:0002228             | 96,3%  | $4,3 \times 10^{-2}$  |
| 7 | <i>T cell activation during immune response</i><br>GO:0002286          | 96,3%  | $4,3 \times 10^{-2}$  |
| 7 | <i>Pyridine nucleotide metabolic process</i><br>GO:0019362             | 94,09% | $4,3 \times 10^{-2}$  |
| 7 | <i>Alpha-beta T cell activation</i><br>GO:0046631                      | 93,86% | $4,3 \times 10^{-2}$  |
| 8 | <i>Pyridine nucleotide biosynthetic process</i><br>GO:0019363          | 96,64% | $2,06 \times 10^{-2}$ |



### *Plasmatic biomarkers and alterations of the immune response in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia (HHT)*

#### 1. Introduction

Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) also known as *Rendu-Osler-Weber* syndrome, is a rare disease characterized by weak-walled vessels that lead to the formation of arteriovenous malformations (AVMs). Little AVMs are called telangiectasies and are mainly localized in skin and mucosa. Telangiectasies in nasal mucosa and gastrointestinal tract are prompted to break leading to nasal hemorrhages (epistaxis) and gastrointestinal bleeding. The dermal telangiectases are generally pinhead size, very specifically concentrated on the hands, face, and lips, and not diffuse. Large AVMs are localized particularly in the lungs, liver and brain, and these may contribute to serious health outcomes such as strokes, brain abscesses and hemorrhages. HHT is caused by mutation in genes coding proteins involved in the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) signalling pathway that regulates cell proliferation, differentiation, apoptosis and migration. Thus, mutations in endoglin gene (*ENG*, chromosome 9q34) and activin A receptor type II-like1 gene (*ACVRL1/ALK1*, chromosome 12q13) cause HHT1 (OMIM 187300) and HHT2 (OMIM 600376), respectively. HHT3 (OMIM 601101) and HHT4 (OMIM 610655) are caused by mutations whose genes have not been identified but are localized in chromosome 5 (5q31.3q32) and chromosome 7 (7p14). Recently, has been identified the HHT5 (OMIM 605120) caused by mutations on BMP9 gene (*GDF2*, 10q11.22). Moreover, there is a syndrome known as Juvenile Polyposis combined with HHT (JP-HHT, OMIM 175050) due to mutations on Smad4 gene (*MADH4*, 18q21.2). Almost 90% of HHT patients carried mutations in *ENG* or *ACVRL1*, thus most of the scientific and clinical research is based on HHT1 and/or HHT2. The diagnosis of HHT patients currently remains at the clinical level, according to the “Curaçao criteria”, whereas the molecular diagnosis is used to confirm or rule out suspected HHT cases, especially when a well characterized index case is present in the family or in an isolated population. The consensus “Curaçao criteria” are epistaxis (spontaneous, recurrent nosebleeds), telangiectases (multiple and at characteristic sites), visceral lesions and/or gastrointestinal bleeding, and a family history. Thus, Curaçao criteria are particularly helpful in identifying affected from non-affected adults. However, special attention must be paid to the risk of not diagnosing HHT in asymptomatic children and young adults. In these cases, not all of the typical symptoms may be present. In general, most patients show a full penetrance of the disease around the age of 40. The genetic testing for HHT genes is the choice option in children and teenagers, especially if the family mutation is known. Current genetic determinations imply the sequencing of at least two HHT genes. This

process is time-consuming, expensive and in 10-15% of the cases, the mutation is not identified. Therefore, it would be desirable to have alternative tools facilitating diagnosis. In this work, angiopoietin 2 (Ang-2) and soluble endoglin (sEng), have been evaluated as suitable biomarkers for HHT.

HHT patients have an unexplained high risk of severe bacterial infections. Serious infections in patients with HHT are clinically relevant events, documented in many case reports. In a retrospective study, about 13% of patients in an HHT cohort had a history of severe infection, in particular cerebral abscesses or staphylococcal osteoarthritis. This risk of infection was linked to mechanical factors, such as pulmonary AVMs or prolonged nasal packing for epistaxis. The endoglin and ALK1 upregulation during *in vitro* monocyte differentiation process is age-dependent and this upregulation is impaired in cells from HHT patients. Based on these findings, we have hypothesized that HHT could be associated with intrinsic immunological dysfunction. However, the role of endoglin expression in macrophages in relation to innate immunity and inflammation is not well established. Therefore, for the present thesis we explored the following aims.

### 2. Aims

- Analysis of sEng and Ang-2 plasma levels in HHT patients and healthy individuals non-HHT to establish a molecular diagnosis.
- Study of infectious diseases in the HHT Spanish cohort.
- Analysis of the differential expressed gene pattern in macrophages from HHT patients.
- Analysis of the endoglin expression levels on murine macrophages.
- Generation and characterization of myeloid endoglin specific knock-out mouse model.

