



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

El eje Galectina-4-glicanos y su relevancia en inflamación intestinal

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área de Química Biológica

Lic. Prof. Mora Massaro

Directora de Tesis: Dra. Karina Valeria Mariño

Director Adjunto de Tesis: Dr. Alejandro Javier Cagnoni

Consejera de Estudios: Dra. Mirta Schattner

Lugar de Trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME –
CONICET

Ciudad de Buenos Aires, 27 de junio de 2025

«La ciencia, muchacho,
está hecha de errores,
pero de errores útiles de cometer,
pues poco a
poco, conducen a la
verdad».

Julio Verne

I Resumen

La colitis ulcerosa (CU) es un trastorno gastrointestinal inflamatorio crónico cuyos tratamientos actuales presentan limitaciones críticas, subrayando la necesidad de nuevos blancos terapéuticos. Galectina-4 (Gal-4) es una lectina multifuncional que ha emergido como un actor clave en la interpretación de patrones de glicosilación y en la modulación de la respuesta inmunitaria. En particular, algunos estudios indican que la administración de Gal-4 en dosis altas retrasa la recuperación de la colitis experimental, mientras que otros muestran una reducción en la severidad de la inflamación intestinal cuando se administra Gal-4 en dosis bajas y continuadas, indicando el complejo papel de esta lectina.

En este trabajo caracterizamos el papel de Gal-4 en la inflamación intestinal mediante un enfoque multidisciplinario. Optimizamos la producción recombinante de Gal-4 humana (rhGal-4) y evaluamos sus propiedades inmunorreguladoras, particularmente como inductora de la secreción de interleucina (IL)-6 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas activadas. Mediante estudios biofísicos y simulaciones computacionales demostramos que Gal-4 tiene una alta afinidad por el antígeno sanguíneo de grupo A tipo 6 (BGA6) en comparación con otros oligosacáridos. Además, nuestros resultados demuestran que la inducción de IL-6 es glicano-dependiente, ya que es inhibida por BGA6.

El análisis de bases de datos públicas de biopsias de pacientes con CU reveló que la expresión de Gal-4 está disminuida significativamente en esta patología. Considerando que esta lectina se expresa específicamente en epitelio intestinal, utilizamos ratones transgénicos con depleción específica de Gal-4 en el epitelio intestinal (*CreVillina*^{+/-} *FloxLgals4*^{+/-}, *Gal4*^{ΔIEC}) como modelo para estudiar esta alteración. En un modelo de inflamación inducida por dextrano sulfato sódico, los animales deficientes en Gal-4 presentaron una enfermedad más severa, en comparación con los ratones control de la misma camada (*CreVillina*^{-/-} *FloxLgals4*^{+/-}, *Gal4*^{fl/fl}), además de un incremento en la proporción de linfocitos T de memoria central CD4⁺CD62L⁺CD44⁺ en los ganglios linfáticos mesentéricos. Con el objeto de comprender la relevancia de esta lectina en el epitelio intestinal, realizamos ensayos de diferenciación y proliferación de organoides de intestino delgado y evaluamos la capacidad de unión de rhGal-4 en cortes de intestino de ratón.

Los resultados obtenidos durante esta Tesis postulan un rol dual para Gal-4: mientras que promueve un perfil pro-inflamatorio en linfocitos T, su ausencia en células epiteliales intestinales exacerba la colitis *in vivo*. Este estudio centrado en el eje Gal-4-glicanos abre nuevas perspectivas para comprender tanto el proceso inflamatorio como la homeostasis intestinal desde una perspectiva glicobiológica.

Palabras clave: Galectina-4, inflamación intestinal, glicanos sanguíneos, linfocitos T, células epiteliales.

II Abstract

The Galectin-4-glycan axis and its relevance in intestinal inflammation

Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory disorder affecting the gastrointestinal tract. Current treatments have critical limitations, highlighting the need for new therapeutic targets. Galectin-4 (Gal-4) is a multifunctional lectin that has emerged as a key player in decoding glycosylation patterns and modulating immune responses. Notably, some studies indicate that high doses of Gal-4 delay the recovery of experimental colitis, whereas other reports show reduced intestinal inflammation severity when Gal-4 is administered in low, continuous doses, depicting the complex role of this lectin.

In this work, we characterized the role of Gal-4 in intestinal inflammation through a multidisciplinary approach. We optimized the recombinant production of human Gal-4 (rGal-4) and evaluated its immunoregulatory properties, particularly as an inducer of interleukin (IL)-6 secretion in activated human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Using biophysical affinity studies and computational simulations, we demonstrated that rGal-4 has a high affinity for blood group A antigen 6 (BGA6), compared to other oligosaccharide ligands. Additionally, our results show that IL-6 secretion is glycan-dependent, as it is inhibited by BGA6.

The analysis of public databases of UC patients' biopsies revealed that Gal-4 expression is significantly reduced in this pathology. Considering that this lectin is specifically expressed in intestinal epithelium, we used transgenic mice with specific depletion of Gal-4 in intestinal epithelial cells (*CreVillin^{+/-} FloxLgals4^{+/+}*, *Gal4^{ΔIEC}*) as a model to study the relevance of this alteration. When compared to control mice (*CreVillin^{-/-} FloxLgals4^{+/+}*, *Gal4^{fl/fl}*), Gal-4-deficient animals exhibited more severe dextran sulfate sodium-induced colitis, along with an increased proportion of central memory CD4⁺CD62L⁺CD44⁺ T cells in mesenteric lymph nodes. Moreover, to understand the relevance of this lectin in the epithelium, we performed small intestine organoid differentiation and proliferation assays and evaluated the binding capacity of rGal-4 in mouse intestinal sections, observing effects consistent with its immunoregulatory properties and glycan interactions.

The results obtained during this thesis propose a dual role for Gal-4: while it promotes a pro-inflammatory profile in T cells, its absence in intestinal epithelial cells exacerbates colitis in vivo. This study, focused on the Gal-4-glycan axis, opens new perspectives for understanding both the inflammatory process and intestinal homeostasis from a glycobiological standpoint.

Keywords: Galectin-4, intestinal inflammation, blood group glycans, T cells, epithelial cells

III Agradecimientos

A Karina Mariño, por su dirección, Por enseñarme que equivocarse es parte de hacer, y por ayudarme a confiar en mí misma. Por estar siempre, por entrenarme en la escritura científica, por todas las discusiones que enriquecieron este camino y por darme la libertad de seguir mis ideas.

A Alejandro Cagnoni, por su codirección. Por su paciencia inagotable, su compromiso y su confianza constante. Por acompañar cada paso, por alentarme incluso cuando las cosas no salían como esperábamos, y por recordarme que de los tropiezos se aprende.

A Gabriel Rabinovich, por su mentoría inspiradora. Por confiar en las nuevas generaciones, por compartir su pasión. Por inspirarme con su ejemplo. Por su generosidad y por motivarme a soñar en grande y volar alto.

A Juan Manuel Pérez Saez, por su entusiasmo contagioso, sus palabras que bajaban a tierra, las charlas sobre la vida y la ciencia, los cafés compartidos, y por recordarme que también el crecimiento personal forma parte del camino académico.

A quienes hicieron posible el trabajo diario en el laboratorio: Montana Manselle Cocco, Florencia Veigas, Sabrina Gatto y Rosa Morales, por su apoyo en los experimentos; Joaquín Merlo y Yamil Mahmoud, por su ayuda en los análisis bioinformáticos; Marco Scheidegger y Magalí Berton, por estar siempre al pie del cañón; Ada Blidner, Tomás Dalotto y Mariana Salatino, por sus consejos y buena predisposición. A todos mis compañeros del laboratorio, estudiantes, técnicos e investigadores, gracias por cada conversación, experimento, alegría y frustración compartida a lo largo de estos años.

A los colaboradores de esta tesis: Santiago Di Lella, Jesús Jiménez Barbero, Ana Arda, Eduardo Villablanca, Francisca Castillo y Ning He, gracias por sus aportes, tiempo e intercambio generoso.

Al Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), por brindarme un espacio para desarrollar este trabajo, y a toda la gente que forma parte de él. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por mi formación de posgrado. Al CONICET, por financiar esta etapa tan importante a través de becas y subsidios. A las fundaciones Sales, Barón, Williams, Bunge y Born, Fiorini y Boehringer Ingelheim, por su apoyo esencial mediante becas, materiales y la posibilidad de realizar una estancia de investigación en el exterior.

A mis amigos y amigas, por su apoyo constante, por estar presentes incluso en la distancia.

A mi familia, por su amor incondicional, por sostenerme siempre y ser mi mayor motor.

A todas las personas que, de una u otra forma, contribuyeron a que esta tesis fuera posible.

IV Lista de publicaciones

Publicaciones que resultan de esta tesis

a) como primera autora:

Cagnoni, A. J.*, **Massaro, M.***, Cutine, A. M., Gimeno, A., Pérez-Sáez, J. M., Cocco, M. N. M., Maller, S. M., Di Lella, S., Jiménez-Barbero J., Ardá A., Rabinovich, G. A & Mariño, K. V. (2024). Exploring Galectin Interactions with Human Milk Oligosaccharides and Blood Group Antigens Identifies BGA6 as a Functional Galectin-4 Ligand. *Journal of Biological Chemistry*, 107573. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107573>

Massaro, M.*, Cagnoni, A. J.*, Medrano, F. J., Pérez-Sáez, J. M., Abdullayev, S., Belkhadem, K., Mariño, K. V., Romero A., Roy, R., & Rabinovich, G. A. (2023). Selective modifications of lactose and *N*-acetyllactosamine with sulfate and aromatic bulky groups unveil unique structural insights in galectin-1-ligand recognition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 94, 117480. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2023.117480>

b) como coautora:

Quintana, J. I., Massaro, M., Cagnoni, A. J., Nuñez-Franco, R., Delgado, S., Jiménez-Osés, G., Mariño, K. V., Rabinovich, G. A., Jimenez-Barbero, J., & Ardá, A. (2024). Different roles of the heterodimer architecture of galectin-4 in selective recognition of oligosaccharides and lipopolysaccharides having ABH antigens. *Journal of Biological Chemistry*, 107577. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107577>

Baudou, F. G., Charó, N. L., Scheidegger, M. A., Stupirski, J. C., Pérez Sáez, J. M., Troncoso, M. F., **Massaro, M.**, de Roodt, A. R., De Marzi, M. C, Schattner, M., & Rabinovich, G. A. (2024). A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom reprograms endothelial cell biology. *Angiogenesis*, 1-4. <https://doi.org/10.1007/s10456-024-09931-x>

Cutine, A*. M., Bach*, C. A., Veigas*, F., Merlo*, J. P., Laporte*, L., Manselle Cocco*, M. N., **Massaro, M.***, Sarbia, N.*, Perrotta, R. M.*, Mahmoud, Y. D.*, & Rabinovich, G. A. (2021). Tissue-specific control of galectin-1-driven circuits during inflammatory responses. *Glycobiology*, 31(8), 891–907. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwab007>

Rodriguez Rodrigues, C., Nicolao, M. C., Chop, M., Plá, N., **Massaro, M.**, Loos, J., & Cumino, A. C. (2021). Modulation of the mTOR pathway plays a central role in dendritic cell functions after *Echinococcus granulosus* antigen recognition. *Scientific reports*, 11(1), 17238. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96435-z>

V Índice

1	Introducción.....	5
1.1.	Colitis ulcerosa: una enfermedad inflamatoria intestinal.....	5
1.1.1.	Factores genéticos y ambientales en la patogénesis de la CU.....	6
1.1.2.	Inmunopatogenia en las EII.....	7
1.1.3.	Tratamiento de las EII.....	14
1.2.	La glicobiología de la respuesta inmune.....	15
1.2.1.	La glicosilación en las EII.....	17
1.3.	Galectinas en EII.....	20
1.3.1.	Galectina-4.....	22
2	Objetivos.....	27
2.1.	Objetivo general.....	27
2.2.	Objetivos específicos.....	27
2.2.1.	Caracterizar bioquímica y funcionalmente Galectina-4 humana.....	27
2.2.2.	Investigar el papel de Galectina-4 sobre el compartimiento inmune en inflamación intestinal.....	27
2.2.3.	Estudiar la función de Galectina-4 en el compartimiento epitelial.....	27
3	Materiales y métodos.....	29
3.1.	Producción recombinante.....	29
3.1.1.	Purificación por afinidad con lactosa.....	29
3.1.2.	Purificación por afinidad a Níquel (Ni-NTA).....	30
3.2.	Esterilización, cuantificación y conservación de rGal-4.....	30
3.3.	Ensayos competitivos en fase sólida.....	31
3.4.	Ensayos de actividad por hemaglutinación.....	31
3.5.	Determinación de afinidad por calorimetría de titulación isotérmica (ITC).....	31
3.6.	Cálculos de <i>docking</i> molecular de ligandos.....	32
3.7.	Estudios de dinámica molecular.....	32
3.8.	Modelado de Gal-4 completa y acoplamiento molecular.....	33
3.9.	Resonancia magnética nuclear (RMN).....	34
3.9.1.	RMN de diferencia de transferencia de saturación (STD) de ¹ H.....	34
3.10.	Aislamiento de PBMCs a partir de <i>Buffy coats</i>	34
3.11.	Ensayo de activación de linfocitos T.....	34
3.12.	Secreción de IL-6 mediante ELISA.....	35
3.13.	Análisis de datos de transcriptómica de biopsias de pacientes con colitis ulcerosa .	
	35	
3.13.1.	Datos de microarray.....	35

3.13.2. Datos de scRNAseq.....	35
3.13.3. Análisis de expresión diferencial.....	36
3.14. Experimentos <i>in vivo</i>	36
3.14.1. Genotipificación de ratones.....	36
3.14.2. Inducción de inflamación intestinal por dextrano sulfato sódico (DSS)	37
3.15. Evaluación de niveles de lipocalina-2 y poblaciones inmunes en sangre.....	37
3.16. Peso/largo del colon como indicador de inflamación.....	38
3.17. Cortes histológicos.....	38
3.18. Aislamiento de células de ganglios mesentéricos y bazo.....	38
3.19. Aislamiento de células epiteliales y de lámina propia.....	38
3.20. Ensayo <i>in vitro</i> de diferenciación de linfocitos T CD4 ⁺ a memoria.....	39
3.21. Flurocromación de rGal-4.....	40
3.22. Análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo.....	40
3.23. Análisis de datos de transcriptómica murinos.....	42
3.23.1. Datos de scRNAseq.....	42
3.23.2. Datos de transcriptómica espacial.....	42
3.24. Organoides de criptas del intestino delgado.....	43
3.25. Organoides unicelulares del intestino delgado.....	43
3.26. Inmunofluorescencia en organoides y cortes de parafina.....	44
3.27. Análisis estadístico y representación gráfica de datos.....	45
4 Resultados.....	47
4.1. Caracterización bioquímica y funcional de Galectina-4 humana recombinante.....	47
4.1.1. Expresión y purificación de Galectina-4.....	47
4.1.2. Determinación de la afinidad sacarídica de rGal-4.....	48
4.1.3. Determinantes atomísticos de la interacción entre Gal-4 y glicanos.....	51
4.1.1. El papel del <i>linker</i> en la interacción Gal-4-glicanos.....	53
4.1.2. Estudios de ¹ H-STD-NMR para ligandos selectivos de Gal-4.....	56
4.1.3. Gal-4 estimula la secreción de IL-6.....	58
4.1.4. Conclusiones del capítulo.....	58
4.2. Galectina-4 y su papel en inflamación intestinal.....	60
4.2.1. <i>LGALS4</i> está disminuida en células epiteliales de pacientes con colitis ulcerosa.....	60
4.2.1. La ausencia de Gal-4 epitelial no altera la pérdida de peso por inflamación intestinal aguda.....	64
4.2.2. La ausencia de Gal-4 epitelial no afecta las diferencias por sexo en inflamación intestinal aguda.....	68
4.2.3. La ausencia de Gal-4 en el epitelio afecta el desarrollo de inflamación intestinal crónica.....	69

4.2.4. rGal-4 no afecta directamente la diferenciación de linfocitos T.....	73
4.2.5. Conclusiones del capítulo.....	74
4.3. Papel de Gal-4 en el compartimento epitelial.....	75
4.3.1. Gal-4 se expresa en células epiteliales y de manera independiente del tipo celular en el eje proximal-distal del colon murino.....	75
4.3.2. Caracterización de células epiteliales de ratones con una delección específica de Gal-4.....	76
4.3.3. Gal-4 es capaz de unirse a la superficie de células epiteliales.....	78
4.3.4. Determinación de las preferencias de unión de Gal-4 en tejido intestinal.....	80
4.3.5. Estimulación de organoides de intestino delgado con Gal-4.....	81
4.3.6. Conclusiones del capítulo.....	85
5 Discusión.....	87
5.1. La ausencia de Gal-4 promueve la generación de memoria inmunológica en la inflamación intestinal.....	88
5.2. Gal-4 se une preferencialmente a oligosacáridos $\alpha(1,2)$ -fucosilados tipo grupo sanguíneo, que están presentes en la superficie de microbios.....	91
5.3. Gal-4 se une a las células de Paneth.....	93
5.4. El balance entre los niveles intracelulares y extracelulares de Gal-4 es importante para la promoción de la regeneración epitelial.....	95
6 Reflexiones finales.....	98
7 Referencias.....	101
Lista de Figuras.....	122
Lista de Tablas.....	130

1 Introducción

1.1. Colitis ulcerosa: una enfermedad inflamatoria intestinal

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria crónica, remitente y recurrente, caracterizada por periodos de remisión y recaída (Berre, Honap, y Peyrin-Biroulet 2023). Esta enfermedad inflamatoria intestinal (EII), a diferencia de la enfermedad de Crohn (EC), afecta principalmente el colon (**Figura 1a,b**). El pico de incidencia de la CU es entre los 20 y 40 años y presenta diversas secuelas y comorbilidades, afectando severamente la calidad de vida de los pacientes (Berre et al. 2023). Esta patología se caracteriza por presencia de sangre en las heces, trastornos intestinales como constipación severa o diarrea y cólicos dependiendo del área afectada, y en casos severos se pueden presentar además síntomas sistémicos como fiebre y taquicardia. Adicionalmente, pueden presentarse diversas manifestaciones extraintestinales (**Figura 1c**) (Berre et al. 2023). El riesgo de desarrollar cáncer colorrectal asociado a colitis (CCRAC) aumenta con la extensión y duración del proceso inflamatorio (Shah y Itzkowitz 2022; Zhou et al. 2023).

En el siglo XXI, las EII se han convertido en un problema de salud global, con una incidencia acelerada en países recientemente industrializados (Ng et al. 2017). En 2023 se reportó que la prevalencia de la CU era de 5 millones de casos en todo el mundo (Berre et al. 2023). Mientras que en los países industrializados occidentales la incidencia se ha estabilizado, se estima que en aquellos en proceso de industrialización la prevalencia alcanzará niveles similares a los de los países desarrollados en la próxima década (Kaplan y Windsor 2021).

La colitis ulcerosa resulta de diversos factores genéticos, inmunológicos, microbiológicos y ambientales (Jostins et al. 2012; Lerner y Matthias 2015). La hipótesis etiopatogénica más aceptada vincula la CU con disfunción epitelial y mecanismos defectuosos de tolerancia inmunológica, que generan respuestas exacerbadas contra la microbiota intestinal y daño tisular (Chang 2020; Berre et al. 2023). En particular, la barrera epitelial

ha tomado mucha relevancia en los últimos años, con disfunción mitocondrial y cambios asociados en las funciones epiteliales intestinales como un evento temprano en la patogénesis de CU, precediendo a las aberraciones inflamatorias del tejido (Rath y Haller 2022). En particular, la función mitocondrial deteriorada en las células epiteliales intestinales está asociada con una reducción de la pluripotencia y disfunción de las células de Paneth (Rath y Haller 2022), un subtipo especializado de célula epitelial secretoria localizado en la cripta intestinal (Allaire et al. 2018). En síntesis, comprender los mecanismos asociados a esta enfermedad es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que permitan mejorar el manejo clínico de los pacientes con CU.

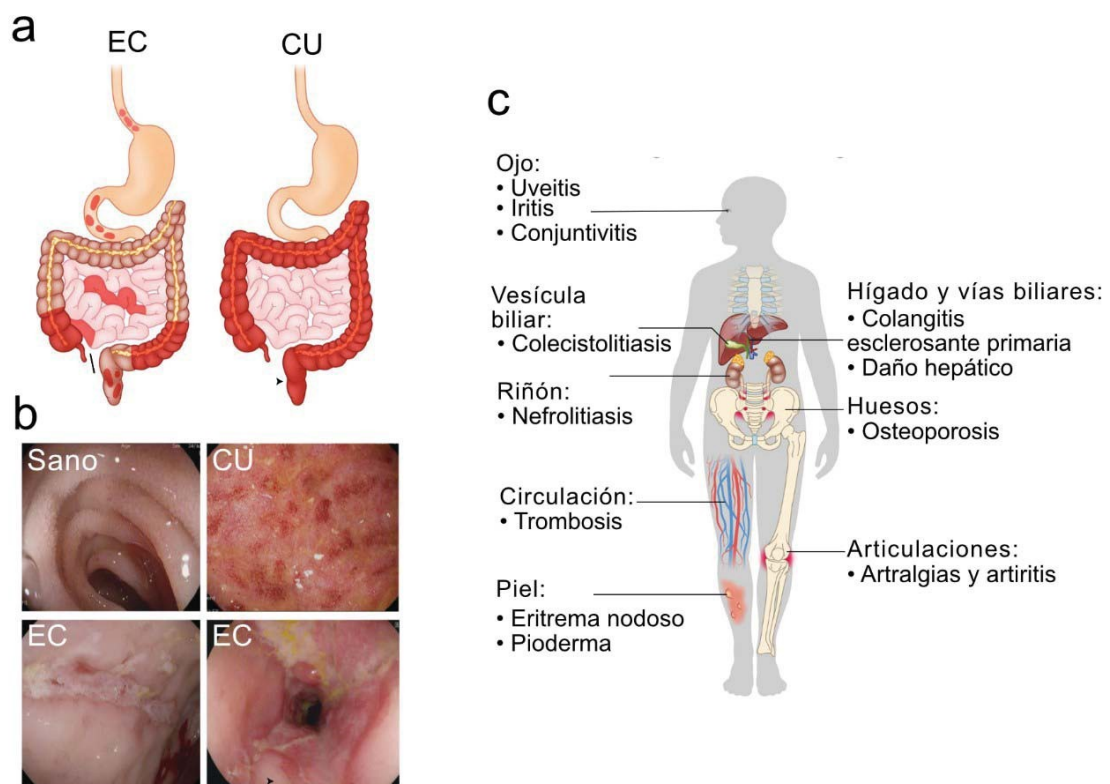


Figura 1. Características clínicas de la EII. (a) La inflamación en la EC (izquierda) presenta un patrón segmentado y afecta con frecuencia al íleon terminal (flecha). En contraste, la CU (derecha) suele afectar al recto (flecha) y pudiendo evolucionar hacia la inflamación de todo el colon. (b) Características endoscópicas de la CU (arriba a la derecha) y EC (fila inferior) en comparación con intestino sano (arriba a la izquierda): se observan erosiones y sangrado, úlceras grandes y úlceras con estenosis. (c) Manifestaciones extraintestinales de las EII (Neurath 2019)

1.1.1. Factores genéticos y ambientales en la patogénesis de la CU

Los estudios de asociación del genoma (GWAS, por sus siglas en inglés, *genome wide association studies*) han identificado al menos 320 *loci* asociados al riesgo de desarrollar

EII (Fachal 2024). La mayoría de estos presentan baja penetrancia, excepto en los casos de enfermedad de inicio muy temprano (*Very early onset*), donde pueden observarse formas monogénicas con herencia mendeliana, como las mutaciones en el receptor de IL- 10 (Batura & Muise, 2018).

Los genes identificados en estos estudios se han asociado a vías relacionadas con el censado de microbios (*NOD2, CARD9, MEFV, IFIH1, RIPK2, FCGR2A, TNFAIP3, LRRK2,*

LACC1, NCF4, NOS2, ATG16L1), integridad de la barrera epitelial (*C1ORF106, RNF186, AHR, RSPO3, HGFAC, MST1, HNF4A, PLA2G4A, PTGER4*), inmunidad adaptativa (*HLA locus, PRDM1, BACH2, IL2RA, RASGRP1, CD28, FCGR2A, IFNG, PTPN22, STAT4*),

inflamación y fibrosis (*OSMR, SMAD3, TAB2, IL6ST*), estrés celular, autofagia y apoptosis/necroptosis (*ATG16L1, TMEM258, SDF2L1, KEAP1, IRGM, RIPK1*), vías relacionadas con el inflamosoma (*MEFV, NLRP7, NLRC4, IL18RAP*), y vías de regulación de citoquinas (*IL6ST, IL12B, IL23R, TYK2, RORC, IL17RA, TRAF3IP2, CEBPB, GPR65*)

(Graham & Xavier, 2020). En particular, se ha demostrado que en CU el compartimento epitelial juega un papel esencial, ya que se ha postulado que la injuria metabólica epitelial precede a la inflamación (Rath y Haller 2022).

Notablemente, y dado que los estudios genéticos pueden explicar parcialmente la heredabilidad de la enfermedad, se ha descrito a esta patología como multifactorial, con factores ambientales y relacionados a la microbiota como claves en la inflamación intestinal (Fakhoury et al. 2014). Entre los diversos componentes del estilo de vida moderno, varios han surgido como modificadores de la inmunidad sistémica e intestinal, incluyendo la microbiota, el uso de antibióticos, la dieta y la vitamina D. En particular, la exposición repetida a antibióticos ha sido asociada con un mayor riesgo de EII (Faye et al. 2023) y los episodios de gastroenteritis en adultos como desencadenantes de la inflamación intestinal (Mann y Saeed 2012). Notablemente, se ha demostrado que la combinación de antibióticos y una dieta alta en grasas aumenta el riesgo de pre-EII (entendida como la intersección entre síndrome de colon irritable y enfermedades inflamatorias intestinales), al afectar conjuntamente la función mitocondrial del epitelio intestinal y provocar alteraciones en la microbiota que exacerban la inflamación (Lee et al. 2020).

1.1.2. Inmunopatogenia en las EII

Desde el punto de vista inmunológico, las interacciones óptimas entre el hospedador y la microbiota requieren de un balance entre señales estimuladoras y regulatorias, sin comprometer la capacidad del hospedador de tolerar antígenos inocuos (Belkaid y Hand 2014). No obstante, en las EII, se observa una respuesta inmunitaria innata y adaptativa sobreactivada, así como también una pérdida de tolerancia del sistema inmune de mucosas que contribuyen no sólo a la iniciación, sino también a la perpetuación de estas enfermedades. Luego de su activación, las células inmunes innatas y adaptativas producen una amplia variedad de citoquinas que regulan la inflamación intestinal. Entre

ellas, las citoquinas proinflamatorias, como las de la familia IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , IL-18, IL-33 e IL-36), IL-6 y TNF, desempeñan un papel clave en la perpetuación de la inflamación y el daño tisular (Neurath 2019). Se ha identificado una distribución diferencial de los subconjuntos de linfocitos T, con predominio de células Th1 (cuyo factor de transcripción es T-bet) y Th17 (ROR γ T) en la EC y células Th17 y Th2 (GATA3) junto con una mayor presencia de células TH9 (PU.1) en CU (Neurath 2019). En contraste, las citoquinas antiinflamatorias, IL-10, IL-22, IL-28 y TGF- β , desempeñan un papel esencial en la resolución de la inflamación y el mantenimiento de la función de barrera epitelial (Neurath 2019). Entre los múltiples factores involucrados, la presencia de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-13, IL-6 e IFN- γ pueden alterar la estructura y composición de las uniones estrechas formadas por claudinas, alterando la permeabilidad intestinal y causando diarrea (Martini et al. 2017). Los pacientes con EII suelen presentar una disfunción de la barrera intestinal, incluyendo defectos en el proceso de autofagia, la producción alterada de péptidos antimicrobianos y una capa de *mucus* defectuosa, por lo que el epitelio intestinal constituye un blanco terapéutico interesante, que no ha sido explorado en profundidad (Villablanca, Selin, y Hedin 2022; Syed et al. 2024).

1.1.2.1 El epitelio intestinal

Además de su función como barrera física, el epitelio intestinal (**Figura 2**) desempeña un papel activo en la inmunidad innata, de la cual participan diferentes tipos celulares, incluyendo células caliciformes, células de Paneth, células M y células de Tuft, entre otras.

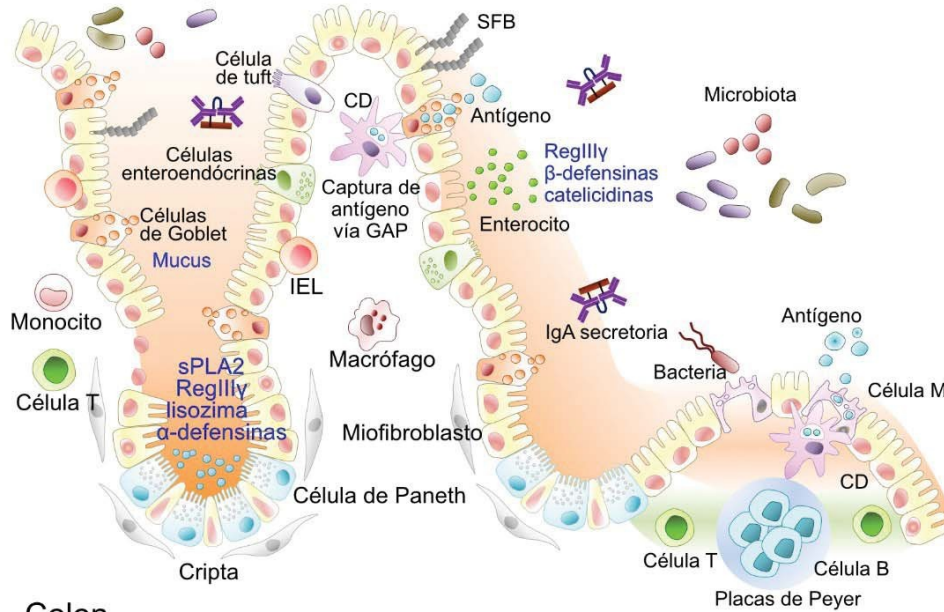
En este contexto, las células caliciformes (o de Goblet) secretan mucinas, proteínas altamente glicosiladas componentes clave del *mucus* intestinal, generando una primera línea de defensa (Brockhausen et al. 2022). Asimismo, estas células son capaces de participar en el transporte de antígenos lumbinales a través de GAPs (*goblet cell associated antigen passages*). En las EII, la reducción de células caliciformes es un hallazgo patológico frecuente (Pullan et al. 1994). La disminución en la secreción de mucinas puede contribuir directamente a la inflamación crónica, tal como lo demuestran estudios en ratones deficientes en la mucina Muc2, que desarrollan espontáneamente colitis crónica (Van der Sluis et al. 2006). Notablemente, y más allá de la alteración en la secreción de mucinas, se ha demostrado que su glicosilación aberrante también es característica de la enfermedad (Larsson et al. 2011).

Por otro lado, las células de Paneth combaten bacterias a través de la liberación de péptidos antimicrobianos como lisozima, defensinas (denominadas criptidinas en ratón), angiogenina-4, y fosfolipasa secretoria A2 (sPLA2) (Allaire et al. 2018). En homeostasis, las células Paneth se encuentran únicamente en el intestino delgado (ID), aunque se ha descrito metaplasia en colon en EII (Tanaka et al. 2001). Además, estas células están localizadas en estrecha proximidad al nicho de las células madre intestinales, y son capaces de secretar Wnt, EGF (factor de crecimiento epidérmico) y Notch, desempeñando un papel clave en el mantenimiento de las células madres (Sato et al. 2011). En EII se ha

reportado que la funcionalidad de las Paneth está alterada por estas patologías (Khaloian et al. 2020). De manera interesante, algunos de los genes asociados las EII, como *VDR*, *ATG16L1* y *NOD2*, participan en la regulación de la autofagia en las células de Paneth (Cadwell et al. 2008; Deretic, Master, y Singh 2008).

Las células M, también presentes únicamente en el ID, se localizan en la proximidad de los folículos linfoides (denominados placas de Peyer) y participan en la captación y transporte de antígenos (Mabbott et al. 2013). Las células de Tuft, por su parte, cumplen funciones en la defensa contra parásitos y en la reparación inmunitaria (Schneider, O'Leary, y Locksley 2019).

a Intestino delgado



b Colon

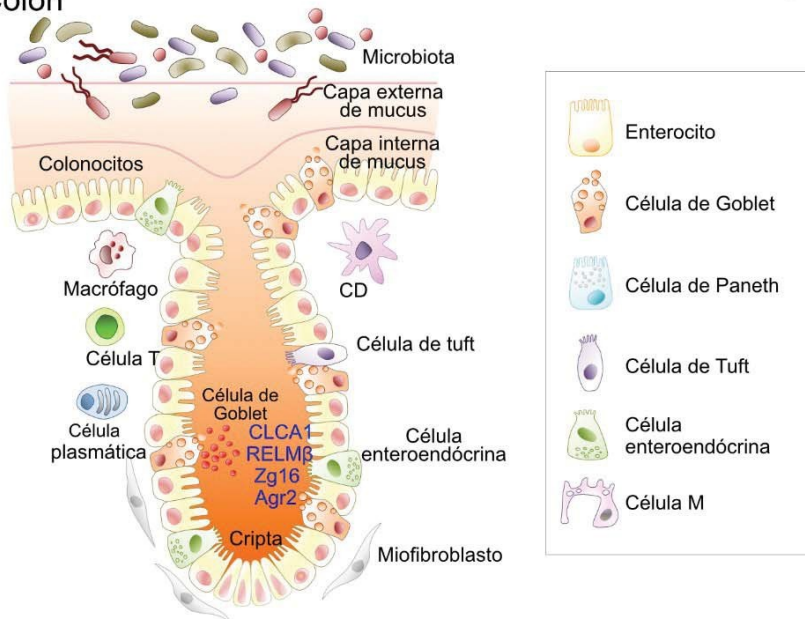


Figura 2. Composición y arquitectura del epitelio. (a) Esquema representativo del epitelio del intestino delgado. Los enterocitos constituyen el tipo celular predominante en el eje cripta-vellosidad y son capaces de secretar péptidos antimicrobianos (RegIIIy, β -defensinas, catelicidina). Las células de Paneth, en la base de la cripta, producen péptidos antimicrobianos específicos (lisozima, α -defensinas, sPLA2). Las células M se localizan en el epitelio asociado a los folículos (FAE) que recubre las placas de Peyer y participan en la captación y el transporte de antígenos. Además, las células caliciformes facilitan la transferencia de antígenos luminales a las células dendríticas a través de los pasajes de antígenos asociados a células caliciformes (GAPs) (b) Esquema representativo del epitelio del colon. Los colonocitos y las células caliciformes son los principales tipos celulares de la cripta colónica. Las células caliciformes son responsables de la formación de la capa de moco externa e interna mediante la secreción de mucina MUC2, así como de otras proteínas (AGR2, ZG16, CCLA1, RELM β) asociadas con esta barrera protectora. CD: célula dendrítica. IEL: linfocito intraepitelial. (Allaire et al. 2018)

1.1.2.1 Las células de la inmunidad

Como consecuencia del proceso inflamatorio y el daño y disrupción de la barrera epitelial, componentes lumenales son capaces de translocar hacia la lámina propia intestinal (**Figura 3**) (Martini et al. 2017). Las células del sistema innato reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), lo que lleva a la producción de citoquinas y quimioquinas. A su vez, esto da lugar al reclutamiento de células inmunes desde la sangre periférica, principalmente a la infiltración de neutrófilos en la mucosa y el epitelio, uno de los primeros signos de inflamación que persiste mientras la inflamación siga activa (de Souza y Fiocchi 2016). Los neutrófilos contribuyen a la patogénesis mediante mecanismos como el aumento de la permeabilidad de la barrera intestinal, el daño tisular oxidativo y proteolítico, y la liberación de mediadores inflamatorios (de Souza y Fiocchi 2016). Además, favorecen el reclutamiento de monocitos CD14⁺ desde la sangre, los cuales, en el contexto inflamatorio, no completan su diferenciación a macrófagos, acumulándose en la lámina propia en un estado intermedio de maduración (Jones et al. 2018). Estos monocitos inmaduros retienen un perfil proinflamatorio y secretan citoquinas como IL-6, IL-12, IL-23, IL-1 β y TNF, promoviendo la diferenciación de linfocitos T hacia perfiles proinflamatorios Th1 y Th17, lo que intensifica la inflamación y el daño tisular (Na et al. 2019) (**Figura 3**).

Asimismo, el factor de necrosis tumoral (TNF) juega un rol central en la inflamación intestinal, siendo producido por diversas células inmunitarias y no inmunitarias, como monocitos inflamatorios, macrófagos, linfocitos T, células dendríticas y fibroblastos (Neurath 2014). Esta citoquina tiene múltiples efectos en la pared intestinal, incluyendo el aumento de la angiogénesis en el colon, la activación de macrófagos para producir más citoquinas proinflamatorias, la inducción de necroptosis en las células de Paneth, el aumento de la apoptosis epitelial y la regulación de la actividad de metaloproteinasas, contribuyendo al daño tisular (Neurath 2019). Además, la inflamación promueve la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio vascular de la mucosa, como MAdCAM-1, que al interactuar con la integrina $\alpha 4\beta 7$, facilita la migración y retención de células inmunitarias en el tejido inflamado, perpetuando la respuesta inflamatoria (Lamb et al. 2018).

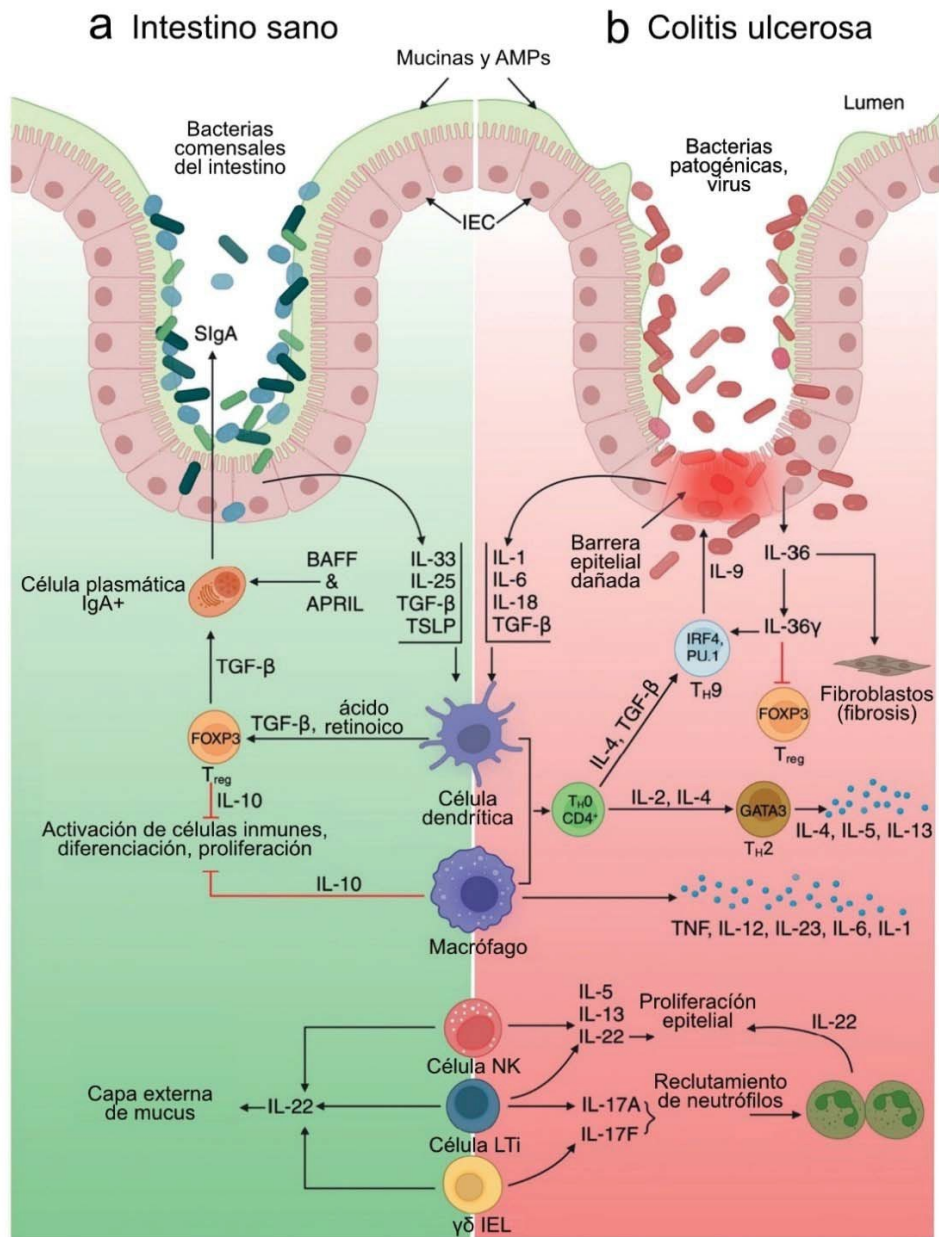


Figura 3. Circuitos inmunológicos en colitis ulcerosa. (a) En presencia de una microbiota comensal equilibrada, las células epiteliales intestinales secretan mucinas y péptido antimicrobianos (AMPs), y los PAMPs inducen la secreción de citoquinas epiteliales (TSLP, IL-33, IL-25 y TGF- β) que promueven el desarrollo de células dendríticas y macrófagos tolerogénicos. A su vez, las células dendríticas, inducen el desarrollo de linfocitos T regulatorios inducibles (iT_{reg}) a través de procesos dependientes de TGF- β . Además, TGF- β derivado de linfocitos T_{regs}, así como BAFF (Factor activador de célula B) y APRIL derivados del epitelio promueven la generación de células plasmáticas productoras de IgA (CPs IgA⁺). A través de mecanismos adicionales, incluida la secreción de TGF- β e IL-10 por las células iT_{reg} y la secreción de IL-10 por los macrófagos, se induce y mantiene el estado fisiológico de tolerancia. (b) En colitis ulcerosa se observa una microbiota alterada en su composición; los PAMPs estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 e IL-18 de células epiteliales e IL-6, IL-12 e IL-23 de células dendríticas y macrófagos/monocitos) que inducen desarrollo de células T CD4⁺ efectoras (Th1 y Th17). Dependiendo de la citoquina, se generan linfocitos Th2 o Th9, estos últimos son esenciales en el deterioro la función de barrera epitelial. Células linfoides innatas intestinales, que incluyen las células NK-like (del inglés *Natural killer-like*), las células inductoras de tejido linfoide (LTi) y los $\gamma\delta$ IEL (linfocitos intraepiteliales) responden a la regulación positiva de las citoquinas proinflamatorias IL-22 (que protege la barrera epitelial), IL-17A e IL-17F (que reclutan neutrófilos para promover la inflamación y la proliferación epitelial mediada por IL-22) (Wangchuk, Yeshi, y Loukas 2024).

Los linfocitos T son esenciales en la respuesta inmune adaptativa contra patógenos. Al ser activados por una célula presentadora de antígeno (APC), los linfocitos T naïve se convierten en células efectoras, que migran al sitio de infección (**Figura 4**). Algunas de estas células se transforman en linfocitos T de memoria, que pueden ser de memoria central (T_{CM}) o de memoria efectora (T_{EM}). Las T_{CM} patrullan los órganos linfoides y responden rápidamente a una segunda exposición al antígeno, mientras que las T_{EM}, ubicadas en tejidos infectados no proliferan, pero responden rápidamente. Las T_{CM} se caracterizan por los marcadores CD62L, CCR7 y CD45RO, mientras que las T_{EM} carecen de CD62L y CCR7, y tienen un alto nivel de CD44. Además, los linfocitos T residentes en tejidos (T_{RM}) se quedan en los tejidos, donde expresan CD103, CD69 y CD44^{high}, lo que facilita su retención. Los linfocitos T reguladores (T_{reg}) son fundamentales para mantener la tolerancia inmune y prevenir enfermedades autoinmunes, y se identifican por los marcadores CD4⁺, CD25⁺ y FOXP3, que son cruciales para su función inmunosupresora (Schenkel y Masopust 2014; Raphael, Joern, y Forsthuber 2020).

Se ha demostrado que los linfocitos T de la lámina propia de pacientes con CU producen las citoquinas IL-5 e IL-13, características de la respuesta Th2 (Neurath 2014). También existe una alta expresión de citoquinas asociadas a respuesta Th17, como IL-17A e IL-17F, por parte de linfocitos T de lámina propia (Neurath 2014). Funcionalmente, las citoquinas IL-17 e IL-21, producidas por linfocitos Th17, promueven el reclutamiento de neutrófilos y la secreción de metaloproteinasas por parte de fibroblastos intestinales, que producen daño tisular (de Souza y Fiocchi 2016). Sin embargo, IL-17 e IL-22 también pueden mediar respuestas protectoras, como estimular la proliferación epitelial, reparación de heridas, y la producción de péptidos antimicrobianos (de Souza y Fiocchi 2016; Zhao et al. 2023).

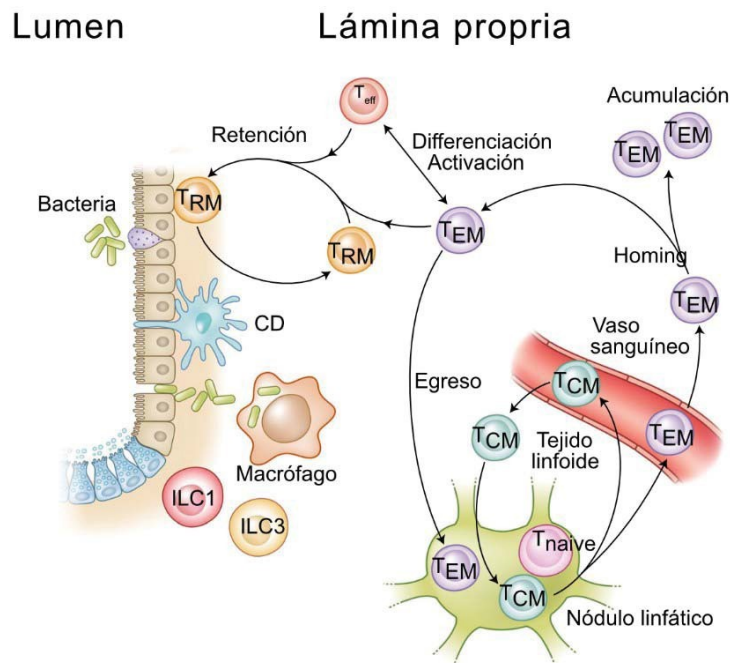


Figura 4. Activación y tráfico de linfocitos T en EII. A diferencia de los linfocitos T de memoria central (T_{CM}), los linfocitos T de memoria efectora (T_{EM}) reingresan al tejido intestinal mediante mecanismos específicos de migración al epitelio, lo que lleva a su acumulación en EII. Los linfocitos T_{EM} pueden diferenciarse en linfocitos T efectora (T_{Eff}), que causan daño tisular, o en linfocitos T de memoria residente en tejidos (T_{RM}), que permanecen de manera permanente en el tejido. En el contexto de la EII, los linfocitos T_{EM} , T_{Eff} y T_{RM} contribuyen a la inflamación junto con células inmunitarias locales, como macrófagos, células dendríticas (DCs) y células linfoides innatas (ILCs) (Neurath 2019).

1.1.3. Tratamiento de las EII

Dado que aún no existe una cura para la EII, el tratamiento de los pacientes se centra en lograr la cicatrización de la mucosa, prevenir la recaída de la enfermedad y evitar complicaciones, apuntando a mantener una remisión duradera como criterio de valoración basado en la inmunorregulación. Los tratamientos disponibles para estas enfermedades incluyen la administración de inmunosupresores sistémicos con severos efectos colaterales (ej. prednisolona, sulfasalazina) y anticuerpos monoclonales contra TNF- α (Berre et al. 2023). Además, y debido a la relevancia del tráfico de leucocitos en estas enfermedades, las terapias biológicas dirigidas al tráfico selectivo intestinal han demostrado una alta eficacia, incluidos los anticuerpos anti-integrina $\alpha 4\beta 7$, que mejoran considerablemente el manejo de la EII; sin embargo, estos tratamientos tienen varias limitaciones, incluyendo resistencia primaria y secundaria, y efectos secundarios importantes (Mitrev, Vande Casteele, y Seow 2017; Paramsothy et al. 2018). En los últimos diez años, la necesidad de opciones terapéuticas alternativas llevó al desarrollo de otros productos biológicos como los antagonistas de IL-12 e IL-23, pero también de

moléculas pequeñas, como los inhibidores de la tirosina quinasa Janus (JAK) y la esfingosina 1-fosfato (Singh 2023). Asimismo se encuentra en ensayos clínicos el uso de agonistas de IL-22, antagonistas de integrinas, inhibidores de Smad7 (involucrada en la vía de TGF β), inhibidores de la citoquina similar al TNF 1A (TL1A), y moduladores de ácidos grasos (Wangchuk et al. 2024).

Por todas estas razones, resulta fundamental continuar el estudio de la fisiopatología de las EI, de modo de identificar nuevos blancos terapéuticos, y desarrollar tratamientos más efectivos y personalizados (Syed et al. 2024).

1.2. La glicobiología de la respuesta inmune

Los glicoconjugados, macromoléculas conformadas por carbohidratos unidos a lípidos o proteínas son componentes centrales de la membrana celular (**Figura 5**). La porción glicosídica, frecuentemente denominada glicano, es inherentemente compleja ya que su biosíntesis (a diferencia de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas) no presenta un molde a seguir (Reily et al. 2019). La glicosilación de proteínas y lípidos ocurre en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi en una serie de pasos estrictamente regulados por la disponibilidad de sustratos, la actividad enzimática, los niveles de transcripción génica y la localización enzimática (Reily et al. 2019).