### 3. Results

Ang-2 is a proangiogenic factor structurally homologous to angiopoietin-1 (Ang-1) that blocks the phosphorylation of Tie-2, a tyrosine kinase receptor for Ang-1. Ang-2 is strongly expressed in remodeling vasculature during embryogenesis, inflammation and tumor-driven angiogenesis and its levels have been shown to be of value in prognosticating leukemia and sepsis. We selected Ang-2 as a putative biomarker for HHT since gene expression studies performed in endothelial cells from HHT patients identified Ang-2 as a down-regulated gene. Endoglin is an integral membrane-bound glycoprotein, which serves as a high-affinity coreceptor for TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 3. Endoglin is highly expressed by activated endothelial cells, in which it has a crucial role in angiogenesis. Haploinsufficiency is the underlying cause of

HHT1. Activated monocytes and endothelial cells of individuals with *ENG* mutations are reduced almost to 50%. Interestingly, decreased endoglin levels have also been described in HHT2 patients. Thus, sEng levels in HHT1 patients are expected to be lower compared with those of control subjects. Endoglin extracellular domain is released from the membrane by a proteolytic cleavage, where MMP-14 is the major endoglin shedding protease. Levels of Ang-2 and sEng were reduced in HHT patients compared to the control population. However, some quantitative differences between the two main HHT types are observed. Based on a combination of Ang-2 and sEng levels, a protocol for HHT diagnosis is proposed in a discriminant function analysis. Reference levels for Ang-2 and sEng indicative of HHT diagnosis with 95% reliability. In summary, levels of Ang-2 and sEng in plasma represent potential HHT biomarkers in the biochemical diagnosis of HHT facilitating the rapid identification of suspected HHT patients.

Previous studies have suggested that HHT may be involved with an impaired Immune Response. To study the relation between infectious diseases and HHT, we studied retrospectively a cohort of HHT patients from the Spanish HHT reference center (Hospital de Sierrallana/Valdecilla, Cantabria) during the period 2005 – 2010. The most common infection events are cerebral abscesses, ulcer and infections related to breathing. With lower incidence, infections of skin and mucosa are also remarkable. Special attention has to be taken with osteomyelitis, spondilodiscytes, endocarditis and sepsis, since the incidence of these infections seems to be higher among the HHT population than in normal population, and they could lead to serious health outcomes. To check if there was an underlying immunoprimary defect we have evaluated the analytical data from 125 patients and evaluated total IgG, IgA and IgM plasma levels in 10 HHT patients. In general total leukocyte count is between the normal range, despite for almost 16% of HHT patients that shown a leukopenia. Inmunoglobulins concentrations were also normal. For these reasons we discard a primary immunodeficiency as the cause of a higher incidence of infectious disease seen in HHT patients.

To deep into the HHT immune response, we have analyzed the gene expression fingerprinting in macrophages differentiated from peripheral blood monocytes isolated from 6 HHT patients and 3 healthy donors. Total RNA was isolated and processed to obtain cDNA probes that were labeled and independently hybridized of Affymetrix human whole genome platforms (GeneChip® Human Genome U133 plus 2.0). Genes with a Log2 ratio between 1.5 and -1,5 and a  $p$ value>0.01 were discarded. In this way, macrophages from HHT patients show a differential gene expression profile with 27 up-regulated and 187 down-regulated genes. Common genes differentially expressed in monocytes from HHT patients were submitted to a



functional enrichment. The functional analysis revealed in the case of downregulated genes that biological processes related to the Immune Process are markedly affected. A total of 84.01% of the differentially expressed genes are implicated in Immune Response (GO:0006955) and 81.46% in the Immune System Process (GO:0002376). Cultured monocytes from HHT patients secrete lower levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-12 and Activin A in response to LPS treatment, as microarrays predicted. Those cytokines are members of the Th1 immune response, related with a strong cellular immunity and intracellular pathogens. As a main conclusion we postulate that Endoglin and ALK-1 regulate immune functions as cytokines production, indicating that haploinsufficiency would lead to an impairment of the immune response that will be underlying the higher rate of infectious disease reported in the literature. From the previous results, antibiotic prophylaxis is strongly supported for minor surgeries and hospital admissions in HHT patients.

To deep into the endoglin role in macrophage biology, we have generated and endoglin knockout mouse specific of myeloid lineage. First of all we have evaluated the endoglin expression levels in the myeloid lineage of wild-type animals. Endoglin expression is absent in circulating monocytes and inflammatory granulocytes, but its expression is up-regulated during the differentiation of monocytes to macrophages, and this was also supported by the confirmation of endoglin expression in tissue macrophages from the peritoneal cavity, Kupffer cells and alveolar macrophages. Myeloid endoglin knock-out mice have a normal embryonic development and fertility but they show a immunocompromised phenotype characterized by a predisposition to develop spontaneous infections by opportunistic bacteria, mainly due to *Staphylococcus* spp. Mice lacking endoglin in macrophages are less susceptible than control mice to sepsis. Moreover, during the first 36 hours following the LPS injection, animals lacking endoglin in macrophages showed a delayed endotoxin-induced mortality correlated with an impaired immune response. PerC exudates from endoglin knockout mice were significantly less effective to recruit lymphocytes than exudates from control mice. These defects are associated with decreased levels of chemokines like IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$ . These results suggest that endoglin is important for the initiation of the immune response to inflammatory stimuli, in accordance with its expression on tissue resident macrophages. Mice lacking endoglin in macrophages show a deficient phagocytic activity of Zymosan particles, in accordance with previous reports performed on human polymorphonuclear cells and monocytes from HHT patients. Finally macrophages lacking endoglin present an altered expression of target genes controlled by the TGF- $\beta$  signalling pathway that may contribute to an altered TGF- $\beta$  signalling in macrophages from endoglin knockout mice.