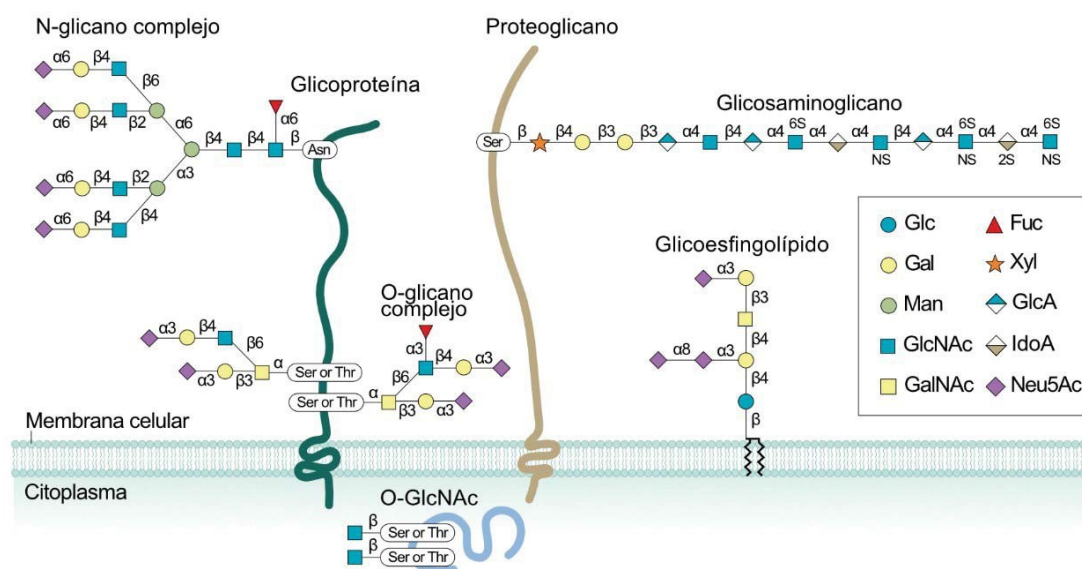


Figura 5. Diversidad estructural de glicoconjugados. Las glicoproteínas se caracterizan por la sustitución de residuos de Asn y Ser/Thr por N- y O-glicanos, respectivamente. Los N-glicanos se unen a un motivo de glicosilación consensuado Asn-X-Ser/Thr (donde X denota cualquier aminoácido excepto Pro), y consisten en un glicano core o núcleo que contiene dos residuos de GlcNAc y tres residuos de manosa (Man), sustituido solo por manosa (alta manosa) o por lactosaminas (complejos). En la O-glicosilación de tipo mucina (O- GalNAc), la N-acetilgalactosamina inicial se extiende formando diversas estructuras núcleo y elongadas con residuos de lactosamina. Los glicosaminoglicanos pueden aparecer como componentes de la matriz

extracelular (ej. hialuronano), o como parte de proteoglicanos donde se unen a proteínas en los motivos Ser- Gly-X-Gly. Los glicolípidos son componentes clave de la membrana celular. IdoA, ácido idurónico. Fuc, fucosa; Gal, galactosa; GalNAc, N-acetilgalactosamina; Glc, glucosa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; IdoA, ácido idurónico; Man, manosa; NXS/T, asparagina-X-serina o treonina; Rib, ribosa; Sia, ácido siálico; Xyl, xilosa. (Kudelka et al. 2020; Stanley 2024)

En particular, la glicosilación de proteínas puede dar lugar a N-glicanos (en los cuales una estructura *core* de $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ se encuentra unida específicamente a motivos Asn-X- Ser/Thr), y a O-glicanos de tipo mucina, que se forman a partir de la unión de una *N*- acetilgalactosamina (GalNAc) a un residuo de serina o treonina (**Figura 5**) (Varki y Kornfeld 2022). Esta modificación postraducciona es producida por la actividad combinada de glicosiltransferasas y glicosidasas altamente específicas (Rini et al. 2022). Además, estos glicanos de estructura dinámica y variable pueden sufrir otras modificaciones tales como sialilación, fucosilación y/o sulfatación, confiriéndoles una mayor diversidad y versatilidad. La sulfatación es particularmente relevante en las mucinas del intestino, ya que los O-glicanos sulfatados en estas proteínas son nutrientes para comunidades bacterianas que co-evolucionaron con el huésped (Luis et al. 2022).

El conjunto de glicanos expuestos en la superficie celular, definidos por la maquinaria biosintética de cada célula y el conjunto de factores ambientales a los que la misma está sometida resulta en el glicoma celular. Este perfil de glicanos es altamente relevante a la funcionalidad de la célula, y puede mediar diferentes procesos fisiopatológicos, incluyendo la modulación de la respuesta inmune (Smith y Bertozzi 2021; Mariño et al. 2023). Se ha demostrado que el perfil de glicosilación de células inmunitarias puede cambiar de forma drástica en respuesta a procesos tanto fisiológicos como patológicos; en particular, el estudio de circuitos inmunológicos mediados por glicanos en enfermedades inflamatorias intestinales ha cobrado relevancia en los últimos años (Toscano et al. 2018; Brazil y Parkos 2022).

La interpretación de la información proporcionada en la estructura del glicoma (y su potencial alteración) se procesa biológicamente a partir de la interacción con lectinas, proteínas con afinidad por carbohidratos (Smith y Bertozzi, 2021; Mariño et al, 2023). Existen diferentes tipos de lectinas, entre las que se encuentran las lectinas de tipo C (CLRs), siglecs y galectinas como las de mayor relevancia a nivel inmunológico (Smith y Bertozzi, 2021; Mariño et al, 2023). Notablemente, la estructura, el número y la densidad de los epítopes de glicanos en glicoproteínas multivalentes determinan en conjunto la avidez de las interacciones lectinas-glicanos, confiriendo versatilidad y dinamismo en las respuestas biológicas a la interacción (Cummings, Liu, y Vasta 2015).

En las últimas décadas, se ha demostrado que los circuitos glicobiológicos desempeñan un papel crucial en diversas condiciones fisiopatológicas. En consecuencia, los agentes terapéuticos basados en circuitos glicobiológicos están siendo trasladados a la clínica (Smith y Bertozzi, 2021; Mariño et al, 2023).

1.2.1. La glicosilación en las EII

En general, las EII se asocian con un O-glicoma simplificado y aberrante, caracterizado por un aumento en los niveles de O-glicanos truncados, como los antígenos T, Tn y STn (**Figura 6**) (Kudelka et al. 2020). Además, la inflamación induce un aumento en la sialilación, junto con una disminución en la fucosilación, sulfatación y en los antígenos Sd^a y Cad (estos últimos, particularmente en CU). También se han detectado niveles variables de antígenos de Lewis, con un incremento de sialyl-Lewis^a (también conocido como CA19-9) y una disminución de sulfo-Lewis^{a/x}, lo que se asoció a la alteración en la sulfatación (Kudelka et al. 2020). En tanto, se ha reportado que la alteración en la glicosilación por efecto de la inflamación intestinal también se observa en suero de pacientes con EII: los N-glicanos en glicoproteínas secretadas intestinales, inmunoglobulinas y proteínas de fase aguda presentan una disminución en las estructuras híbridas y de alta manosa, una reducción en la fucosilación y galactosilación, y un incremento en la sialilación (Kudelka et al. 2020).

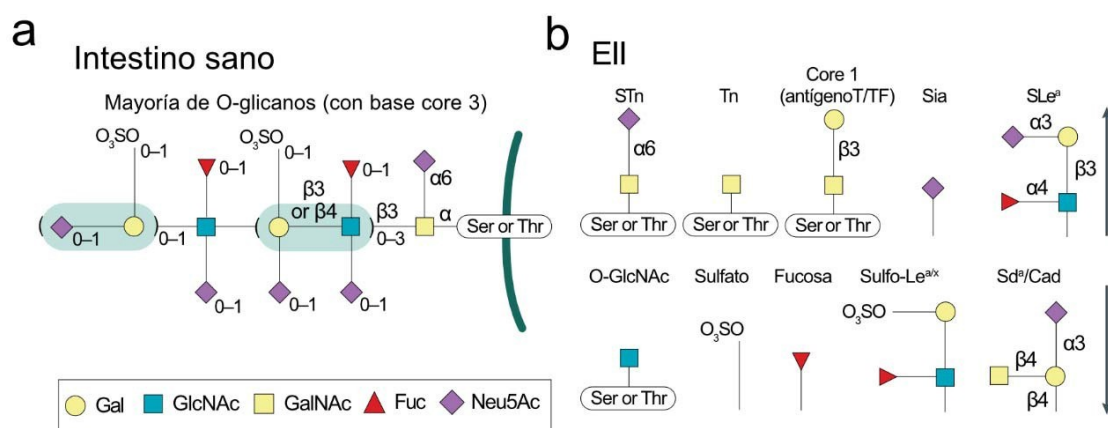


Figura 6. Estructuras de glicanos alteradas en la EII. Se representan los principales O-glicanos (a) en intestino sano (b) descriptos como parte de las alteraciones observadas en EII (Kudelka et al. 2020).

Los estudios que intentan dilucidar el rol de los glicanos en las EII han puesto su foco en el estudio de los patrones de glicosilación del epitelio intestinal, de mucinas intestinales, IgG sérica, neutrófilos y linfocitos T (**Figura 7**) (Brazil y Parkos 2022).

Por ejemplo, estudios de GWAS han identificado asociaciones entre la susceptibilidad las EII y polimorfismos en las $\alpha(1,2)$ fucosiltransferasas (FUT1 y FUT2) (Hu et al. 2022; Sazonovs et al. 2022). Estas enzimas catalizan la adición de fucosa $\alpha(1,2)$ a residuos de galactosa en los antígenos del grupo sanguíneo AB0; notablemente, esta forma de fucosilación es además la más predominante en intestino de humano y de ratón, y tiene funciones relevantes en conexión con la composición de la microbiota intestinal, reduciendo la colonización de bacterias oportunistas patogénicas y promoviendo el crecimiento de bacterias comensales (Brazil y Parkos 2022). Al ser expresadas en el

epitelio, estas estructuras fucosiladas funcionan como sitios de unión y fuente de carbono para la microbiota (Pacheco et al. 2012; Shirato et al. 2008). Por otro lado, el excesivo reclutamiento de neutrófilos al epitelio está regulado por la interacción de las selectinas E y P del endotelio con glicanos sialyl-Lewis X (SLe^x) presentes en glicoproteínas de los neutrófilos, por lo que bloquear estas interacciones podría reducir esta migración (Kelm et al. 2020).

En cuanto a las mucinas, en las EII se ha descrito una O-glicosilación aberrante del mucus que recubre el epitelio intestinal, lo que podría alterar su funcionalidad, incrementando su degradación proteolítica (Luis et al. 2022). Con análisis histoquímicos pioneros reportando la disminución en la sulfatación de los O-glicanos de MUC2 en individuos con CU activa (Corfield et al. 1996), en los últimos años se han descrito diversas familias de sulfatasas en la microbiota intestinal (Luis et al. 2022), y la inducción de la sulfatación por microbiota (Kudelka et al., 2020), por lo que al igual que para la a(1,2) fucosilación, esta modificación de O-glicanos está íntimamente relacionada con la disbiosis. A nivel sistémico, se ha descrito una glicosilación aberrante de IgG en EII, con decrecimiento en la galactosilación y sialilación (Šimurina et al. 2018) y la aparición de anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA) agalactosilados con un perfil proinflamatorio que inclusive precede a la declaración de la enfermedad de Crohn (Gaifem et al. 2024).

Los linfocitos T CD4⁺ de memoria intestinales muestran en modelos experimentales un perfil de glicosilación alterado denominado "Glicoma Asociado a Colitis", caracterizado por la expresión de *core-1* O-glicanos, consecuencia de la disminución en la expresión de la *core-2* {3(1-6)-*N*-acetilglucosaminiltransferasa 1 (C2GNT1). Este glicoma es permisivo para el pegado de Galectina-4 y promueve la exacerbación de la inflamación pero no la inducción de colitis (Nishida et al. 2012). En tanto, la sialilación de linfocitos T CD8⁺ activados se ha demostrado alterada en el modelo experimental de colitis por ácido 2,4,6- trinitrobenzoilsulfónico (TNBS), con implicancias en los efectos inmunosupresores de Galectina-1 (Morosi et al. 2021). Finalmente, se ha demostrado la relevancia de la glicosilación del TCR en modelos experimentales de colitis, donde la fucosilación de *core* en N-glicanos es necesaria para la secreción de citoquinas proinflamatorias y la inducción de colitis; en pacientes con EII se ha observado un aumento de *core* fucosilación en N- glicanos del TCR en linfocitos T intestinales, mediada por la fucosiltransferasa 8 (FUT8), que correlaciona con mayor actividad endoscópica (Fujii et al. 2016). Finalmente, Pinho y colaboradores han descrito a través de una serie de trabajos la disminución de N- glicanos ramificados b(1,6) del TCR en colitis ulcerosa, una alteración estructural que disminuye el umbral de activación de estos linfocitos (Demetriou et al. 2001). Esta N-glicosilación aberrante del TCR es consecuencia de la disminución de la expresión de la GlcNAc-transferasa MGAT5, lo que ha llevado a postular la administración de GlcNAc como potencial terapia para colitis ulcerosa (Dias et al. 2014, 2018).

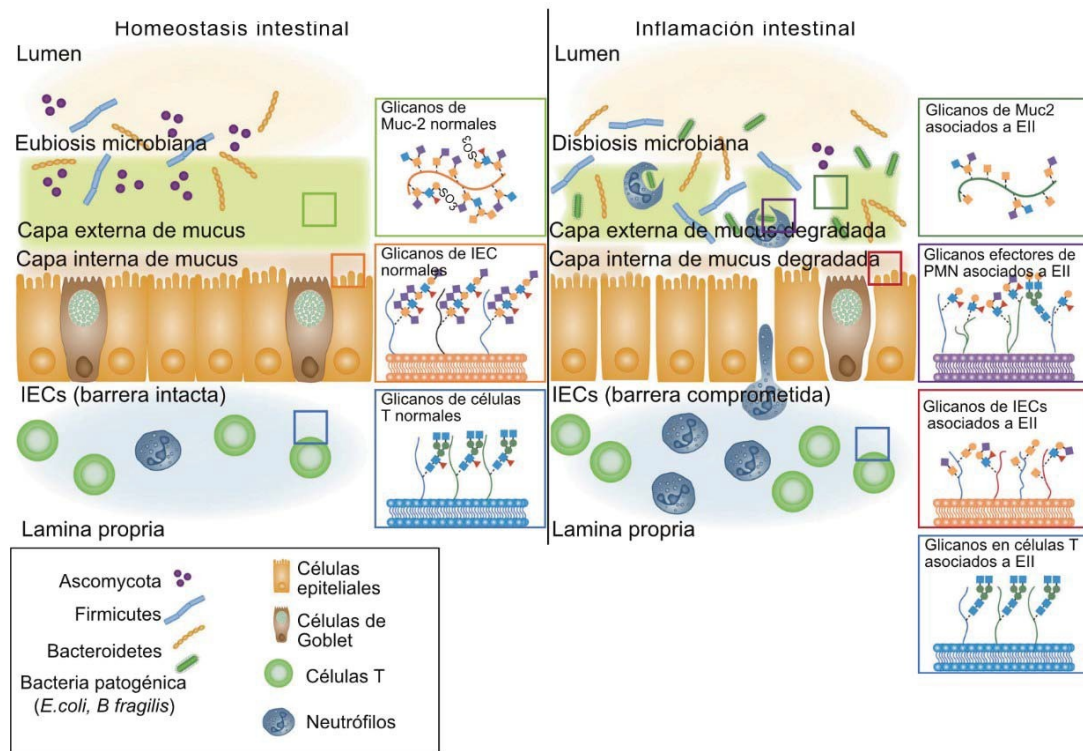


Figura 7. Esquema que muestra los cambios en la glicosilación durante la inflamación intestinal. El panel izquierdo muestra la homeostasis intestinal con capas de *mucus* intactas, eubiosis microbiana y expresión de glicanos maduros en la superficie. El panel derecho representa la inflamación intestinal con capas de *mucus* degradadas, sobrecrecimiento de bacterias patógenas, aumento del tráfico de PMN (neutrófilos) hacia el lumen y alteración de la expresión de glicanos en la superficie de las células epiteliales, células inmunitarias y mucinas intestinales (Brazil y Parkos 2022).

En síntesis, y si bien la importancia de la glicosilación en la inflamación intestinal ha sido ampliamente evidenciada y validada mediante tecnologías como la glicómica, la glicoproteómica y la secuenciación de ARN de células individuales (Kudelka et al. 2020; Brazil y Parkos 2022), el control y la regulación de la glicosilación siguen siendo áreas de investigación en desarrollo, por lo que agentes terapéuticos focalizados en la alteración del glicoma están aún lejos de llegar a la clínica. Dado que las consecuencias funcionales de un glicoma aberrante están muchas veces mediadas por su interacción con lectinas, y el estudio de estas proteínas (con roles jerárquicos en la biología celular y la inmunidad) está mucho más avanzado, lectinas de relevancia inmunológica, y en particular las galectinas representan dianas farmacológicas viables. Se ha demostrado que sus funciones pueden ser inhibidas mediante moléculas pequeñas o agentes biológicos, como anticuerpos monoclonales, con algunos de ellos ya en fases clínicas de investigación (Mariño et al. 2023).

1.3. Galectinas en EII

Las galectinas constituyen una familia evolutivamente conservada de lectinas caracterizadas por su estructura, su especificidad por glicanos y su capacidad para mediar diversas respuestas biológicas (Rabinovich et al. 2007; Troncoso et al. 2023). A diferencia de otras lectinas de relevancia inmunológica como las Siglecs o las lectinas tipo C, las galectinas son solubles y pueden encontrarse tanto en el espacio intracelular como extracelular (**Figura 8**). Inicialmente fueron descritas por su capacidad de reconocimiento de β -galactósidos y, desde entonces, se ha demostrado su papel en la modulación de interacciones célula-célula y célula-matriz, así como en la adhesión y señalización celular (Rabinovich 2023; Troncoso et al. 2023) desempeñando funciones clave en enfermedades neoplásicas, autoinmunes e inflamatorias crónicas (Toscano et al. 2018; Navarro et al. 2020; Cutine et al. 2021; Mariño et al. 2023).

Las galectinas se definen por la presencia de un dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC), una secuencia de consenso de aproximadamente 130 aminoácidos que adopta una estructura tridimensional globular compuesta por dos láminas β antiparalelas (Liu y Rabinovich 2005; Cummings et al. 2015; Johannes, Jacob, y Leffler 2018). Según su estructura, pueden clasificarse en tres subgrupos (**Figura 8**): las prototipo contienen un único DRC y capacidad de formar homodímeros (galectina-1, -2, -7, -10, -11, -13, -14, y -15); las tipo quimera, con un único DRC y un extremo N-terminal rico en prolina, glicina y tirosina, lo que permite su auto-oligomerización (galectina-3); y las de tipo tándem, con dos DRC en los extremos N- y C-terminales, conectados por una región peptídica flexible de entre 5 y más de 50 aminoácidos, susceptible de proteólisis (galectinas-4, -8, -9 y -12) (Cummings et al. 2015).

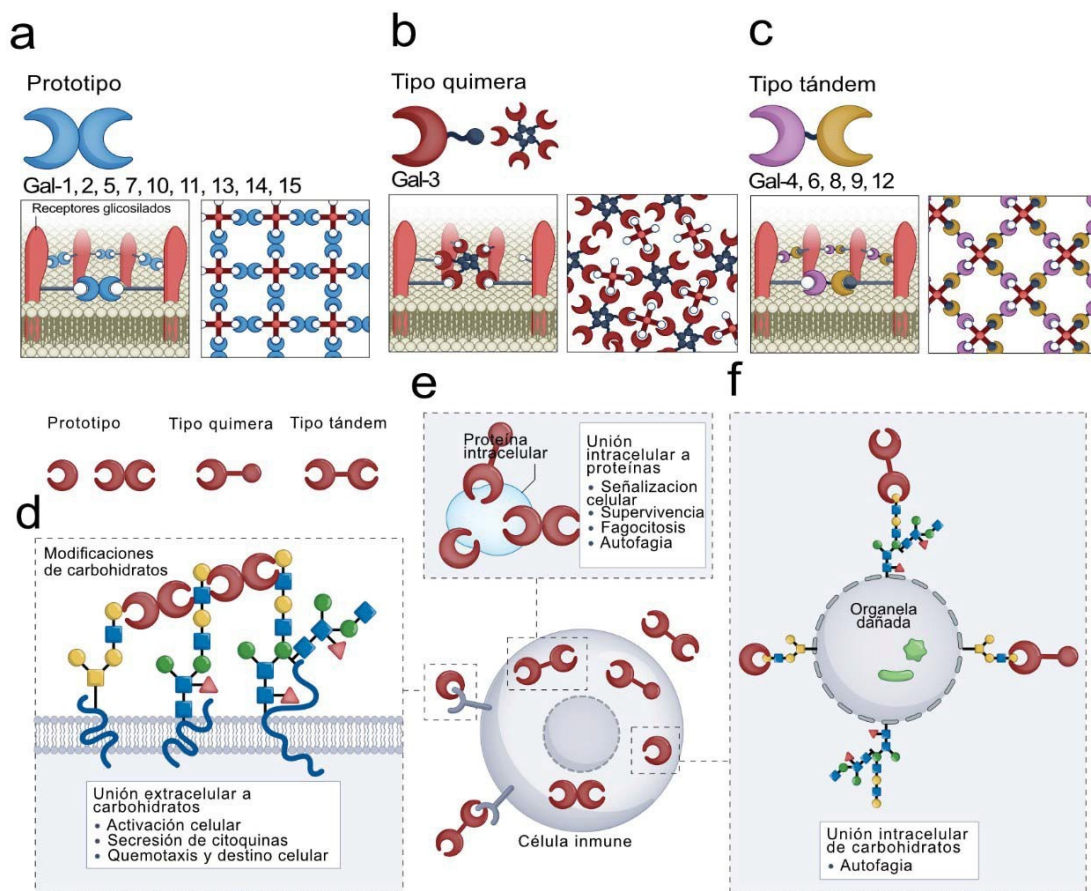


Figura 8. Las galectinas y sus funciones (a-c) Clasificación estructural de las galectinas. La naturaleza multivalente de las galectinas y el reconocimiento de residuos específicos en glicoconjugados de la membrana celular permiten la formación de estructuras macromoleculares complejas, denominadas *lattices*. **(d)** Las galectinas extracelulares pueden unirse a motivos comunes de glicanos que están presentes en la superficie de la mayoría de las células. Estas interacciones pueden ser alteradas durante procesos como la activación y diferenciación celular, e influyen sobre la secreción de citoquinas, la quimiotaxis y el destino celular. **(e)** Las galectinas se sintetizan y pueden ser secretadas o permanecer en el citosol, ya que carecen de una secuencia señal clásica, pero también pueden trasladarse al núcleo. Las galectinas citosólicas pueden influir en la señalización celular al unirse directamente a objetivos intracelulares, como BCL-2 y la proteína ALIX (*ALG2-interacting protein X*), a través de interacciones independientes de carbohidratos. Esto puede afectar la señalización celular, la supervivencia, la fagocitosis y la autofagia. **(f)** Las galectinas intracelulares también pueden unirse a glicanos expuestos tras el daño de organelas, lo que induce la autofagia (Liu y Stowell 2023; Mariño et al. 2023).

Los DRCs adoptan una estructura tipo β -sándwich, en la cual las láminas S1-S6 forman el lado cóncavo con el dominio de unión a azúcares, mientras que las láminas F1-F5 constituyen el lado convexo (Bum-Erdene et al. 2016; Modenutti et al. 2019). Estos dominios poseen cinco subsitios de unión, siendo los C y D los más conservados, mientras que los subsitios A, B y E varían, determinando la afinidad y especificidad de cada galectina (Bum-Erdene et al. 2016). La interacción de los DRCs con glicanos ocurre

mediante la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones de tipo van der Waals (Modenutti et al. 2019).

Dada la importancia de las interacciones galectina-glicanos en la regulación de la homeostasis y en el desarrollo de diversas patologías, el desarrollo de inhibidores selectivos de galectinas representa un campo prometedor en glicobiología aplicada a la biomedicina (Mariño et al. 2023). Se han descrito diversos tipos de inhibidores, incluyendo moléculas pequeñas, oligosacáridos, polisacáridos y glicomiméticos. Más recientemente, se han desarrollado anticuerpos monoclonales dirigidos contra galectinas, algunos de los cuales han alcanzado ensayos clínicos, en particular aquellos dirigidos contra Gal-9 (Mariño et al. 2023).

En el colon y recto humanos, Gal-1, -2, -3, -4, -8 y -9 se expresan en condiciones fisiológicas normales; y la desregulación de Gal-1, -3, -4 y -9 en enfermedades inflamatorias intestinales dio lugar a una firma que permite distinguir las EII de otras patologías intestinales (Papa Gobbi et al. 2016). En los últimos años, el conocimiento sobre el papel de las galectinas en la fisiopatología intestinal se ha incrementado considerablemente (Paclik, Berndt, et al. 2008; Muglia et al. 2011; Papa Gobbi et al. 2016; Muglia et al. 2016; Simovic Markovic et al. 2016; Sundblad et al. 2017; Morosi et al. 2021; Papa-Gobbi et al. 2021). En particular, Gal-1 presenta un efecto inmunomodulador en las EII. Al interactuar con enterocitos, es capaz de promover la producción de IL-10, IL-25 y TGF- β 1, protegiendo el epitelio intestinal en respuesta a la inflamación (Muglia et al. 2011, 2016). Además, el tratamiento con Gal-1 recombinante disminuye los síntomas de la colitis experimental murina inducida por TNBS al inducir apoptosis de linfocitos T CD4⁺ y reducir citoquinas proinflamatorias (Santucci et al. 2003), y provocar la apoptosis de linfocitos T CD8⁺ (Morosi et al. 2021). El papel de Gal-3, en cambio, es algo controvertido: algunos estudios reportaron un agravamiento de colitis aguda inducida por DSS en ratones deficientes en Gal-3 (*Lgals3*^{-/-}), mientras que otros encontraron un efecto protector (Simovic Markovic et al. 2016). En EII, también se han encontrado resultados contradictorios con respecto a la regulación de Gal-3 en el colon inflamado (Papa Gobbi et al. 2016; Simovic Markovic et al. 2016).

En cuanto a Gal-4, su rol en EII no ha sido esclarecido. En modelos experimentales se ha reportado que puede agravar la inflamación al promover la activación y supervivencia de linfocitos T CD4⁺ de memoria (Hokama et al. 2004; Nishida et al. 2012), mientras que su administración recombinante ha demostrado reducir la inflamación al inducir apoptosis en linfocitos T de mucosas y disminuir citoquinas proinflamatorias (Paclik, Danese, et al. 2008).

1.3.1. Galectina-4

Galectina-4 es una galectina tipo tándem, caracterizada por la presencia de dos DRCs en sus extremos N- y C-terminales (Gal-4N, Gal-4C), conectados por un péptido *linker*. La

influencia de este *linker* en la preferencia de unión a glicanos no está completamente elucidada (Bum-Erdene et al. 2015; Bum-Erdene et al. 2016; Quintana et al. 2021). A pesar de compartir solo un 49% de identidad de secuencia, ambos DRCs exhiben una selectividad oligosacáridica similar aunque con diferencias en la afinidad y especificidad (Bum-Erdene et al. 2015; Quintana et al. 2021, 2024; Cagnoni et al. 2024).