#### 4. Conclusions

- Plasma levels of Ang-2 and sEng are significantly lower in HHT patients compared with control non-HHT donors. Thus, the combination of Ang-2 and sEng plasma levels allows the identifications of HHT patients with a high reliability and also allows the discrimination between the principal HHT types: HHT1 and HHT2.
- The HHT Spanish cohort show a higher incidence of severe infections such as cerebral abscesses, osteomyelitis and with a lesser extend endocarditis and sepsis than general population. Cerebral abscesses are more prevalent in HHT1 patients but these are not affected by the smoking habit in the population analyzed. For the other infectious diseases such as ulcus, osteomyelitis, cutaneous abscesses and endocarditis there aren't evidences for a differential incidence between HHT1 and HHT2 patients.
- A primary immunodeficiency is not the underlying cause of an immunocompromised phenotype show by HHT patients since total leukocytes blood counts and IgG, IgA and IgM are normal.
- Endoglin and ALK-1 haploinsufficiency lead to an altered gene expression on human macrophages differentiated from blood monocytes. Functional enrichment analysis of differential expressed genes, revealed that down-regulated genes in macrophages from HHT patients are involved in several biological processes related to the immune response functional cluster.
- Macrophages from HHT patients secrete lower levels of TSP-1 protein and lower levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p40, CCL20 in response to LPS treatment, as microarrays predict. Also Activin A production, a cytokine that promotes M1 phenotype, is impaired.
- Endoglin is absent in circulating murine monocytes but it is expressed in tissue macrophages from mice as Kupffer cells, alveolar macrophages (mainly LPM) and peritoneal macrophages, while differences on endoglin levels has been observed.
- Endoglin expression is induced during the differentiation process towards macrophages. Remarkably, its induction during *in vivo* differentiation process is lower than *in vitro* assay predict, and endoglin expression is detected in well differentiated macrophages identified by F4/80 expression on surface.

- Crosses between of LysMCre mice and *Eng*<sup>fl/fl</sup> allows us the generation of three experimental mice: *Eng*<sup>wt/wt</sup>LysMCre (control mice), *Eng*<sup>wt/fl</sup>LysMCre (heterozygous) and *Eng*<sup>fl/fl</sup>LysMCre mice (myeloid specific knockout mice). The coexpresion of Cre recombinase lead to the specific deletion of *eng* flox sequences flanking exons 5-6 in the myeloid lineage keeping the expression of endoglin in endothelial cells.
- *Eng*<sup>fl/fl</sup>LysMCre show a predisposition to develop infections by opportunistic bacteria as *S. aureus*. These infections are correlated with an splenomegaly that is secondary to an acute infectious process.
- Phagocytosis of Zymosan particles by peritoneal macrophages is impaired in macrophages lacking endoglin in *in vivo* experiments and these differences are independent of TLR2 levels on macrophages.
- *Eng*<sup>fl/fl</sup>LysMCre mice, and to a lesser extent *Eng*<sup>wt/fl</sup>LysMCre mice, show a delayed endotoxin-induced mortality during a septic shock induced by LPS intraperitoneal administration, and shown a moderate higher survival rate than control mice.
- Lower levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  are detected in peritoneal exudates and serum samples of mice lacking endoglin on macrophages with moderate differences compared to control mice. These differences contributed to a less chemoattractant activity of peritoneal exudates from *Eng*<sup>fl/fl</sup>LysMCre mice in quimiotaxis assays performed with SR.D10.CD4<sup>-</sup> lymphocytes, but in addition, other chemokines may be involved.
- In a second model of peritonitis induced by Zymosan, we have observed a lower infiltration of inflammatory cells, mainly granulocytes and macrophages, in *Eng*<sup>fl/fl</sup>LysMCre mice compared with control mice, *Eng*<sup>wt/fl</sup>LysMCre mice showing an intermediate number of leukocyte recruited to the peritoneal cavity.
- Endoglin deficiency in cultured peritoneal macrophages is translated in an altered gene expression of target genes of TGF- $\beta$ 1 signalling pathways as *Acvrl1*, *Pai1*, *Nos2*, *Mmp12* and *InhbA* suggesting that endoglin may modulate macrophage responses to TGF- $\beta$ 1.