Debido a la complejidad de esta proteína, la caracterización biofísica y bioquímica de Gal- 4 ha sido mayormente abordada mediante la expresión recombinante de cada CRD por separado, ya que no se ha logrado obtener una estructura cristalina de la proteína completa. Estos estudios han revelado una alta afinidad por estructuras tipo antígenos de grupos sanguíneos, glicosfingolípidos 3-O-sulfatados y colesterol 3-sulfato (Stowell et al. 2010; Cao y Guo 2016; Cagnoni et al. 2024). Existe consenso en que Gal-4 reconoce con alta afinidad los grupos sanguíneos humanos A y B, con una preferencia mayor en su dominio C-terminal en comparación con el N-terminal (Ideo, Seko, y Yamashita 2005; Bum-Erdene et al. 2015; Bum-Erdene et al. 2016). Hasta la fecha, se han publicado estructuras cristalinas de Gal-4N unido a glicerol, lactosa (Lac), 2'-fucosilactosa (2'-FL), lactosa-3'-sulfato (3'SuL), mientras que Gal-4C se cristalizó unido a Lac, 3'SuL, 2'-FL, lacto-N-tetraosa (LNT) y lacto-N-neotetraosa (LNnT) (Bum-Erdene et al. 2016; Bum-Erdene et al. 2015). Si bien no constituye el ligando preferencial, se ha generado un modelo computacional de la estructura completa de Gal-4 unida a lactosa con el objetivo de evaluar el comportamiento de la proteína en presencia de un ligando (Rustiguel et al. 2016).

Gal-4 se expresa de manera específica y abundante en el epitelio intestinal, donde puede secretarse tanto por el lado apical como basolateral de las células epiteliales (Huflejt et al. 1997; Delacour et al. 2005). En pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), se ha observado una reducción significativa del ARNm de Gal-4 en biopsias de zonas inflamadas, con un patrón similar identificado mediante técnicas histoquímicas en CU, aunque con variabilidad interindividual (Block et al. 2016; Papa Gobbi et al. 2016). En suero de pacientes con EII, no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de Gal-4 (Yu et al. 2020).

Los efectos de Gal-4 en la inflamación intestinal dependen del modelo experimental, y su papel sobre los linfocitos T es aún controversial (**Figura 9**). En un modelo de colitis aguda inducida por DSS (3,5% durante 5 días, seguido de 5 días de recuperación), la administración de Gal-4 recombinante (2 mg en días 4 y 6) retardó la recuperación, mientras que el tratamiento con un anticuerpo anti-Gal-4 (1,5 mg en días 4, 5 y 6) favoreció la resolución del daño (Hokama et al. 2004). Esto sugiere un posible papel de Gal-4 en la exacerbación de la inflamación, aunque no en su inducción. En contraste, en un modelo de colitis experimental más severo (DSS 5% durante 8 días), la administración de Gal-4 (1 mg/kg, tres veces al día desde el día 0) promovió la recuperación de la colitis (Paclik, Danese, et al. 2008). En línea con este papel proresolutorio, también se ha reportado que Gal-4 se une a linfocitos T activados en la mucosa intestinal y la periferia, inhibiendo su

activación y proliferación mediante un mecanismo dependiente de carbohidratos, disminuyendo la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-17, y que favorece la apoptosis de linfocitos T de mucosa intestinal en inflamación aguda inducida por DSS (Paclik, Danese, et al. 2008). En este sentido, el perfil aberrante de glicosilación, denominado "Glicoma Asociado a Colitis", se ha detectado en diversos modelos de colitis, incluyendo colitis inducida por DSS, colitis espontánea en ratones TCR α -deficientes y colitis por transferencia adoptiva de linfocitos T (Nishida et al. 2012). La estimulación con Gal-4 recombinante de linfocitos T CD4⁺ provenientes de intestino inflamado, pero no de regiones no inflamadas, favoreció la producción de IL-6, una citoquina proinflamatoria (Hokama et al. 2004). Como se observó en modelos experimentales, los linfocitos T CD4⁺ de pacientes con EC y CU unen más Galectina-4 en zonas inflamadas, implicando que este glicoma asociado a colitis en las EII podría afectar sus funciones, particularmente mediante el pegado de Gal-4 (Nishida et al. 2012).

Más allá de su papel controversial en el compartimento T, se ha descrito que Gal-4 puede inhibir la migración de monocitos (Paclik et al. 2011) y más recientemente, que Gal-4 puede unirse a monocitos, promoviendo su supervivencia y regulando su activación y diferenciación a macrófagos (**Figura 9**) (Hong et al. 2019). En esta interacción, CD14, un receptor altamente glicosilado, desempeña un papel clave particularmente a través del N- glicano en Asn151 (Quintana et al. 2024). Por otro lado, Gal-4 también es capaz de unirse a macrófagos, y los sobrenadantes de macrófagos co-cultivados en presencia de Gal-4 restringen la activación de linfocitos T (Paclik et al. 2011).

Esta lectina también es altamente relevante en enterocitos, donde se demostró que Gal-4 participa en el tráfico de glicoproteínas hacia la membrana celular apical y en la estabilización de balsas lipídicas (*lipid rafts*) mediante su interacción con glicoproteínas y glicolípidos (**Figura 9**) (Delacour et al. 2005; Ideo et al. 2013). En particular, se ha sugerido una asociación funcional entre mucinas y Gal-4, observándose una mayor acumulación y un transporte deficiente de MUC1 en células depletadas para Gal-4 (Delacour et al. 2005).

Gal-4 también ha sido implicada en la cicatrización de heridas epiteliales intestinales (**Figura 9**) (Paclik, Lohse, et al. 2008), un proceso altamente relevante que se encuentra alterado en EII. Experimentos *in vitro* demostraron que Gal-4 promueve la cicatrización de heridas (Paclik, Lohse, et al. 2008), mientras que la reducción de la expresión endógena de Gal-4 en células HT29 se asoció con un incremento en la proliferación, migración y motilidad celular mediante las vías IL-6/NF- κ B/STAT3 (Satelli et al. 2011; Kim et al. 2013).

En particular, la estimulación con Gal-4 en cultivos monocapa de células Caco2 potencia la migración epitelial al unirse al complejo cadherina/catenina y promueve la progresión del ciclo celular mediante el aumento de la expresión de ciclina B1 (Paclik, Lohse, et al. 2008). Por otro lado, la sobreexpresión de Gal-4 endógena en células HCT116 inhibe la tumorigénesis a través de la vía Wnt/ β -catenina (Satelli et al. 2011), implicando a Galectina-4 en la proliferación y progresión del ciclo celular de células epiteliales.

Su actividad antibacteriana también ha sido foco de estudio: Gal-4 puede unirse a los antígenos de los grupos sanguíneos expresados por algunas bacterias en las cadenas laterales de sus lipopolisacáridos y a $\alpha(1,3)$ galactosa, presente en *E. coli* (Liu y Bevins 2010). Tras unirse a estos carbohidratos, Gal-4 puede destruir la integridad de la membrana y la motilidad de *E. coli* O86, llevándola a la muerte celular (Stowell et al. 2010). Como lectina capaz de unirse a glicolípidos, Gal-4 podría proteger el epitelio contra patógenos luminales que explotan las balsas lipídicas como portales de entrada al organismo (Ideo et al. 2013). En el citoplasma de las células epiteliales intestinales, Gal-4 encadena bacterias, restringe su motilidad y promueve la activación del inflamosoma (**Figura 9**). (Li et al. 2023). Estos resultados no sólo aplican a *Salmonella enterica* serovar Worthington, sino también a otras bacterias Gram-negativas como *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Providencia alcalifaciens*, *Klebsiella spp.* y *Proteus vulgaris*, ya que Gal-4 puede reconocer serotipos específicos de estas bacterias (Li et al. 2023).

Aunque el interés en la glicoinmunología, y en particular en la relevancia de Gal-4 en condiciones fisiológicas y patológicas está en franco aumento, no se han realizado estudios extensivos e integradores sobre el papel de esta lectina en la inflamación intestinal. Los datos contradictorios reportados en modelos de colitis podrían reflejar la compleja naturaleza de la inmunobiología del intestino, y su interacción dinámica con el microbioma, pero también podrían deberse a ciertas limitaciones técnicas, como: (a) las diferencias en los modelos usados, y (b) la dosis, la vía y el tiempo de administración de Gal-4. Por otro lado, los estudios funcionales sobre el papel de esta lectina en la biología celular epitelial, la respuesta inmune y la microbiota se han realizado en su mayoría *in vitro* (con líneas celulares o *ex vivo*), y solo recientemente se han publicado estudios *in vivo* en ratones que expresan Gal-4 humana (Li et al. 2023).

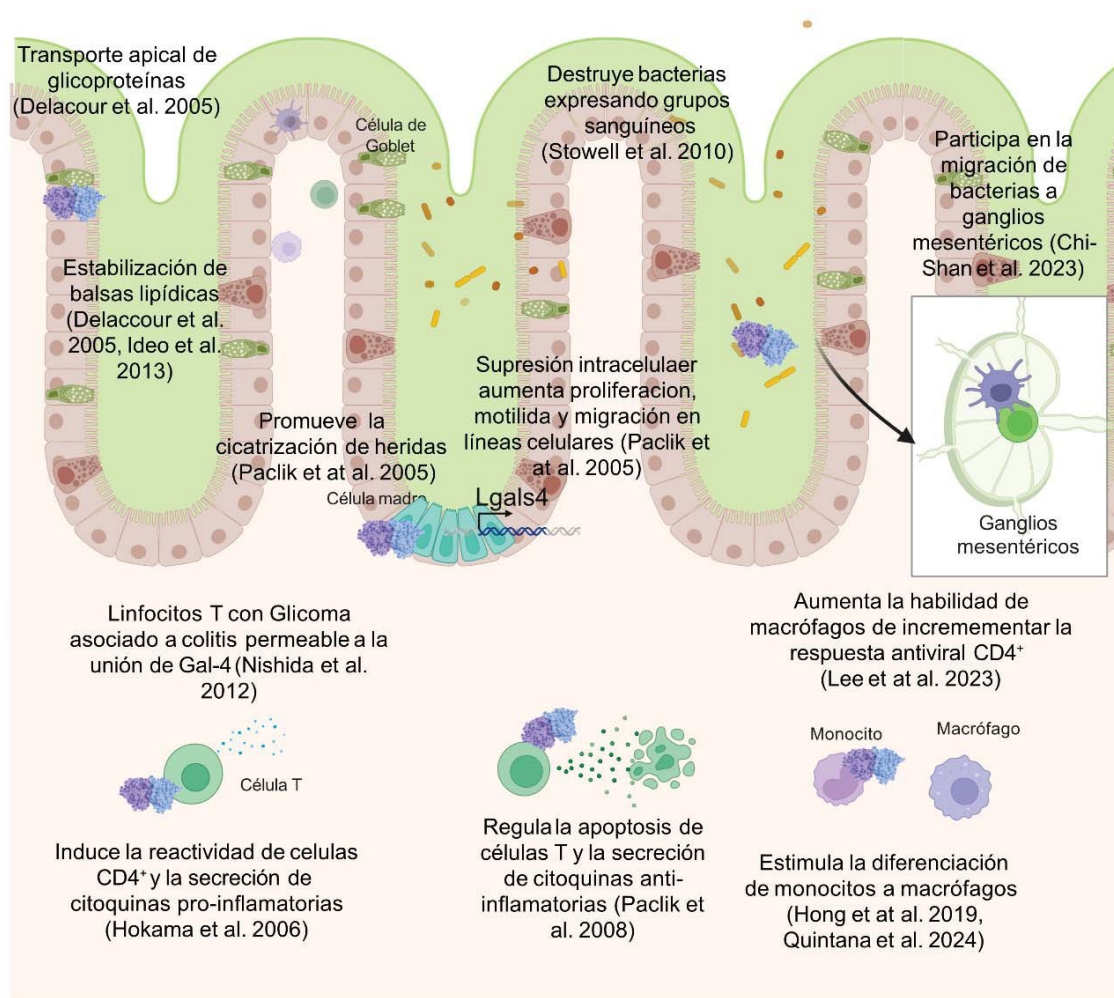


Figura 9. Funciones de Gal-4 en el intestino. Gal-4 ha sido descrita como mediadora de mecanismos inmunológicos de relevancia en inflamación intestinal por interacción con células T, monocitos y macrófagos. Asimismo, su expresión se relaciona con funciones de transporte y reparación de la barrera epitelial. Se ha descrito como una lectina con actividad antibacteriana, además de participar en el proceso de migración de microorganismos hacia ganglios mesentéricos.

2 Objetivos

2.1. Objetivo general

Investigar el papel de Galectina-4 en la inflamación intestinal mediante la caracterización de sus ligandos específicos, el análisis de firmas glicobiológicas derivadas de transcriptomas, y su impacto funcional en los compartimentos inmunológico y epitelial.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Caracterizar bioquímica y funcionalmente Galectina-4 humana.

Establecer un protocolo eficiente de producción recombinante y purificación de Galectina-4 en *Escherichia coli*, determinar sus preferencias de unión glicosídica y estudiar mediante modelado molecular las interacciones específicas que la determinan.

2.2.2. Investigar el papel de Galectina-4 sobre el compartimiento inmune en inflamación intestinal.

Evaluar el papel de Galectina-4 en modelos experimentales de inflamación intestinal y analizar la transcriptómica de biopsias de pacientes con enfermedades inflamatorias.

2.2.3. Estudiar la función de Galectina-4 en el compartimiento epitelial

Determinar la contribución de Galectina-4 en el compartimento epitelial utilizando modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*.

3 Materiales y métodos

3.1. Producción recombinante

Para la producción recombinante de Gal-4 humana, se tomaron como punto de partida los protocolos descritos en literatura (Rustiguel et al. 2016; Nishi 2020). La producción se optimizó con el vector de expresión pET-28a utilizando una proteína de fusión SUMO unida a una cola de histidinas (His₆) en el extremo N-terminal. Las bacterias *Escherichia coli* BL21 (Novagen) transformadas con el constructo pET28a-SUMO-Gal-4 se cultivaron en medio LB con 30 µg/ml de kanamicina a 37 °C, y se indujo la producción añadiendo una solución 1 mM de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) una vez que la densidad óptica (OD₆₀₀) alcanzó 0,5. El crecimiento continuó durante 16 hs a 30 °C. Las células se recolectaron por centrifugación a 6000 x g durante 30 min a 4 °C y el pellet celular se resuspendió en un buffer de lisis compuesto por 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,5 M NaCl, 4 mM β-mercaptoetanol y una solución de inhibidores de proteasas que contenía 25 µM de TLCK (hidrocloruro de N-α-tosil-L-lisin clorometilcetona) y 0,5 mM PMSF (floruro de fenilmetilsulfonilo). La lisis celular se llevó a cabo mediante sonicación. Posteriormente, se añadió Tritón X-100 hasta alcanzar una concentración final de 1%, y la mezcla se incubó durante 30 min a 4 °C en un agitador. Finalmente, el lisado se centrifugó a 16000 × g durante 30 min a 4 °C. Para la purificación se emplearon dos estrategias. La primera de ellas aprovecha la afinidad de las Gal-4 por lactosa (**Sección 3.1.1**), y la segunda aprovecha la afinidad de la etiqueta (*tag*) de His₆ por níquel (**Sección 3.1.2**). El proceso de purificación se llevó a cabo utilizando el equipo 'Akta Go' (GE Healthcare) o, en algunos casos, utilizando una bomba peristáltica.

3.1.1. Purificación por afinidad con lactosa

El sobrenadante de lisis se cargó a una columna de lactosil-Sepharosa (Sigma-Aldrich) y se eluyó utilizando una solución 0,2 M de lactosa en buffer A (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl suplementado con 14 mM de β-mercaptoetanol). Luego, las fracciones

conteniendo His₆-SUMO-Gal-4 se concentraron utilizando un filtro Amicon® Ultra-15 (Millipore) con límite de corte 10 kDa y se dializaron contra buffer A. La proteína de fusión se escindió utilizando la proteasa ULP1 durante 16 hs a 8 °C o 1 h a 30 °C. Posteriormente, las muestras se cargaron nuevamente en la columna de lactosil-Sepharosa (Sigma- Aldrich) y se eluyeron en presencia de una solución 0,2 M de lactosa en buffer A. Finalmente, se dializó contra buffer A para experimentos posteriores.

3.1.2. Purificación por afinidad a Níquel (Ni-NTA)

El sobrenadante se cargó en una columna Ni-NTA preequilibrada con buffer A (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl suplementado con 14 mM de β-mercaptoetanol). Luego, la columna se lavó con buffer A y buffer A suplementado con 25 mM imidazol, utilizando diez volúmenes de columna en cada caso. La proteína de fusión His₆-SUMO-Gal-4 se eluyó con una solución 250 mM de imidazol. Las fracciones de proteína se concentraron utilizando un filtro Amicon® Ultra-15 (Millipore) con límite de corte 10 kDa y se dializaron contra buffer A. His₆-SUMO-Gal-4 se escindió utilizando la proteasa ULP1 durante 16 hs a 8 °C o 1 hs a 30 °C. Posteriormente, la muestra se cargó en una columna de resina Ni-NTA donde rGal-4 se separó de ULP1 y SUMO mediante elución con buffer A suplementado con una solución de imidazol 250 mM. Finalmente, Gal-4 se dializó frente al buffer A para experimentos posteriores.

3.2. Esterilización, cuantificación y conservación de rGal-4

A lo largo de la purificación, el contenido de proteína se cuantificó utilizando Coomassie Plus (Thermo Scientific) y, una vez purificada, mediante el ensayo de microBCA estándar (Thermo Fisher Scientific) o mediante espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). La pureza se verificó por electroforesis en SDS-PAGE al 12%. La proteína se liberó de endotoxinas mediante una columna Detoxigel (Thermo Fischer Scientific). Finalmente, Gal-4 recombinante se esterilizó pasándola a través de un filtro de jeringa de 0,22 μm, se ajustó a 1-1,5 mg/ml en buffer 50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl y 14 mM β-mercaptoetanol. La proteína se almacenó en heladera o liofilizada.

Se ensayaron diferentes condiciones de conservación de rGal-4 para optimizar su vida útil y actividad. Brevemente, todas las condiciones evaluadas contenían 50 mM HEPES pH 7,2 y 150 mM NaCl, y se combinaron con: (1) 14 mM β-mercaptoetanol (β-ME); (2) 14

mM β-ME y 100 mM lactosa; (3) 14 mM β-ME y 25% polietilenglicol (PEG) 6000; (4) 14 mM β-ME, 100 mM lactosa y 25% PEG 6000; (5) 4 mM TCEP; (6) 4 mM tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y 100 mM lactosa; (7) 4 mM TCEP y 25% PEG 6000; y (8) 4 mM TCEP, 100 mM lactosa y 25% PEG 6000. Una alícuota de la proteína en cada condición ensayada, resultante de la combinación de los reactivos descriptos, fue guardada a 4°C (A), congelada a -20 (B), o liofilizada (C). Se evaluó la capacidad hemaglutinante mediante un ensayo de hemaglutinación (Maller et al. 2020).

3.3. Ensayos competitivos en fase sólida

El ensayo fue adaptado de literatura (Rapoport et al. 2010). Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos (fondo plano) con 10 µg/mL de asialofetúina (ASF, Sigma-Aldrich) en buffer de carbonato de sodio (pH 9,6) y se incubaron durante la noche a 4 °C. Luego, cada pocillo se lavó tres veces con 100 µL de PBS-Tween 0,05% y se bloqueó con 100 µL de PBS-BSA 2% (Sigma-Aldrich) 1h a temperatura ambiente (RT) en una cámara húmeda. Mientras tanto, volúmenes iguales de rGal-4 en buffer PBS BSA 0,3% (PBS-BSA) se preincubaron con los inhibidores correspondientes en diluciones seriadas (2 hs, 37 °C). Después del lavado, se detectó rGal-4 utilizando un anticuerpo biotinilado (R&D Systems, BAF1227) en PBS-BSA (1 h, RT). Las placas se enjuagaron tres veces antes de agregar estreptavidina marcada con HRP (0,33 µg/ml) (Sigma-Aldrich) durante 30 min. Se dejó reposar durante 1 h a RT en PBS-BSA y después del lavado con PBS-Tween 0,05%, se añadieron en cada pocillo 100 µl de solución de TMB (0,1 mg/ml de *N,N,N,N*- tetrametilbencidina (TMB) y 0,06 % de H₂O₂ en buffer citrato-fosfato, pH 5,0). La reacción se detuvo añadiendo una solución de H₂SO₄ 2N. Las densidades ópticas se determinaron a 450 nm en un lector de microplacas Multiskan MS (Thermo Fisher Scientific).

3.4. Ensayos de actividad por hemaglutinación

Los ensayos de hemaglutinación (HAs) se llevaron a cabo según lo descrito previamente (Maller et al. 2020). Brevemente, glóbulos rojos (RBC) humanos de tipo A y 0 se trataron con tripsina, se fijaron con glutaraldehído al 1% p/v y se almacenaron a 4°C hasta su uso. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos (fondo en U) con diluciones seriadas de rGal-4 en un buffer PBS. Se añadieron los RBC tratados con tripsina en buffer PBS, se mezclaron suavemente mediante pipeteo y se incubaron con rhGal-4 durante 60 min a RT.

3.5. Determinación de afinidad por calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

Para determinar la afinidad de rhGal-4 por los diferentes ligandos evaluados, los experimentos de calorimetría de titulación isotérmica se realizaron utilizando un NanoITC (TA Instruments) en condiciones optimizadas previamente (Cagnoni, Kovensky, y Uhrig 2014). Una titulación típica implicó 20 inyecciones a intervalos de 300 s de alícuotas de 2,5 µL de una solución de ligando de 2,5-10 mM en la celda de muestra (volumen 200 µL) que contenía la rGal-4 (30-100 µM). Las soluciones se prepararon disolviendo los ligandos en un buffer PBS desgasado a 298 K. La celda de titulación se agitó continuamente a 300 revoluciones/min. Los calores de dilución de los ligandos en el buffer se restaron de los datos de titulación. Debido a la afinidad relativamente baja de las galectinas humanas por los ligandos monovalentes ($K_d > 50 \mu\text{M}$), se utilizó el método de “bajo valor del parámetro c ” para las mediciones de ITC, con la estequiometría (n) fijada en 1,00 (Turnbull y Daranas

2003). El ajuste se realizó utilizando el software Nano Analyze para determinar la constante de asociación (K_a) y el cambio de entalpía (ΔH).

3.6. Cálculos de *docking* molecular de ligandos

Para los estudios de *docking* molecular de Gal-4N y Gal-4C con BGA6, se emplearon como geometrías de partida la estructura cristalográfica de rayos X de Gal-4N (código PDB 5DUV) (Bum-Erdene et al. 2016) y -4C (código PDB 4YM3) (Bum-Erdene et al. 2015) unidas a lactosa, respectivamente. Ambas estructuras se editaron previamente para los cálculos de acoplamiento utilizando el software AutoDock Tools 1.5.6: los hidrógenos polares y las cargas parciales se agregaron explícitamente, mientras que el programa agregó automáticamente otros átomos de hidrógeno.

A continuación, los confórmeros más estables de BGA6 se acoplaron manualmente a los sitios de unión de carbohidratos de cada miembro específico de la galectina superponiendo el residuo terminal de Gal de la lactosa con las coordenadas cristalográficas del BGA6. El protocolo de acoplamiento se estableció inicialmente en condiciones rígidas con un tamaño de la grilla de acoplamiento de $20 \times 20 \times 20$ Å, que abarca el sitio de unión para los ligandos de carbohidratos. La exhaustividad se estableció inicialmente en 10 con todos los demás parámetros establecidos en valores predeterminados, luego se aumentó a 100 para los acoplamientos finales. Los complejos mejor clasificados, ordenados por valores de energía de enlace, se inspeccionaron visualmente para comprobar la buena geometría estereoquímica y el acoplamiento y se utilizaron como conformaciones iniciales para estudios de dinámica molecular. Para la visualización, las poses de acoplamiento generadas por AutoDock Vina se cargaron directamente en PyMol (<http://www.pymol.org>) a través del complemento PyMOL Autodock/Vina (Seeliger y de Groot 2010).

3.7. Estudios de dinámica molecular

Después de definir la conformación inicial mediante estudios de *docking* molecular, se realizaron simulaciones de dinámica molecular (MD) de 500 ns para complejos de galectina-glicano. En todos los casos, los complejos de galectina-ligando se solvataron con moléculas de agua explícita modeladas con carga puntual de tres sitios (TIP3P) en una caja octaédrica, localizando los límites de la caja a 10 Å de la superficie de la proteína. Las simulaciones de MD se realizaron a 1 atm y 300 K, mantenidas con el baróstato y termostato de Berendsen (Berendsen et al. 1984; van Gunsteren y Berendsen 1990), utilizando condiciones de contorno periódicas y sumas de Ewald (espaciado de cuadrícula de 1 Å) para tratar interacciones electrostáticas de largo alcance con un límite de corte de 10 Å para calcular interacciones directas. El algoritmo SHAKE se aplicó a todos los enlaces que contienen hidrógeno, lo que permite el empleo de un paso de tiempo de 2 fs para la integración de las ecuaciones de Newton. Los parámetros de campo de fuerza

Amber ff19SB y GLYCAM-06j_1 se utilizaron para Gal-4 y sus extremos y glicanos, respectivamente (Hornak et al. 2006; Tian et al. 2020; Case et al. 2022). El protocolo de equilibración implicó una minimización de la estructura inicial, seguida de una corrida de MD a volumen constante de 400 ps calentando el sistema lentamente a 300 K. Finalmente, se realizó una corrida de MD de 0,8 ns a presión constante para lograr la densidad adecuada. Se realizaron corridas de MD de 500 ns para complejos de Gal-4 con BGA6. Los fotogramas se guardaron a intervalos de 1 ps. Los resultados de MD se visualizaron con el software VMD 1.9.2 (Humphrey, Dalke, y Schulten 1996) y se analizaron con el paquete Amber20 (Case et al. 2022).

3.8. Modelado de Gal-4 completa y acoplamiento molecular

Se obtuvieron tres modelos estructurales de Gal-4 humana (hGal-4) completa mediante la combinación de modelado molecular y simulaciones de dinámica molecular (MD). Para el primer modelo, tomando como base el modelo construido en Rustiguel et al. (Rustiguel et al. 2016), se realizó una predicción estructural *ab initio* del péptido *linker* conector (residuos 153 al 185, QPLRPQGPPMPPYPGPGHCHQQLNSLPTMEGP) utilizando el servidor Robetta (Kim, Chivian, y Baker 2004). El mejor modelo, que comparte una estructura compacta y la presencia de un segmento de hélice corta, fue seleccionado en función de su geometría. Utilizando Modeller v9.14 (Webb y Sali 2016), los *linkers* fueron ensamblados como una única cadena polipeptídica junto con las estructuras de rayos X de Gal-4N (código PDB 5DUV) (Bum-Erdene et al. 2016) y -4C (código PDB 4YM3) (Bum-Erdene et al. 2015), que se dispusieron aleatoriamente entre sí, dando lugar a seis modelos iniciales diferentes para Gal-4 de longitud completa. El modelo con la menor energía potencial fue sometido a un refinamiento conformacional mediante MD. Para el segundo modelo, se generó una estructura de hGal-4 sin templado estructural del péptido *linker*, para lo cual se ensamblaron las estructuras cristalográficas de Gal-4N y -4C, tomando como base la secuencia de hGal-4 completa, directamente con Modeller v9.14. Se incluyó la secuencia aminoacídica del linker. Para el tercer modelo, se empleó Alpha Fold V2 (Varadi et al. 2022) en ColabFold (Mirdita et al. 2022) para predecir la estructura de hGal-4 completa. Los tres modelos estructurales resultantes de fueron sometidos a dinámicas moleculares según lo descrito en la **Sección 3.7**.

Los complejos obtenidos para Gal-4N-BGA6 y Gal-4C-BGA6 a partir de acoplamiento molecular, se alinearon al modelo de Gal-4 obtenido con AlphaFold utilizando TAlign (Zhang y Skolnick 2005). Las conformaciones obtenidas con el modelo completo de Gal-4 con BGA46 en ambos o en uno de los dominios terminales, fueron sometidas a simulaciones de dinámica molecular, siguiendo el protocolo previamente descrito en la **Sección 3.7**.

3.9. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los experimentos de esta sección se realizaron en colaboración con el laboratorio del Dr. Jesús Jiménez-Barbero y la Dra. Ana Ardá (CIC bioGUNE, Derio, Bizkaia, España).

Gal-4 humana completa se disolvió en PBS (fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4, suplementado con DTT 1 mM), ya sea en D₂O o en una mezcla de H₂O:D₂O 90:10 según el experimento de RMN. El pH se ajustó con la cantidad requerida de NaOH y HCl o NaOD y DCl.

3.9.1. RMN de diferencia de transferencia de saturación (STD) de ¹H.

Todos los experimentos de RMN de STD de ¹H se adquirieron en una frecuencia de 800 MHz (con una criosonda). Las muestras se prepararon en el buffer deuterado correspondiente. Los espectros de RMN de STD de ¹H se adquirieron con 1024 barridos, 2 s de tiempo de saturación utilizando un tren de pulsos de forma gaussiana de 50 ms y 3 s de tiempo de relajación. El filtro de bloqueo de espín aplicado para eliminar las señales residuales de la lectina se estableció en 40 ms. Para Gal-4, la temperatura fue de 298 K. Se emplearon 50 µM de la lectina con 50 equivalentes del ligando. Las frecuencias de resonancia activa se establecieron en 7,19 ppm (región aromática) y en 0,52 ppm (región alifática), mientras que la frecuencia de resonancia desactivada se estableció en 100 ppm. Los experimentos se adquirieron a 298 K. La frecuencia de resonancia activa se estableció en 7,03 ppm y la de resonancia desactivada en 100 ppm. Se realizaron utilizando una solución 25 µM de Gal-4 humana con 50 equivalentes de ligando.

3.10. Aislamiento de PBMCs a partir de *Buffy coats*

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) a partir de *buffy coats* o capa leucocitaria de voluntarios sanos anónimos (Banco de Sangre Fundación Hemocentro, Buenos Aires, Argentina), utilizando un gradiente de densidad de Ficoll (Lymphoprep™). Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm sin freno durante 25 min y la interfase blanca correspondiente a las PBMCs se retiró cuidadosamente y se diluyó con una solución fisiológica con 2% de suero fetal bovino (SFB). Para reducir la contaminación plaquetaria, se realizaron tres pasos de lavado con PBS 2% SFB y las PBMCs se resuspendieron posteriormente en SFB frío con 5% DMSO a una concentración de 4x10⁷ células/ml.

3.11. Ensayo de activación de linfocitos T

Las PBMCs recién aisladas se resuspendieron en buffer PBS y se marcaron con solución de trabajo 5 µM Tag-it Violet™ (Biolegend) durante 20 min a 37 °C. La reacción se detuvo con la adición de SFB y las células se recolectaron mediante centrifugación a 300 x g

durante 8 min. En paralelo, se activaron aproximadamente 16×10^4 PBMC con 2 μ l de Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28 (Gibco), para obtener una relación de microesferas a linfocitos T de 1:1 y teniendo en cuenta que aproximadamente el 50 % de las PBMC son linfocitos T (Lozano-Ojalvo, López-Fandiño, y López-Expósito 2015). Después de 24 hs de estimulación a 37 °C y 5 % de CO₂, las células se incubaron con rGal-4 (25, 50 o 100 μ g/ml) y/o BGA6 (0,5, 1, 2,5 y 5 mM) durante 72 hs. A continuación, las células se centrifugaron y se recogieron los sobrenadantes para el análisis de secreción de IL-6 mediante ELISA.

3.12. Secreción de IL-6 mediante ELISA

Se midieron los niveles de IL-6 humana en sobrenadantes de los linfocitos T activados con los kits ELISA correspondientes (BD Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.13. Análisis de datos de transcriptómica de biospias de pacientes con colitis ulcerosa

3.13.1. Datos de microarray

Los datos públicos de expresión de microarray fueron obtenidos de GEO bajo el código de acceso GSE16879 (Arijs et al., 2009). Se analizaron los datos de 24 muestras de pacientes con CU pre-tratamiento y 6 controles normales para evaluar la diferencia en los perfiles de expresión génica.

3.13.2. Datos de scRNAseq

Los datos transcriptómicos *single-cell* disponibles públicamente de la cohorte Garrido-Trigo fueron obtenidos de GEO bajo el código de acceso GSE214695 (Garrido-Trigo et al., 2023). Los datos crudos fueron procesados usando el paquete *Seurat*, estos corresponden a 7184 células provenientes de 6 muestras de CU (n células= 6299) y 6 controles sanos (n células=885.) Los datos crudos fueron cargados utilizando la función *CreateSeuratObject* y luego normalizados utilizando la función *NormalizeData* mediante el método *LogNormalize*. A continuación, se seleccionaron los genes más variables e informativos mediante el método *vst* con la función *FindVariableFeatures*. Luego se escalaron los datos usando la función *ScaleData* y se calculó la reducción de dimensionalidad mediante la función *RunPCA*. Para poder analizar gráficamente los datos, también se calculó la reducción UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) mediante la función *RunUMAP*.

3.13.3. Análisis de expresión diferencial

Para los datos de *microarray*, el análisis de expresión diferencial se realizó usando el paquete *limma* sobre los valores de intensidad de fluorescencia en $\log_2$, los p-valores se ajustaron usando el método de Benjamini-Hochberg. Para los datos de scRNA-seq, se realizó usando la función *FindMarkers* de Seurat con el método MAST que se encuentran optimizado para calcular expresión diferencial en conjuntos de datos inflados en cero. En ambos casos, un gen se consideró expresado diferencialmente si su p-valor ajustado resultó menor a 0,05.

3.14. Experimentos *in vivo*

Los ratones fueron criados y mantenidos en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental y se trataron de acuerdo con las guías para el trato humanitario de animales de laboratorio del NIH (EE.UU). Los protocolos de experimentación fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Nro. 34/2023).

Se emplearon ratones C57BL/6, hembras y machos de 8 a 12 semanas de edad. Las cepas empleadas incluyeron ratones de tipo salvaje (WT, C57BL/6) (obtenidos de Jackson Laboratory o de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata) y ratones con depleción específica de Galectina-4 (Gal-4) en el epitelio intestinal (*CreVillina*^{+/-} *FloxLgals4*^{+/+}, *Gal4* ^{Δ IEC}). Estos últimos fueron generados mediante cruce de animales portadores del transgén *CreVillina*^{+/-} (Jackson Laboratory) con ratones *FloxLgals4*^{+/+} (Ozgene).

Los ratones *CreVillina*^{+/-} expresan la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen de villina, que se encuentra activo específicamente en células epiteliales. La enzima Cre cataliza la recombinación específica de secuencias flanqueadas por sitios loxP. Los ratones *FloxLgals4*^{+/+} cuentan con regiones loxP flanqueantes al gen de Gal-4 (*Lgals4*).

Para los experimentos se emplearon ratones de la segunda generación (F2), incluyendo aquellos de tipo salvaje (*CreVillina*^{+/-} *FloxLgals4*^{+/+}, *Gal4*^{fl/fl}) o con depleción específica de Gal-4 en células epiteliales (*CreVillina*^{+/-} *FloxLgals4*^{+/+}, *Gal4* ^{Δ IEC}). Estos fenotipos no afectan el bienestar del animal.

3.14.1. Genotipificación de ratones

Tras el destete (aproximadamente dos semanas después del nacimiento) se extrajeron muestras de tejido para realizar la genotipificación. El ADN se obtuvo utilizando el kit ADN PuriPrep-T (Highway), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una fracción del ADN extraído se utilizó para amplificar la región correspondiente al transgén Cre, empleando *primers* específicos y los ciclos de PCR recomendados por Jackson Laboratory. Otra fracción del ADN se destinó a la amplificación de la región *FloxLgals4*, según el protocolo proporcionado por Ozgene.

Los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñido con SYBR Safe DNA (ThermoFisher). Los geles se corrieron a un voltaje constante de 100 mA durante 60 min. Posteriormente, las bandas obtenidas fueron visualizadas bajo luz UV para confirmar los genotipos.

3.14.2. Inducción de inflamación intestinal por dextrano sulfato sódico (DSS)

Se seleccionaron para los experimentos ratones que pesaran más de 20 g. El peso se monitoreó a lo largo del protocolo experimental. Para determinar el porcentaje de pérdida causado por la inflamación, el peso corporal de los animales fue medido cada 2 días y relativizado al peso inicial (día 0). El punto final experimental se llevó a cabo según corresponde al modelo, mientras que el punto final humanitario se llevó a cabo si el animal mostraba una pérdida mayor o igual al 20% de su peso inicial.

3.14.2.1 Modelo de inflamación aguda

Se preparó agua de bebida conteniendo 3% de dextrano sulfato de sodio (DSS). La solución se esterilizó por filtración y se administró *ad libitum* durante cinco días. La administración de DSS se detuvo al día 5 y luego se administró agua durante 5 días. La duración total del experimento fue de 10 días. Al finalizar este período los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical para su evaluación.

3.14.2.2 Modelo de inflamación crónica

Se preparó el agua de bebida con 2,5% de DSS. La solución se esterilizó por filtración y se administró *ad libitum* durante cinco días. La administración de DSS se detuvo por 5 días durante los cuales los animales recibieron agua regular, y este ciclo repitió dos veces más. La duración total del experimento es de 30 días. A los cinco días posteriores al último ciclo de administración de DSS los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical para su evaluación.

3.15. Evaluación de niveles de lipocalina-2 y poblaciones inmunes en sangre

Antes de la eutanasia, se tomó una muestra de sangre del cachete de los ratones. La sangre anticoagulada se utilizó para evaluar poblaciones inmunes por citometría de flujo. El suero se usó para la evaluación de Lipocalina-2 (LCN2) (Mouse Lipocalin-2/NGAL Quantikine ELISA Kit, R&D Systems) según indicaciones del fabricante.

3.16. Peso/largo del colon como indicador de inflamación

Luego de la eutanasia se extrajo el colon en su totalidad realizando un corte debajo del ciego y otro al final del recto. El largo del colon fue medido, luego se vaciaron sus contenidos y se registró su peso. A partir de ambas mediciones se determinó la relación peso/largo del colon (expresada en mg de colon por cm de longitud).

3.17. Cortes histológicos

Luego de la eutanasia, se tomaron tres fragmentos del colon (zona proximal al ciego, zona media del colon, zona proximal al recto) los cuales fueron fijados en formaldehído 4% en PBS por 48 hs. Se transfirió los fragmentos a una solución de etanol 70% v/v para luego ser embebidos en parafina y cortados en micrótopo (servicio patológica Laura Latorre (Hospital Lagleyze, Argentina). Se realizó la tinción de hematoxilina/eosina y/o inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-hGal-4 (AF1227, R&D Systems) sobre los cortes.

3.18. Aislamiento de células de ganglios mesentéricos y bazo

Los bazos y los ganglios linfáticos mesentéricos (mLNs) se colocaron en una placa de Petri con PBS frío. Sobre un papel húmedo, se eliminó la mayor cantidad posible de grasa y vasos sanguíneos para optimizar el rendimiento.

A continuación, se transfirieron los bazos y mLNs a los tubos de 50 ml correspondientes con filtro de 40 μ m. Los bazos se cortaron en pequeños fragmentos y, con el émbolo de una jeringa, se trituraron los tejidos contra el filtro hasta lograr su digestión completa. Se enjuagaron los filtros con 10 ml de PBS 2% SFB y se descartaron. Las células se centrifugaron a 350 x g durante 5 min a 4 °C.

Se descartó el sobrenadante, y los pellets de los mLNs se resuspendieron en el volumen deseado de buffer de citometría (PBS 0,01M con 5% SFB). En el caso de los bazos, los pellets se resuspendieron en 1 ml de buffer de lisis ACK (cloruro de amonio 0,15M, bicarbonato de potasio 0,01M, EDTA disódico 0,1mM), incubando a RT durante 5 min. La reacción se detuvo añadiendo 1 ml de SFB.

Posteriormente, se añadieron 10 ml de PBS 2% SFB a las suspensiones de células y se centrifugaron nuevamente como en el paso anterior. Finalmente, se descartó el sobrenadante y los pellets se resuspendieron en el volumen deseado de buffer de citometría. Las muestras quedaron listas para proceder al paso de tinción celular.

3.19. Aislamiento de células epiteliales y de lámina propia

El colon y/o el intestino delgado se abrieron longitudinalmente y se limpió su contenido con PBS a RT. Posteriormente, se retiraron los ganglios linfáticos mesentéricos (mLN)

adheridos al colon y se transfirió el colon y el intestino delgado a dos tubos con buffer de colección (HBSS, FBS 10%, Glutamax 1x, HEPES 1x), respectivamente. Se eliminó la mayor cantidad posible de grasa y vasos sanguíneos para optimizar el rendimiento. El tejido se cortó en fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud y se transfirió a un tubo con 20 ml de PBS con 5% SFB, manteniendo las muestras en hielo.

Los fragmentos se lavaron con PBS 0,01 M (30-50 ml, 1-2 veces) hasta que la solución fuera transparente, utilizando un filtro de malla metálica para desechar el sobrenadante. Luego, se incubaron los fragmentos en buffer ES (HBSS, EDTA 5 mM, 5% SFB) a 37°C durante 30 min, agitando las muestras en un agitador magnético a 800 rpm. Tras la incubación, se agitaron las muestras 5 segundos en vortex y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de nylon de 100 µm para recolectar las células del epitelio intestinal. El sobrenadante se lavó una vez con HBSS sin $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ a RT.

Las piezas de tejido remanentes se lavaron con PBS con $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ (137 mM NaCl; 0,5 mM MgCl_2 ; 8,1 mM Na_2HPO_4 ; 0,9 mM CaCl_2 ; 1,47 mM KH_2PO_4 y 2,7 mM KCl) y se incubaron sucesivamente en buffer A (PBS, EDTA 1 mM, SFB 5%) a 37°C por 15 min y luego en buffer B (PBS, HEPES 15 mM, SFB 1%) a RT por 10 min. Finalmente, se colocaron en solución de digestión (HBSS con $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, colagenasa D 0,5 mg/ml, dispasa II 0,5 mg/ml, DNasa I 0,1 mg/ml, SFB 20%) e incubaron a 37°C durante 30 min en agitación.

Tras el tratamiento enzimático, los tubos C, (Miltenyi Biotec), específicos del equipo, se colocaron en el gentle MACS™ Dissociator (MACS) y se utilizó el programa m_intestine_01 para terminar de disgregar mecánicamente el tejido. Se detuvo la digestión añadiendo 20 ml de buffer de detención (HBSS, SFB 5%) y se mantuvieron las muestras sobre hielo. Los fragmentos de tejido se filtraron a través de un filtro de 40 µm y el sobrenadante obtenido se centrifugó (350 x g, 10 min, 4°C). Las células se resuspendieron en 200 µl de buffer de citometría (PBS 0,01 M, EDTA 2 mM, SFB 5%) y se mantuvieron en hielo hasta su posterior procesamiento.

3.20. Ensayo *in vitro* de diferenciación de linfocitos T CD4^+ a memoria

Luego de obtener una suspensión de esplenocitos de ratón, se procedió a la purificación de linfocitos T utilizando el kit de selección negativa *DynaBeads Untouched Mouse CD4^+ Cells kit* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, 1×10^5 células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, antibiótico/antimicótico (Gibco) y *beads* de activación para linfocitos T de ratón anti-CD3 y anti-CD28 (Miltenyi). Luego de 24 horas de activación, los linfocitos T CD4^+ purificados y activados se incubaron en presencia y/o ausencia de rGal-4, IL-7 e IL-

15. Luego de 72 hs, se evaluó el fenotipo de las células mediante citometría de flujo.

3.21. Flurocromación de rGal-4

rGal-4 se acoplo a los fluoróforos APC-Cy7 (ab102859) y PerCP/Cy5.5 (ab102911) utilizando los kits Conjugation Kit-Lightning-Link (Abcam) según instrucción del fabricante.

3.22. Análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo

Las células obtenidas a partir del procesamiento de bazo, ganglios mesentéricos y lámina propia del intestino fueron resuspendidas en 50 µl de buffer de citometría (PBS SFB 2% m/v), luego lavadas con PBS y marcadas con sonda de viabilidad (Zombie Aqua Fixable Viability Kit, Zombie Red Fixable Viability Kit) (1/1000, Biolegend) para detectar las células vivas. Posteriormente, las células fueron marcadas con anticuerpos específicos durante 30 min a RT.

En el caso de marcas intracitoplasmáticas (**Tabla 1**), las células fueron fijadas y permeabilizadas con buffer Fix/Perm (Biolegend) durante 30 min. Luego, del lavado las células son incubadas con los anticuerpos intracitoplasmáticos específicos. Por último, las muestras son resuspendidas en buffer de citometría y guardadas a 4°C hasta su análisis por el citometría de flujo.

En el caso del análisis de poblaciones celulares en muestras de sangre, se utilizó sangre anticoagulada con la que se incubo la mezcla de anticuerpos específicos. Luego, se agregó RBC Lysis/Fixation buffer (Biolegend) y se incubo durante 15 min para el lisado de los glóbulos rojos y fijado de la muestra. Posteriormente, se lavó la muestra y se resuspendió con buffer de citometría mantenida luego a 4°C hasta su análisis por citometría de flujo.

El análisis del glicofenotipo se realizó de acuerdo con el protocolo previamente descripto (Toscano et al. 2007). Brevemente, las suspensiones de células se incubaron durante 30 min a 4 °C mezcladas con anticuerpos de superficie en PBS BSA 1% con las siguientes lectinas biotiniladas: lectina de *Sambucus Nigra* (SNA, 5 µg/ml), lectina de *Ulex europeaeus* (Ulex, 10 µg/ml) lectina aglutinina de *Dolichos biflorus* (DBA, 10 µg/ml) y la lectina de *Aleuria Aurantia* (AAL, 10 µg/ml). A menos que se aclare lo contrario, las lectinas fueron adquiridas en Vector Laboratories. Luego, las células se lavaron y se marcaron con estreptavidina-BB515 PE (Pierce) según el protocolo de marcación de superficie para citometría. Posteriormente, los niveles de unión de cada lectina se detectaron por citometría de flujo. Como control negativo se utilizaron células que se sometieron al mismo protocolo sin lectinas biotiniladas en el primer paso. La mediana relativa de intensidad de fluorescencia media (rMFI) se calculó con la siguiente fórmula: (mediana de intensidad de las células de interés/ mediana de intensidad media del control negativo).

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para el reconocimiento de poblaciones celulares por citometría de flujo.

Anticuerpo	Fluoróforo	Especificidad	Clon
------------	------------	---------------	------

B220 (CD45R)	APC	ratón	RA3-6B2
CCR6 (CD196)	PerCP-Cy5.5	ratón	29-2L17
CCR9 (CD199)	FITC	ratón	CW-1.2
CD103	BV510	ratón	2E 7
CD117 (cKit)	PeCy7	ratón	2B8
CD11b	BV605	ratón/humano	M1/70
CD11c	APC-Cy7	ratón	N418
CD127	BV605	ratón	A7R34
CD138	BV510	ratón	2E 7
CD19	BV711	ratón	6D5
CD24	PE-Cy7	ratón	B3B4
CD3	Alexa 700	ratón	17A2
CD31	PE	ratón	390
CD4	BV711	ratón	RM4-4
CD44	BV650	ratón/humano	HCAM
CD45	BV785	ratón	30-F11
CD45	BV711	ratón	30-F11
CD45	PerCP-Cy5.5	ratón	30-F11
CD62L	BV421	ratón	MEL-14
CD64	BV421	ratón	X54-5/7.1
CD69	APC-Cy7	ratón	H1.2F3
CD8	PE-Cy7	ratón	53-6.7
CD86	PE-Dazzle	ratón	GL1
CX3CR1	PE	ratón	SA011F11
CXCR3	BV421	ratón	CXCR3-173
F4/80	PE	ratón	QA17A29
Foxp3	AF488	ratón/rata/humano	150D
GATA3	APC	ratón	16E10A23
KLRG1	PerCP-Cy5.5	ratón	2F1
Ly6C	BV650	ratón	HK1.4
Ly6C	AF700	ratón	HK1.4
Ly6G	PeCy7	ratón	1A8
MHCII	AF700	ratón	M5/114.15.2
MHCII	PerCP-Cy5.5	ratón	M5/114.15.2
RORγT	PE	ratón/humano	AFKJS-9

SiglecF	FITC	ratón	S17007L
Tbet	BV421	ratón	4B10
$\alpha 4\beta$ (LPAM-1)	APC	ratón	DATK32
rGal-4	APC-Cy7		
Zombie Aqua			
Zombie Red			

3.23. Análisis de datos de transcriptómica murinos

3.23.1. Datos de scRNAseq

En colaboración con el laboratorio del Dr. Eduardo Villablanca (Departamento de Medicina, Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia), y en particular, con el estudiante de doctorado He Ning, se analizaron datos de scRNAseq murinos disponibles bajo los códigos de acceso: GSE131432, GSE132273, GSE134255, GSE138902, GSE142423, GSE143351, GSE146042, GSE151257, GSE155669, GSE163637, GSE168448, GSE172261, GSE173887, GSE193342, GSE210415 y GSE231716. Cada conjunto de datos se sometió a idénticos procedimientos de control de calidad. Las células se excluyeron en función de los siguientes criterios (1) menos de 400 genes detectados y menos de 400 UMIs, (2) más del 5% de expresión génica mitocondrial, (3) identificación como dobles mediante DoubletFinder (v2.0.4) utilizando parámetros por defecto. Las matrices de recuento se normalizaron mediante Seurat::SCTransform (v4.4.0) para los análisis posteriores. Para la integración, se fusionaron las matrices de expresión normalizadas y se realizó una reducción de la dimensionalidad mediante Seurat::RunPCA en los 500 genes más variables compartidos entre las muestras. Se seleccionaron los genes variables compartidos, identificando primero los 3.000 genes más variables por muestra y reteniendo después los 500 genes más recurrentes en todas las muestras. La corrección por *batches* se realizó utilizando harmony::RunHarmony (v0.1.1) con cada muestra. Para visualizar todas las células en un espacio bidimensional, se generó una proyección UMAP utilizando Seurat::RunUMAP basada en los 30 primeros componentes principales de la proyección PCA corregida por armonía.

3.23.2. Datos de transcriptómica espacial

En colaboración con el laboratorio del Dr. Eduardo Villablanca (Departamento de Medicina, Instituto Karolinska, Suecia), y en particular, con el doctorando He Ning, se analizaron datos de transcriptómica espacial de ratones disponibles en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) (GSE169749). Las matrices de expresión génica de las secciones de tejido d0 y d14 se fusionaron y convirtieron en un SeuratObject utilizando STUtility::InputFromTable (v1.1.1). Sólo se conservaron los genes codificadores de

proteínas para el preprocesamiento de datos. El conjunto de datos filtrado resultante se normalizó posteriormente utilizando Seurat::NormalizeData (v4.4.0) y la visualización de genes utilizando STutility:: FeatureOverlay.

3.24. Organoides de criptas del intestino delgado

Para los experimentos con organoides se siguió el protocolo detallado en Das et al. (Das et al. 2025), el cual fue realizado en colaboración con la estudiante de doctorado Francisca Castillo y en el marco de una pasantía en el laboratorio del Dr. Eduardo Villablanca (Departamento de Medicina, Instituto Karolinska, Suecia). Brevemente, se recolectaron intestinos delgados de ratones (WT, C57BL/6), y se trataron durante 1 hora con PBS suplementado con EDTA 10 mM en hielo. Las criptas se obtuvieron por raspado y se centrifugaron a 300 x g durante 5 min. El medio de cultivo (ENR) utilizado para las criptas consistió en DMEM/F12 avanzado suplementado con 100 units/mL de penicilina/ 100 µg/ml de estreptomicina, 1X de Glutamax (Thermo Fisher Scientific), 10 mM de HEPES (Thermo Fisher Scientific), 1X de suplemento B27 (Life Technologies), 1X de suplemento N2 (Life Technologies), 1 mM de *N*-acetilcisteína (Sigma), y factores de crecimiento: 50 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico recombinante murino (EGF, R&D Systems), 500 ng/mL de R-spondina recombinante murina (R&D Systems) y 100 ng/mL de Noggin recombinante murino (Peprotech). Las criptas se resuspendieron en una mezcla de medio ENR/Matrigel (Corning) en una proporción de 4:6. Se sembraron en pocillos planos previamente calentados aproximadamente 20 µL (para placas de 48 pocillos) o 5 µL (para placas de 96 pocillos) de esta mezcla, conteniendo ~100 criptas/µL. Después de 15 min de incubación a 37 °C para permitir que el Matrigel solidifique, se añadieron 180 µL (para placas de 48 pocillos) o 100 µL (para placas de 96 pocillos) de medio ENR con estímulos específicos. El medio de cultivo se renovó cada dos días y los cultivos se mantuvieron en un incubador completamente humidificado a 37 °C con 5% de CO₂. Durante los primeros dos días se agregó al medio de cultivo Y-27632 (Sigma) (medio ENR-Y) a 10 µM.

3.25. Organoides unicelulares del intestino delgado

Los organoides del intestino delgado (ID) de ratón se desprendieron, se rasparon de una placa de 48 pocillos y se transfirieron a un tubo con 10 mL de PBS + 0,01% BSA (Sigma), centrifugándose a 300 x g durante 5 min a 4 °C. Tras retirar el sobrenadante, el pellet se resuspendió suavemente en PBS + 0,01% BSA, y se repitió el proceso. Para la digestión del Matrigel, los organoides se resuspendieron en 1 mL de TrypLE Express (Gibco) con DNase I (Roche) a 0,5 mg/mL y Y-27632 a 10 µM, incubándose a 37 °C durante 10 min, y agitando a los 5 min. El TrypLE se diluyó con PBS + 0,01% BSA, y las células se centrifugaron a 300 x g durante 5 min a 4 °C. A continuación, se eliminaron las células muertas utilizando Dead Cell Removal y Biotin Selection Cocktails (Stemcell). Las células se contaron con una cámara de Neubauer y Trypan Blue. Luego se resuspendieron en

medio ENR-Y suplementado con 1 nM de Wnt (R&D Systems) (medio WENR-Y) a una concentración de 10.000 (para placas de 48 pocillos) o 2.000 (para placas de 96 pocillos) células por pocillo. Las células y el Matrigel se mezclaron en una proporción 4:6 y se sembraron como se describió anteriormente. Tras la adición del medio WENR-Y, la placa se incubó y se capturaron imágenes cada 6 horas usando un sistema Incucyte, cambiando el medio a ENR (con estímulos) el día 3 después del resiembra.

3.26. Inmunofluorescencia en organoides y cortes de parafina

Los organoides se cultivaron en cámaras de vidrio de fondo plano Ibidi μ -slide de 8 pocillos. El día de la recolección, se lavaron con PBS y se fijaron con PFA al 4% (Sigma) durante 45 min a RT. Tras la fijación, se lavaron una vez con buffer de lavado (PBS con 0,1% m/v de BSA), y se realizó una permeabilización con Tritón X-100 al 0,5% (Sigma) en PBS durante 30 min a RT, seguido de un lavado con el buffer anterior. Los organoides se trataron con 100 mM de glicina (Sigma) en PBS durante 1 h a RT y se lavaron nuevamente. Se trataron los organoides con un buffer de bloqueo (5% de suero normal de cabra, 0,25% de Tritón X-100 en PBS-BSA 0,1%) durante 30 min a RT y se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario diluido en buffer de bloqueo. Luego se lavaron tres veces con buffer de lavado. Luego, se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo secundario y DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (0,5 μ g/mL) en buffer de bloqueo. Esto fue seguido por tres lavados y un lavado final con PBS. Los organoides se almacenaron en PBS a 4 °C sin medio de montaje y se visualizaron en un microscopio confocal LSM880 (Zeiss).

Las secciones embebidas en parafina se desparafinaron en xileno y se rehidrataron con alcoholes. Las láminas se incubaron durante 20 min en buffer EDTA 1 mM (pH 8,0) a 121

°C usando un 2100 Antigen Retriever. Tras el lavado con PBS, las láminas se bloquearon usando la solución BLOXALL (Vector Labs) durante 2 hs a RT. Los anticuerpos primarios diluidos en PBS se incubaron toda la noche con los cortes a 4 °C, y luego se agregaron los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos durante 60 min a RT en oscuridad. Los núcleos se tiñeron con DAPI a 1 μ g/mL durante 30 min. El montaje se realizó con el medio Vibrance Antifade (Vectashield). Las láminas teñidas fluorescentes se visualizaron en un microscopio confocal LSM880 (Zeiss, Alemania).

Anticuerpos primarios: Lyz1 (FisherScientific, Cat RB-372-A), dilución desde stock 1:200, Muc2 (CloudClone Corp, Cat PAA705Mu01) dilución desde stock 1:200.

Lectinas fluorocromadas: rGal-4 acoplado a PerCpCy.5 (Abcam) dilución desde stock 1:500.

Anticuerpos secundarios: anti-rabbit AF488 (Abcam ab 150077) dilución desde stock 1:500.

3.27. Análisis estadístico y representación gráfica de datos

Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism versión 9 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EE. UU.). Se utilizó un nivel de significancia (α , probabilidad de cometer error de tipo I) de 0,05 en todas las pruebas estadísticas realizadas.

4 Resultados

4.1. Caracterización bioquímica y funcional de Galectina-4 humana recombinante.

4.1.1. Expresión y purificación de Galectina-4

Con el objetivo de explorar el papel funcional de Galectina-4 humana (hGal-4), optimizamos su expresión recombinante y purificación en *Escherichia coli* BL21 (DE3). Basándonos en los resultados preliminares obtenidos durante mi tesis de licenciatura, donde la construcción de Gal-4 acoplada a una etiqueta de histidinas no mostró rendimientos satisfactorios, y siguiendo las estrategias descritas en literatura (Rustiguel et al. 2016; Nishi 2020), en esta tesis doctoral empleamos un constructo con la proteína de fusión SUMO en el vector pET-28a para la transformación, ya que se ha descrito que la fusión de proteínas recombinantes con SUMO puede favorecer su solubilización y estabilidad (Huang, Yang, y Lin 2024). La purificación se realizó utilizando dos enfoques complementarios: uno basado en la afinidad de las galectinas por la lactosa y otro en la afinidad de la etiqueta de histidina (His₆) por níquel (**Figura 10**). En la primera estrategia, se aprovecha la etiqueta de histidinas con la que se obtiene la proteína de fusión (His₆- SUMO-Gal-4) para su purificación, seguido de la escisión de SUMO por la proteasa ULP1. Post-hidrólisis, se vuelve a utilizar la columna de níquel para obtener rhGal-4 en el eluido inicial y la proteína de fusión SUMO se eluye con imidazol. En la segunda aproximación, se retiene la proteína de fusión por afinidad a lactosa, y se eluye por competencia con una solución de este disacárido (200 mM). La proteína de fusión así obtenida se escinde con ULP1 y se vuelve purificar en la misma columna, obteniendo SUMO en el eluido inicial (no retenida) y rhGal-4 por competencia con lactosa 200 mM. Ambas estrategias produjeron rendimientos comparables: 1,04 mg/100 ml de cultivo utilizando la columna de lactosil-sepharosa, y 1,28 mg/100 ml de cultivo utilizando la columna His-Trap, respectivamente.

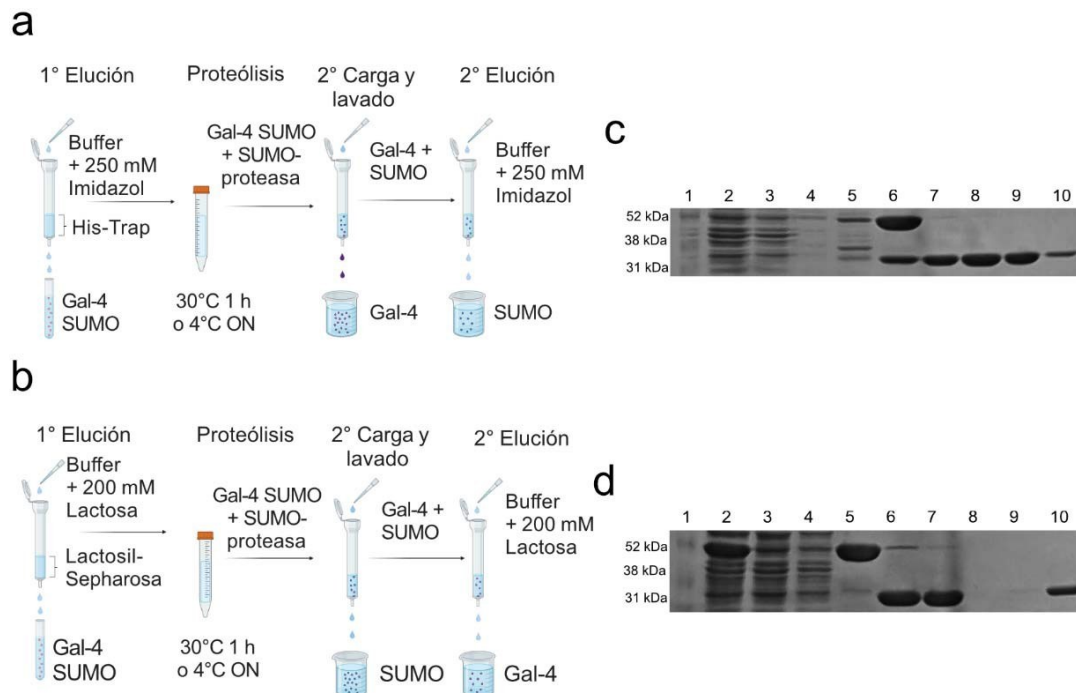


Figura 10. Purificación y evaluación de la actividad de rhGal-4. (a) Esquema del flujo de trabajo para la obtención de Gal-4 utilizando (a) una columna His-Trap o (b) una columna de lactosil-sepharosa. (c) Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñida por Coomassie Blue de las fracciones obtenidas durante la purificación por columna His-Trap: 1: marcador de peso molecular; 2: percolado inicial de la columna con 25 mM de imidazol; 3-5: lavados de la columna; 6: elución de His₆-SUMO-Gal-4 con 250 mM de imidazol; 7: fracción tras proteólisis con ULP1; 8: percolado de rGal-4 con imidazol 25 mM en la segunda columna; 9: lavado de la segunda columna; 10: SUMO y ULP1 eluyen en imidazol 250mM. (d) Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñida por Coomassie Blue de las fracciones obtenidas durante la purificación por columna de lactosil-sepharosa: 1: marcador de peso molecular; 2: sobrenadante del lisado de *E. coli*; 3: percolado inicial de la columna; 4: lavado; 5: elución de His₆-SUMO-Gal-4 con 200 mM de lactosa; 6: fracción tras proteólisis de SUMO con ULP1; 7: fracción 6 en buffer de siembra para la segunda cromatografía de afinidad por lactosa; 8: percolado de SUMO y ULP1 en la segunda columna; 9: lavado de la segunda columna; 10: elución de rGal-4 con 200 mM de lactosa. (Peso molecular del constructo His₆-SUMO-Gal-4: 47,30 kDa; PM de Gal-4: 36 kDa)

4.1.2. Determinación de la afinidad sacarídica de rGal-4

Con el objetivo de caracterizar la afinidad sacarídica de Gal-4 recombinante humana obtenida, realizamos ensayos de fase sólida (SPA) en los cuales inmovilizamos asialofetuína (una glicoproteína rica en N-glicanos complejos con residuos de *N*-acetil-lactosamina, ligandos canónicos de galectinas) y evaluamos la capacidad de diferentes oligosacáridos de competir con la misma por la unión de rhGal-4 (**Figura 11**). Analizamos para este ensayo un conjunto de 21 estructuras glicosídicas incluyendo tanto

oligosacáridos de leche humana (HMOs) como antígenos de grupos sanguíneos (BGAs). Gal-4 mostró una marcada preferencia por oligosacáridos con estructuras tipo grupo sanguíneo, los cuales presentan unidades de lactosa (Lac) o *N*-acetillactosamina (LacNAc) con $\alpha(1,2)$ -fucosilación del residuo galactosídico, incluyendo 2'-FL, BGA6, BGA1 y BGA2. Finalmente, las estructuras $\alpha(1,3)$ - o $\alpha(1,4)$ -fucosiladas no fueron competidores eficientes para la unión de Gal-4, mientras que la sialilación del residuo galactosídico en posición 3 o 6 prácticamente inhibió la unión de rhGal-4 (**Figura 11**).

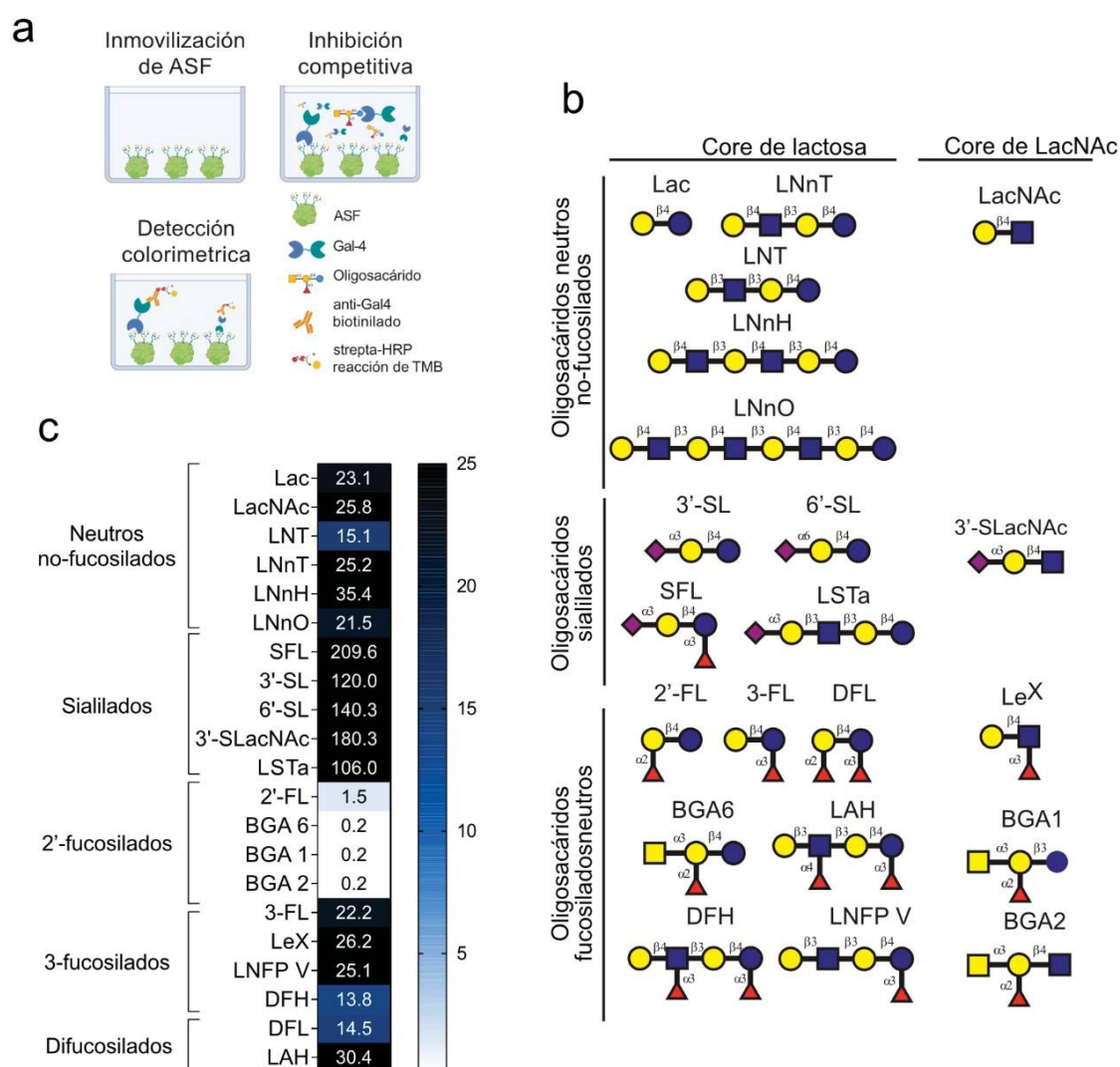
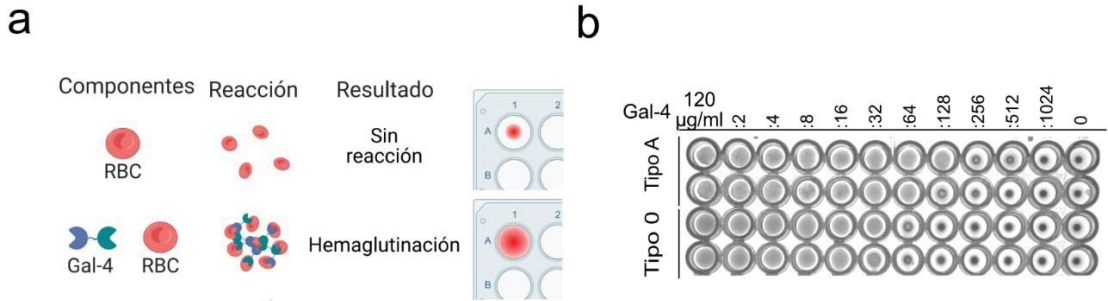


Figura 11. Ensayo de afinidad en fase sólida . (a) Esquema del ensayo. rGal-4 se une a los glicanos de la asialofetuína inmovilizada en las placas. Luego, la unión de rGal-4 es detectada por un anticuerpo anti-Gal-4, estreptavidina-HRP y TMB. **(b)** Estructura de los oligosacáridos seleccionados como posibles ligandos de rGal-4 siguiendo la nomenclatura de símbolos para glicanos (SNFG) (Neelamegham et al. 2019). **(c)** *Heatmap* que resume los datos obtenidos por ensayos de fase sólida para Gal-4. Se muestra la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) para cada ligando competitivo.

Para caracterizar en profundidad la actividad lectina de rhGal-4 realizamos un ensayo celular, en el cual evaluamos su actividad hemaglutinante con eritrocitos humanos de tipo A y tipo O (**Figura 12**). Gal-4 recombinante fue capaz de aglutinar eritrocitos de humanos tipo A tratados con tripsina a concentraciones de 0,5 µg/mL (dilución 1: 256, **Figura 12b**) o superiores. En contraste, se observó actividad hemaglutinante para los eritrocitos de tipo O a concentraciones de 2 µg/mL (dilución 1:64, **Figura 12b**) o superiores. Estos resultados destacan el reconocimiento preferencial de rGal-4 hacia antígenos del grupo sanguíneo A.



	2'-FL	130 ± 9	ND*	ND*
Gal-4	BGA2	65 ± 5	-25 ± 2	1,1 ± 0,2
	BGA6	51 ± 3	-32 ± 3	7,4 ± 0,6

Tabla 2. Evaluación por ITC de los parámetros termodinámicos de unión de rGal-4 hacia los tres mejores ligandos identificados previamente mediante SPA. ND: no determinado.

Dado que la proteína presentó problemas de estabilidad y pérdida de actividad al ser conservada en PBS, evaluamos diferentes condiciones para poder conservar la solubilidad y actividad de rhGal-4, esta última medida por hemaglutinación (**Tabla 3**).

Tabla 3. Efecto de las condiciones de almacenamiento de rhGal-4 sobre su actividad hemaglutinante. Se evaluaron ocho condiciones de almacenamiento para Gal-4 recombinante, como se describió en la **Sección 3.2 de Materiales y Métodos**. Brevemente, todas las condiciones contienen 50 mM HEPES pH 7,2 y 150 mM NaCl, y se combinan con: (1) 14 mM β-mercaptoetanol (β-ME); (2) 14 mM β-ME y 100 mM lactosa; (3) 14 mM β-ME y 25% PEG 6000; (4) 14 mM β-ME, 100 mM lactosa y 25% PEG 6000; (5) 4 mM TCEP; (6) 4 mM TCEP y 100 mM lactosa; (7) 4 mM TCEP y 25% PEG 6000; y (8) 4 mM TCEP, 100 mM lactosa y 25% PEG 6000. Los resultados se expresan como la dilución de una solución de rhGal-4 120 ug/ml límite a la cual se observa actividad hemaglutinante..

Condición	1	2	3	4	5	6	7	8
A: 4°C	31,25	125	62,5	31,25	125	259	62,5	125
B: -20°C	15,6	125	62,5	31,25	250	125	62,5	125
C: Liofilización	31,25	250	>250	>250	125	125	125	125

Los resultados obtenidos demuestran que la actividad lectina se mantuvo de manera más eficiente cuando rhGal-4 fue almacenada en la condición 1 (50 mM HEPES pH 7,2, 150 mM NaCl, 14 mM β-mercaptoetanol). En este buffer específico, rGal-4 muestra la mayor actividad en ensayos de hemaglutinación al ser almacenada a -20 °C. En esta condición se pudo además liofilizar rGal-4 sin pérdida importante de actividad, lo que facilita su almacenamiento y transporte.

4.1.3. Determinantes atomísticos de la interacción entre Gal-4 y glicanos

Con el objetivo de identificar los determinantes atomísticos responsables de la interacción entre Gal-4 y BGA6, evaluamos ambos CRD de Gal-4 humana en complejo con este glicano. En las simulaciones de dinámica molecular (MD), se observaron posibles interacciones de enlaces de hidrógeno (HB, por sus siglas en inglés) entre el núcleo de lactosa de BGA6 y los residuos His63, Arg67, Asn77 y Glu87 de Gal-4N (**Figura 13a**), además de interacciones CH-π con Trp84. No se observaron HB entre los grupos OH de

la fucosa, ya que este residuo estaba orientado hacia el solvente. Además, se observaron interacciones favorables entre el residuo α GalNAc y los residuos de aminoácidos Arg45, Asn65 y Trp84. Para el complejo Gal-4C-BGA6, las simulaciones de MD mostraron HB conservados entre el núcleo de lactosa tipo II de BGA6 y los residuos de aminoácidos His236, Asn238, Arg240, Asn249, Trp256 y Glu259 (**Figura 13b**), además de la interacción CH- π de la galactosa central con Trp256. De manera similar al complejo Gal- 4N-BGA6 descrito anteriormente, no se observaron HB para los grupos OH de la fucosa, estando este residuo orientado hacia el solvente. Además, la unidad terminal GalNAc presentó varios HB, incluyendo no solo aquellos con Trp256, Asn238 y Ser220.

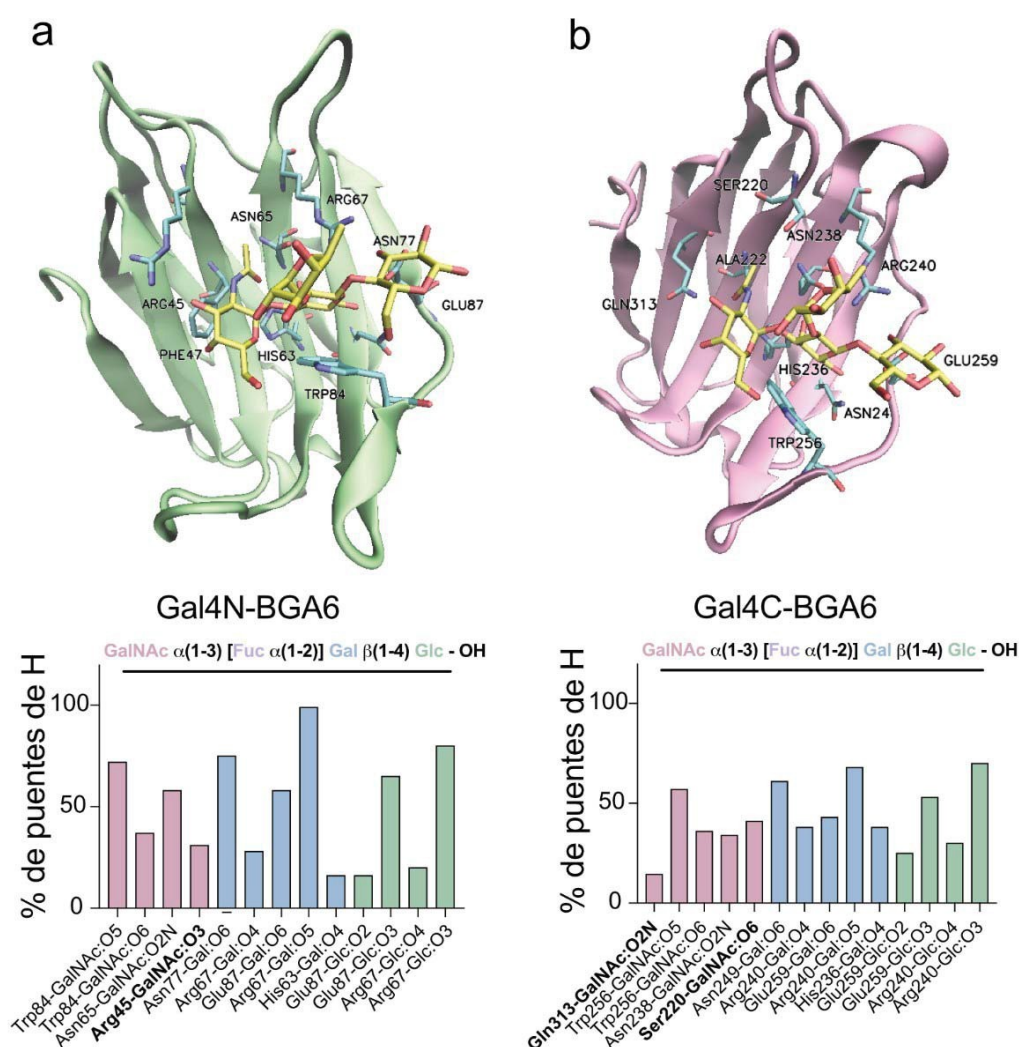


Figura 13. Simulaciones de dinámica molecular (MD) de los complejos (a) Gal-4N-BGA6 y (b) Gal-4C-BGA6. Los dominios CRD de Gal-4 se representan en formato *new cartoon*, mientras que BGA6 se muestra en formato de *licorice*. Las interacciones clave de enlaces de hidrógeno (HB) para los complejos Gal-4N-BGA6 y Gal-4C-BGA6 (a y b, respectivamente) se obtuvieron mediante simulaciones MD. Los gráficos de barras muestran la frecuencia de enlaces de hidrógeno considerando los donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, separados por un guion ("-"). Los residuos de aminoácidos no conservados se destacan en negra.

4.1.1.El papel del *linker* en la interacción Gal-4-glicanos

Estudios previos han propuestos que la arquitectura dimérica covalente de las galectinas de tipo tándem les confiere un capacidad particular que permite su interacción con ligandos multivalentes. Considerando que no existen aún estructuras cristalinas determinadas para ninguna de las galectinas humanas de tipo tándem (Gal-4, -8, -9 y -12), y con el objetivo de investigar el papel del *linker* en la actividad lectina de Gal-4, construimos tres modelos de Gal-4 humana completa (*full-length*, FL) por homología utilizando herramientas computacionales.

Para el primer modelo, se realizó una predicción estructural *ab initio* del péptido *linker* utilizando el servidor Robetta, y luego, utilizando Modeller, el *linker* fue ensamblado como una única cadena polipeptídica entre las estructuras cristalinas publicadas de Gal-4N y -4C. Para el segundo modelo, se generó una estructura de Gal-4 sin templado estructural del péptido *linker*, para lo cual, utilizando la secuencia aminoacídica del linker, se ensamblaron las estructuras cristalográficas de Gal-4N y -4C, directamente con Modeller. Para el tercer modelo, se empleó Alpha Fold V2 (Varadi et al. 2022), un sistema de inteligencia artificial que predecir estructuras tridimensionales de proteínas a partir de secuencias de aminoácidos con precisión atómica, implementado en ColabFold (Mirdita et al. 2022), para predecir la estructura de Gal-4 completa a partir de su secuencia aminoacídica.

Estos modelos por homología se realizaron en colaboración con el Dr. Santiago Di Lella (IQUIBICEN-CONICET). Las conformaciones finales obtenidas varían entre las tres estrategias empladas (**Figura 14a-c**). Teniendo en cuenta la disposición de las caras de los DRCs, el tercer modelo, construido con AlphaFold V2, mostró una mayor congruencia con la estructura cristalina disponible de Gal-8 mutante, en la cual el *linker* fue reemplazado por un dipéptido His-Met (Yoshida et al. 2012), así como también con el modelo de Gal-1 en su forma dimérica (Romero et al. 2016) (**Figura 14a-c**). En la región de contacto entre ambos DRCs, se observó la presencia característica de interacciones hidrofóbicas, particularmente mediante de residuos Lis y Val (**Figura 14d**).

Sin embargo, es importante destacar que las tres conformaciones podrían ser posibles debido a la alta flexibilidad del *linker* y podrían coexistir en la naturaleza.

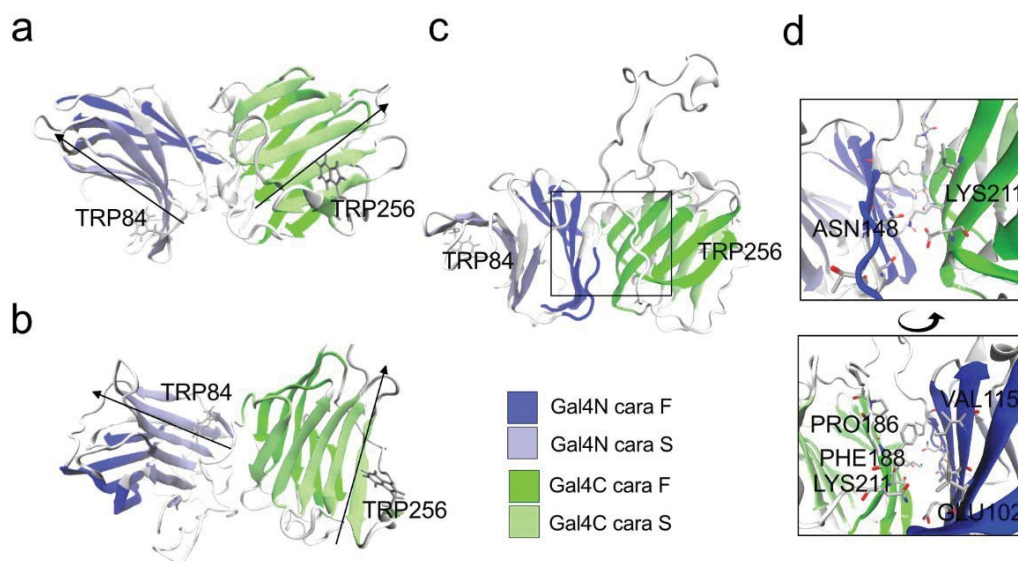


Figura 14. Modelos moleculares de Galectina-4 construidos con **(a)** un modelo templado del *linker* (Robetta y Modeller), **(b)** sin modelo templado del *linker* (Modeller), **(c)** AlphaFold V2. Las flechas indican el sentido de las caras S y F desde el residuo conservado de Trp de cada DRC. **(d)** Ampliación de la zona de contacto entre los DRC para el modelo construido con AlphaFold V2. Los residuos claves involucrados en la interacción entre los DRC se encuentran resaltados.

Posteriormente, realizamos estudios de *docking* molecular con el tercer modelo de Gal-4 *full-length* (FL), realizado con AlphaFold V2, y utilizando BGA6 como ligando, ya sea en el dominio N- (NBGA6) o C-terminales (CBGA6), o en ambos dominios simultáneamente (2BGA6) (**Figura 15a**).

En todos los casos, nuestros resultados indican que los residuos de Gal y GalNAc de BGA6 son los que principalmente interaccionan con los aminoácidos de Gal-4. Al analizar el DRC N-terminal, la mayoría de los enlaces de hidrógeno se mantuvieron cuando la proteína fue simulada con uno (NBGA6) o ambos DRC ocupados (2BGA6), si bien se observaron algunos enlaces propios de la simulación del complejo NBGA6, tales como Asn77-Glc:O3 y Hie63-GalNAc:O6.

Por otro lado, para el dominio C-terminal, en la mayoría de los enlaces de hidrógeno determinados, se observó un aumento en su frecuencia cuando el BGA estaba presente en ambos dominios (2BGA6), en comparación con el complejo con BGA6 unido sólo al DRC C-terminal (CBGA6) (**Figura 15b**). Asimismo, se encontraron determinados enlaces de hidrógeno solamente en la simulación del complejo CBGA6, incluyendo Asn249-Glc:O3, Ser220-GalNAc:O2N, Hie236-GalNAc:O2N y Hie236-GalNAc:O6.

Finalmente, algunos enlaces de hidrógeno específicos se observaron sólo cuando el ligando estaba presente en ambos dominios (2BGA6), tales como Glu87-Glc:O3, Hie236-Gal:O6, Asn249-Gal:O6 y Trp256-GalNAc:O6.

A continuación, al analizar los enlaces de hidrógeno entre los dos dominios N- y C-terminales durante las 3 simulaciones de MD (NBGA6, CBGA6 y 2BGA6), no encontramos diferencias considerables, observándose en los tres casos interacciones conservadas entre residuos de ambos DRCs, incluyendo Tyr9-Asp275, Asn148-Tyr320, Thr12-Asn290 y Glu102-Ser319 (**Figura 15b**)

Por otro lado, analizamos los enlaces de hidrógeno entre los dos DRC de Gal-4 y el linker, comparando entre las 3 simulaciones de MD, NBGA6, CBGA6 y 2BGA6. Al igual que para las interacciones entre los 2 DRCs, no encontramos diferencias considerables entre las tres simulaciones (**Figura 15b**). Llamativamente, sólo se observaron enlaces de hidrógeno entre el dominio C-terminal y el linker.

Finalmente, analizamos los contactos entre ambos DRCs y BGA6 para las tres simulaciones (NBGA6, CBGA6 y 2BGA6), definidos como aquellos átomos de la proteína y el glicano que se encuentran a distancias menores a 4,5 Å. Observamos que cuando BGA6 estaba presente en ambos extremos (2BGA6), el modelo completo de Gal-4 mostró un mayor número de contactos, en particular en comparación con los observados para CBGA6 (**Figura 15c**). Esto podría sugerir la posibilidad de interacciones interdominio cooperativas que estabilizan la unión de BGA6 al extremo C-terminal cuando el mismo también está presente en el dominio N-terminal.

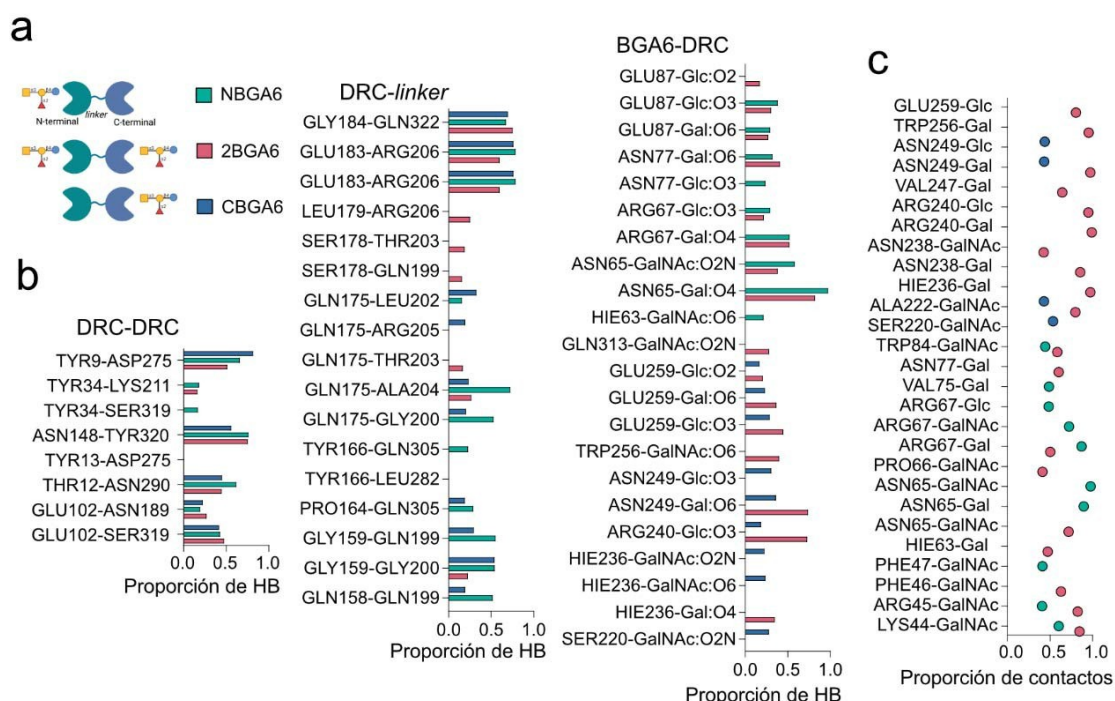


Figura 15. Simulaciones de dinámica molecular de Galectina-4 de longitud completa (FL) en complejo con el glicano BGA6 (a) en los dominios N-terminal (NBGA6), C-terminal (CBGA6) o en ambos dominios (2BGA6). **(b)** Gráficos de barras que representa el análisis de los enlaces de hidrógeno entre ambos DRCs (panel izquierdo), los DRCs y el *linker* (panel central), y BGA6 y los aminoácidos de Gal-4 (panel derecho). Cuando se detectaron múltiples puentes de hidrógeno, se representaron en una sola barra. **(c)** El gráfico de puntos muestran la frecuencia de los contactos más frecuentes (<4,5 Å) entre los glicanos y los aminoácidos de Gal-4. Cada punto representa un contacto.

4.1.2. Estudios de ¹H-STD-NMR para ligandos selectivos de Gal-4

En colaboración con el Laboratorio del Dr. Jesús Jiménez Barbero y la Dra. Ana Ardá (CICbioGUNE, España) decidimos ampliar los estudios de afinidad de Gal-4 por oligosacáridos α(1,2)-fucosilados en el residuo de galactosa (como 2'-FL, BGA2 y BGA6) mediante experimentos de RMN, particularmente RMN ¹H-STD (*Saturation Transfer Difference*) (**Figura 16**). Para los tres ligandos analizados, el residuo central de βGal constituye el principal epítipo de unión de Gal-4. Además, el residuo adicional de αGalNAc presente en BGA6 y BGA2, en particular los protones H1, H2 y el metilo del grupo NHAc, también interactúan con la superficie de la proteína. En contraste, y en concordancia con las simulaciones de dinámica molecular descritas anteriormente (**Sección 4.1.3, Figura 13**), los protones de la fracción de Fuc no mostraron intensidades significativas de STD, indicando que este residuo no forma parte del epítipo de unión para ninguno de los ligandos analizados.

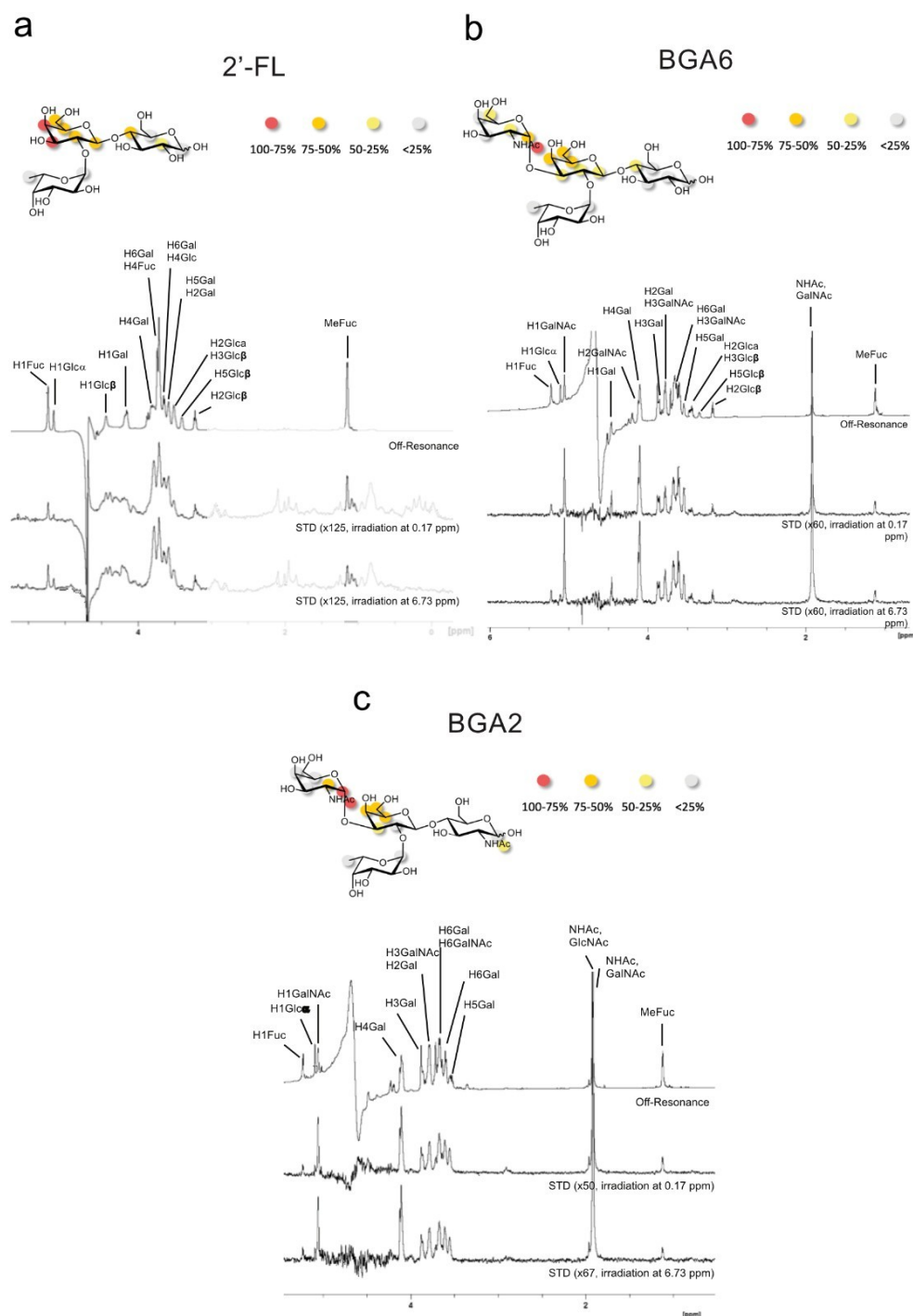


Figura 16. Espectros de RMN- ^1H STD para los complejos de rGal-4 con (a) 2'-FL, (b) BGA6 y (c) BGA2. Panel superior: mapeo del epítipo para cada oligosacárido determinado basado en irradiación a 0,17 ppm. Los círculos indican las posiciones cuyas intensidades de STD son reportadas (normalizadas contra la STD más intensa) y están codificados por colores según esta intensidad normalizada. Panel inferior: espectros de una solución de oligosacárido 2,5 mM en presencia de 50 μM de rGal-4 (relación 50:1). Primer espectro: espectro de referencia con anotaciones para las señales que muestran intensidad de STD; segundo espectro: espectro STD con irradiación de la proteína en la región alifática (0,17 ppm); tercer espectro: espectro STD con irradiación de la proteína en la región aromática (6,73 ppm). (0,17 ppm); tercer espectro: espectro STD con irradiación de la proteína en la región aromática (6,73 ppm).

4.1.3. Gal-4 estimula la secreción de IL-6

En secciones anteriores de esta Tesis, se demostró la afinidad de rhGal-4 por BGA6 y su potencial como inhibidor selectivo de Gal-4 mediante ensayos de fase sólida, hemaglutinación e ITC. Teniendo en cuenta la capacidad de esta lectina de inducir la producción de IL-6 en linfocitos T (Hokama et al. 2004), decidimos evaluar si BGA6 era también un inhibidor eficiente de la secreción de esta citoquina de alta relevancia inmunológica, particularmente en inflamación.

En experimentos con células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) humanas aisladas de *buffy coats* (**Sección 3.10, Materiales y Métodos**) y activando los linfocitos T mediante incubación con anti-CD3 y anti-CD28 (**Sección 3.11, Materiales y Métodos**), Gal-4 indujo un aumento significativo y dosis dependiente de la secreción de IL-6 (**Figura 17**). Estos resultados sugieren que BGA6 actúa como un inhibidor de esta actividad proinflamatoria de Gal-4, bloqueando la secreción de IL-6 mediada, y que el mecanismo asociado a la secreción de IL-6 es dependiente de su actividad de lectina.

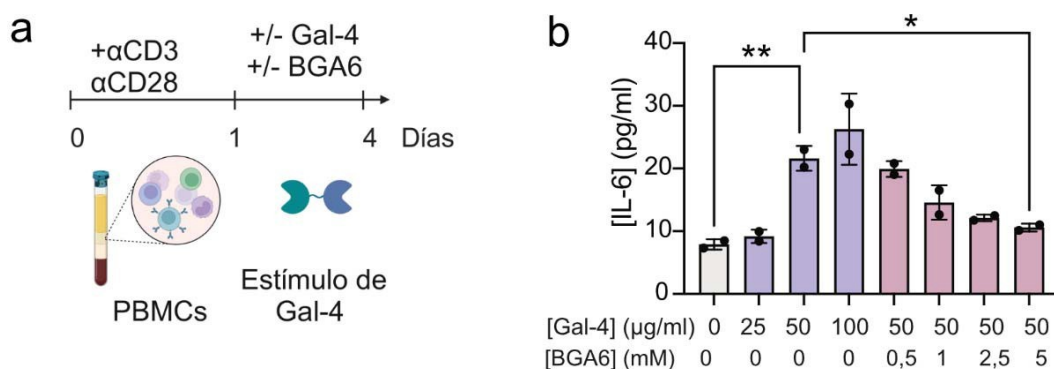


Figura 17. Ensayo de estimulación de PBMCs con Gal-4 (a) Esquema del experimento en presencia o ausencia de BGA6. **(b)** La secreción de IL-6 se determinó mediante ELISA en sobrenadantes de las células en cultivo. (ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Tukey). Los puntos individuales representan réplicas biológicas independientes. Los datos se presentan como medias $\pm$ SEM y son representativos de dos experimentos independientes. *P < 0,05 y **P < 0,01.

4.1.4. Conclusiones del capítulo

En este capítulo, logramos optimizar la expresión recombinante de Gal-4 humana utilizando el vector pET-28a en *Escherichia coli*, su purificación mediante cromatografía de afinidad y las condiciones de almacenamiento para mantenerla activa, prolongar su vida útil y facilitar su transporte.

Los estudios de afinidad sacarídica tanto por ensayos de fase sólida como por ITC revelaron una marcada preferencia de Gal-4 por oligosacáridos de tipo antígenos sanguíneos. Las simulaciones de dinámica molecular y los experimentos de RMN identificaron las interacciones clave responsables de la unión, destacando la importancia del núcleo de lactosa y del residuo terminal α GalNAc en la interacción con Gal-4. Por otro lado, el residuo fucosa de estos oligosacáridos no contribuyó significativamente al epítipo de unión, ya que está orientado hacia el solvente. Este resultado fue sorprendente, dada la afinidad selectiva de rGal-4 por oligosacáridos $\alpha(1,2)$ -fucosilados.

Desde un punto de vista funcional, rhGal-4 mostró capacidad para inducir la secreción de IL-6, confirmando su papel proinflamatorio. BGA6 demostró ser un inhibidor efectivo de esta actividad, suprimiendo la producción de IL-6 de forma dependiente de la dosis y demostrando que esta actividad proinflamatoria de Gal-4 es carbohidrato-dependiente.

4.2. Galectina-4 y su papel en inflamación intestinal

4.2.1. *LGALS4* está disminuida en células epiteliales de pacientes con colitis ulcerosa

Con el objetivo de corroborar la desregulación de Gal-4 en EII (Block et al. 2016; Papa Gobbi et al. 2016) (Papa Gobbi et al, 2016), estudiamos datos de microarrays provenientes de biopsias de pacientes con colitis ulcerosa (CU) (GSE16879, GSE73661). Al analizar genes diferencialmente expresados (*DEGs*), encontramos que el tejido inflamado presenta una disminución significativa en la expresión de Gal-4 (*LGALS4*) en comparación con individuos sanos (GSE16879: adj-pval=1,04E⁻⁰⁵, avg-log₂FC=- 0,74768; GSE73661: adj-pval=0,049423, avg-log₂FC=-0,66698) (**Figura 18a**). Además, cuando analizamos las células epiteliales provenientes de datos de *single cell* RNA (*scRNAseq*) de pacientes con CU y donantes sanos (Garrido-Trigo et al. 2023), los resultados mostraron que esta disminución de Gal-4 está estrictamente relacionada con este compartimento (adj-pval=4,99e-68, avg-log₂FC=-0,69) (**Figura 18b**).

Considerando estos resultados, investigamos las consecuencias funcionales de su ausencia utilizando como modelo ratones con delección específica de Gal-4 en células epiteliales (*CreVillina*^{+/-} *Flox4*^{+/+}, *Gal4*^{ΔIEC}, **Figura 18b**). Dada la relevancia de la microbiota en estas patologías (Shan, Lee, y Chang 2022), los experimentos se realizaron con animales compañeros de camada (*littermates*) de la generación F2 con la delección de Gal- 4 (*Gal4*^{ΔIEC}) y sin la delección (*CreVillina*^{-/-} *Flox4*^{+/+}, *Gal4*^{fl/fl}), criados en la misma jaula para minimizar las variaciones en la microbiota. Decidimos inicialmente, realizar nuestros ensayos con hembras, ya que los machos suelen volverse agresivos con otros machos cuando alcanzan la madurez sexual (Deacon 2006).

En primer lugar, validamos el fenotipo de los animales transgénicos comparando ratones *Gal4*^{ΔIEC} y ratones *Gal4*^{fl/fl} por RT-qPCR, y demostrando una disminución en los niveles de RNA mensajero de *Lgals4* en el epitelio de los ratones *Gal4*^{ΔIEC} (*p*-val=0,0042) (**Figura 18c**). La expresión de la proteína también fue evaluada mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-Gal-4 (**Figura 18d**).

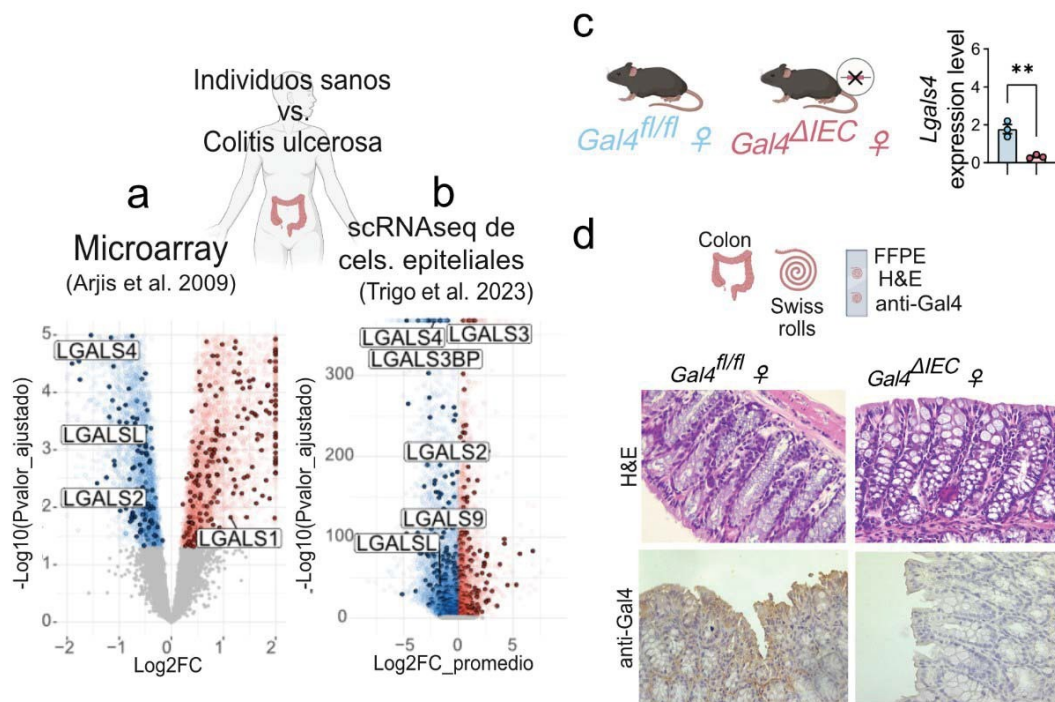


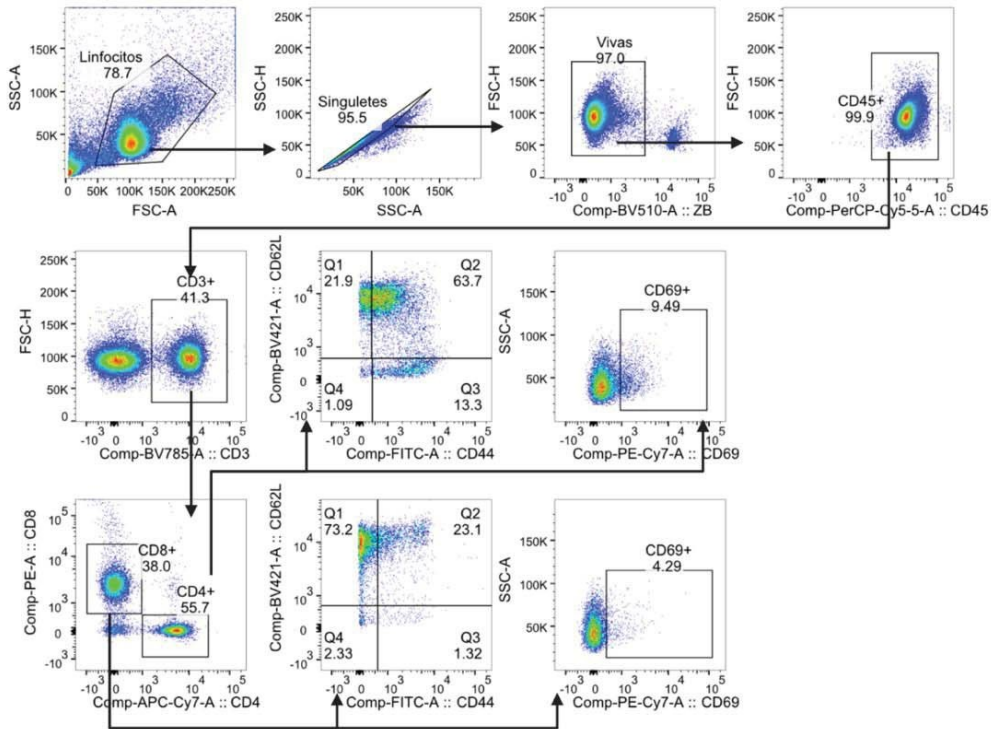
Figura 18. Análisis de expresión diferencial de Gal-4 en biopsias inflamadas de CU, en comparación con individuos sanos, **(a)** de datos de microarray o **(b)** scRNAseq de células epiteliales. Se resaltan el gen de Gal- 4 (*LGALS4*, foco de esta tesis) y *LGALS1*, que condice con lo previamente obtenido en literatura (Morosi et al. 2021). **(c)** Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de *Lgals4* en muestras de colon obtenidas de ratones *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* (Prueba de t-student), * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. **(d)** Muestras histológicas obtenidas de ratones *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}*, teñidas con hematoxilina/eosina o mediante inmunohistoquímica con anti-Gal-4.

Teniendo en cuenta que los linfocitos T son claves en el desarrollo de la inflamación intestinal, y que la mayor parte de la literatura sobre el papel de esta lectina en modelos de colitis se enfocan justamente en el compartimento T (Hokama et al. 2004; Paclik, Danese, et al. 2008; Nishida et al. 2012), comparamos la proporción de subpoblaciones de células CD4^+ y CD8^+ en los ganglios mesentéricos de ratones sanos no tratados *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}*. Para ello, empleamos anticuerpos para detectar subpoblaciones efectoras ($\text{CD44}^+ \text{CD62L}^-$), de memoria ($\text{CD44}^+ \text{CD62L}^+$) y naive ($\text{CD44}^- \text{CD62L}^-$), así como células residentes en el intestino (CD69 , CD103). No encontramos diferencias cuando se los compararon ambos genotipos en homeostasis (**Figura 19**).

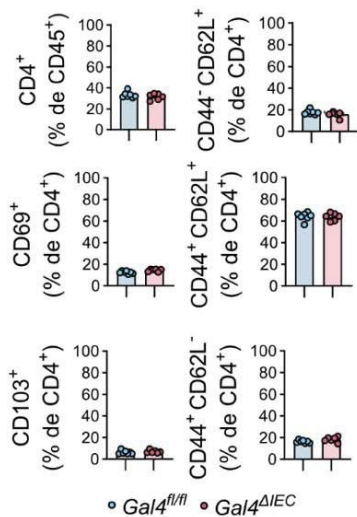
Asimismo, considerando que se ha descripto un papel relevante de Gal-4 en la diferenciación de macrófagos a monocitos (Hong et al. 2019; Lee et al. 2023), y la ausencia de literatura con respecto al eje Gal-4-linfocitos B, decidimos también evaluar las proporciones de éstas células en ganglios mesentéricos de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}*. Para ello empleamos marcadores como CD11b , CD11c y CD45 para caracterizar macrófagos, monocitos y células dendríticas; Ly6C , Ly6G para distinguir entre monocitos inflamatorios ($\text{Ly6C}^{\text{high}}$) y neutrófilos (Ly6G^+); CD19 y B220 para identificar linfocitos B; CD86 , MHCII , para evaluar el estado de activación de células presentadoras de antígeno,

y CD138, como marcador de células plasmáticas. Sin embargo, nuestros resultados no arrojaron diferencias significativas entre los animales *Gal4^{ΔIEC}* y los *Gal4^{fl/fl}* en homeostasis (**Figura 20**).

a



b



c

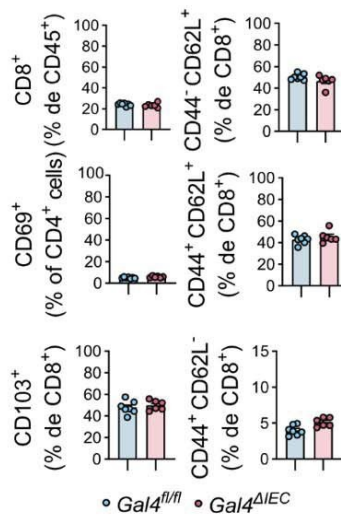


Figura 19. Composición del compartimento T en ganglios mesentéricos de animales sanos no tratados $Gal4^{fl/fl}$ y $Gal4^{\Delta IEC}$. (a) Estrategia de *gating* para linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$. (b) Proporción de linfocitos T $CD4^+$ y (c) linfocitos $CD8^+$. Se indican los porcentajes de estas poblaciones dentro de las células indicadas entre paréntesis respecto a las células vivas. Se representan los valores individuales y la media $\pm$ SD de un experimento realizado con 5-6 ratones por grupo experimental, prueba de t-student, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

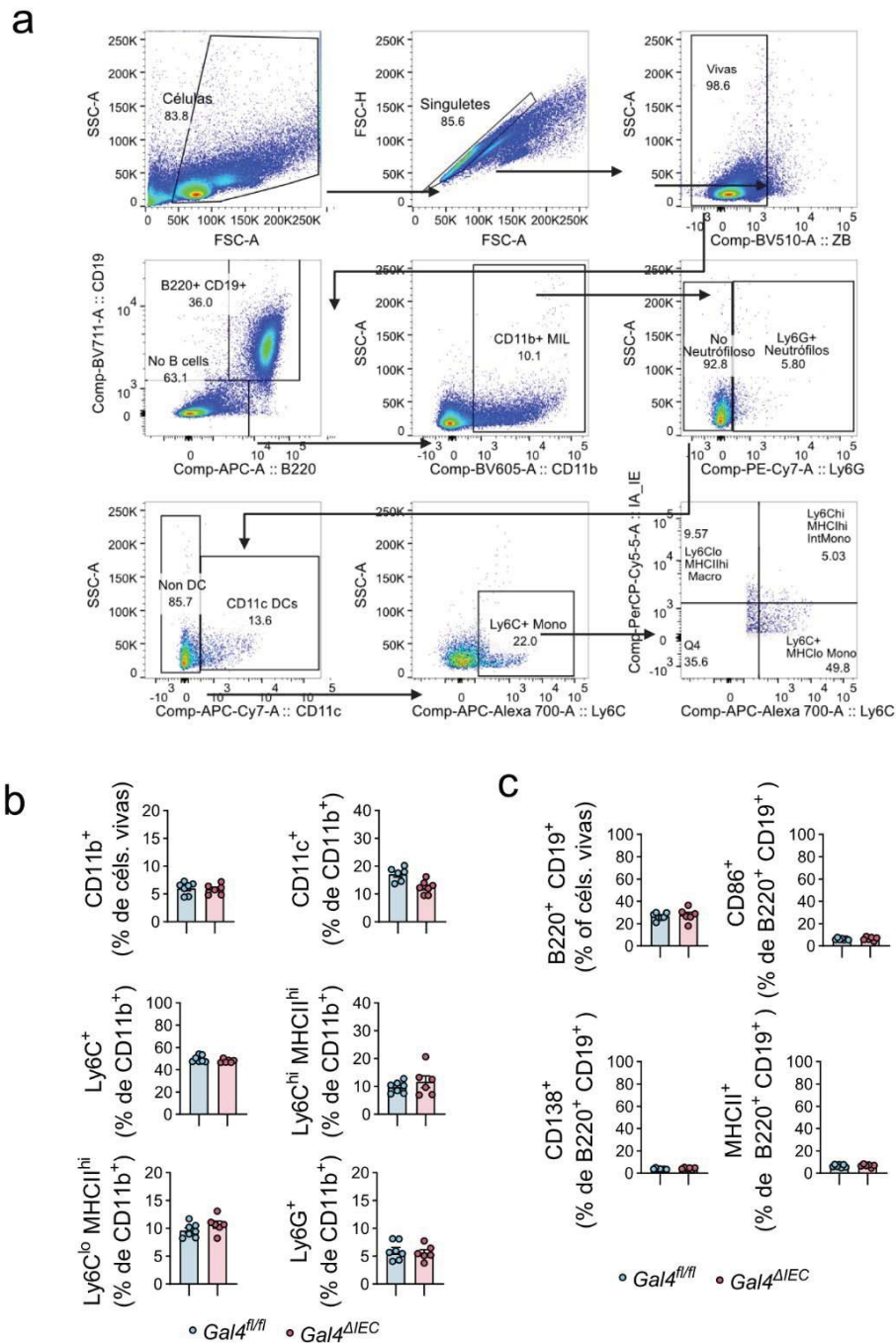


Figura 20. Los linfocitos B y las células mieloides en ganglios mesentéricos de animales $Gal4^{fl/fl}$ y $Gal4^{\Delta IEC}$ no presentan diferencias significativas. (a) Estrategia de *gating* para linfocitos B y células mieloides. (b) Proporción de linfocitos B y (c) células mieloides. Se indican los porcentajes de estas poblaciones dentro de las células indicadas entre paréntesis respecto a las células vivas. Se representan los valores individuales y la media $\pm$ SD de un experimento realizado con 5-6 ratones por grupo experimental (Prueba de t-student) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2.1. La ausencia de Gal-4 epitelial no altera la pérdida de peso por inflamación intestinal aguda

Una vez caracterizados los animales transgénicos $Gal4^{\Delta IEC}$ sanos, decidimos evaluar cómo afecta la ausencia de Gal-4 en el epitelio intestinal en un modelo de inflamación intestinal aguda inducida por DSS, como fue descrito en materiales y métodos (**Sección 3.14.2.1**). Al recibir DSS mediante el agua de bebida, ambos genotipos, $Gal4^{fl/fl}$ y $Gal4^{\Delta IEC}$, presentaron mayor pérdida de peso, un aumento en el cociente peso/largo del colon y un aumento en los niveles séricos de lipocalina-2 (LCN2, un marcador asociado a la actividad de neutrófilos e inflamación), en comparación con los ratones no tratados, lo que demuestra la inducción de inflamación aguda (**Figura 21**).

Luego, al comparar los 2 genotipos, los ratones $Gal4^{\Delta IEC}$ tratados con DSS no mostraron mayor pérdida de peso ni cambios en la relación peso/largo del colon en comparación con ratones $Gal4^{fl/fl}$. Sin embargo, en el suero de ratones sin Gal-4 en el epitelio intestinal ($Gal4^{\Delta IEC}$), detectamos niveles más bajos de lipocalina-2 (LCN2) que los compañeros de camada $Gal4^{fl/fl}$ (**Figura 21d**), lo que nos llevó a hipotetizar que si bien la eliminación de Gal-4 en el epitelio no es capaz de modular la inflamación a nivel de marcadores macroscópicos como el peso/largo de colon o la pérdida de peso, podría estar afectando la actividad de los neutrófilos.

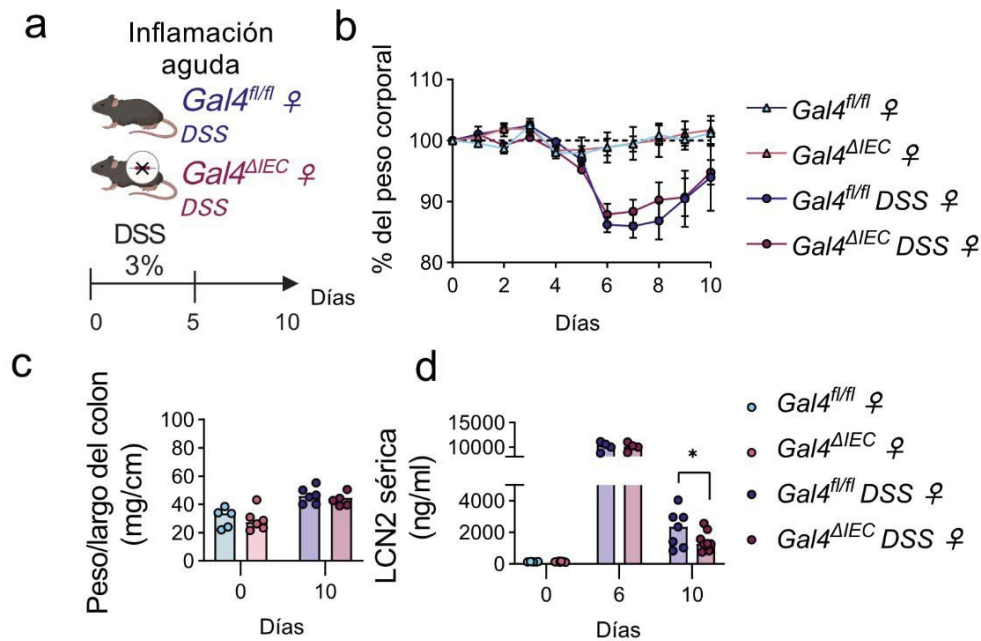


Figura 21. Modelo agudo de inflamación aguda inducida por DSS. (a) Esquema ilustrativo del modelo. (b) Curva de porcentaje del peso perdido por animales tratados (DSS) o no (ANOVA de 2 factores). (c) Relación peso/largo del colon (Prueba de t-Student). (d) Concentración de lipocalina-2 (LCN2) en suero (Prueba de t-Student). Se representan los valores individuales y/o la media $\pm$ SD de un experimento representativo realizado con 5-6 ratones por grupo experimental, excepto para LCN2 que los valores corresponden a dos experimentos
 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A continuación, cuando examinamos la proporción de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, linfocitos B y células mieloides en los ganglios mesentéricos de animales con inflamación aguda, observamos un aumento significativo en la población de CD4⁺ memoria (CD44⁺CD62L⁺) en los animales *Gal4^{ΔIEC}* comparados con los *Gal4^{fl/fl}* **Esto sugiere** un impacto específico en la activación, proliferación o diferenciación de estos linfocitos T en el intestino inflamado. Este aumento está localizado en los ganglios mesentéricos, ya que no se refleja en sangre periférica ni tampoco en la lamina propia (resultados no mostrados).

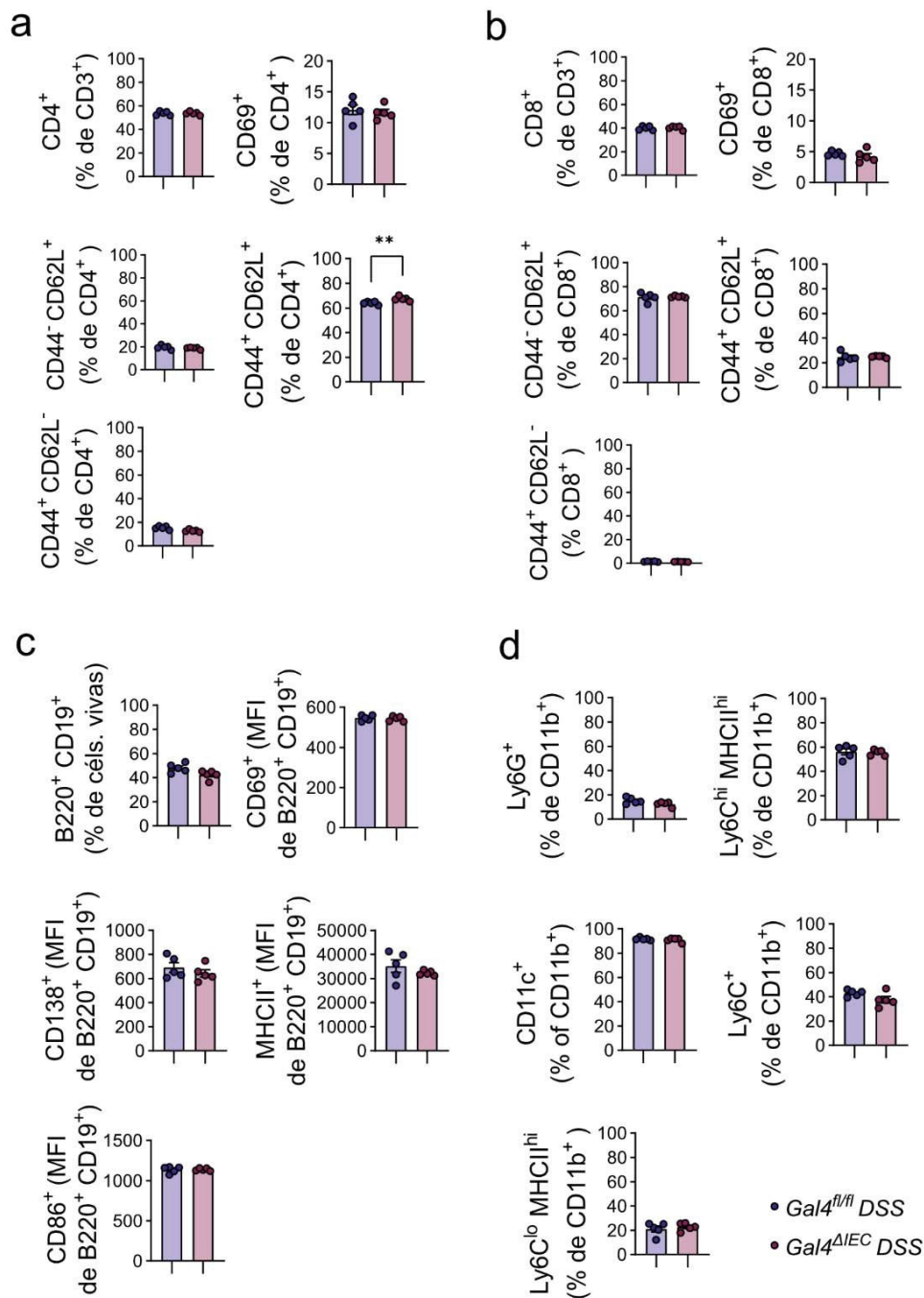


Figura 22), lo cual no se reflejó en la proporción de esta células en sangre periférica (**Figura 23**). Esto sugiere un impacto específico en la activación, proliferación o diferenciación de estos linfocitos T en el intestino inflamado. Este aumento está localizado en los ganglios mesentéricos, ya que no se refleja en sangre periférica ni tampoco en la lamina propia (resultados no mostrados).

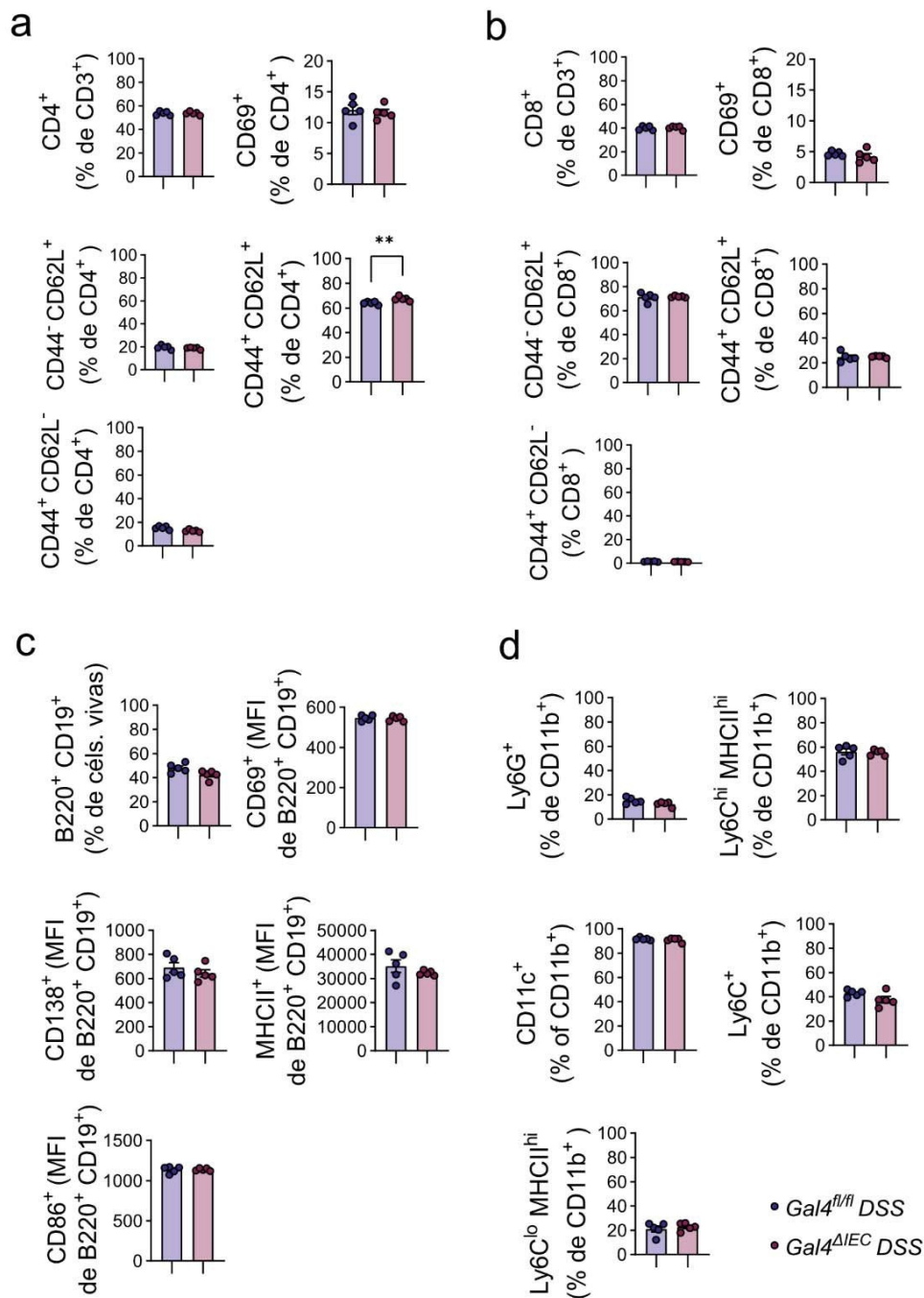


Figura 22. Composición inmune de ganglios mesentéricos de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* con inflamación aguda inducida por DSS. (a) linfocitos T CD4⁺, (b) linfocitos T CD8⁺, (c) linfocitos B y (d) células mieloides. Se representan los valores individuales y la media $\pm$ SD de un experimento representativo (N de experimentos = 2) realizado con 5-6 ratones por grupo experimental (Prueba de t-student) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

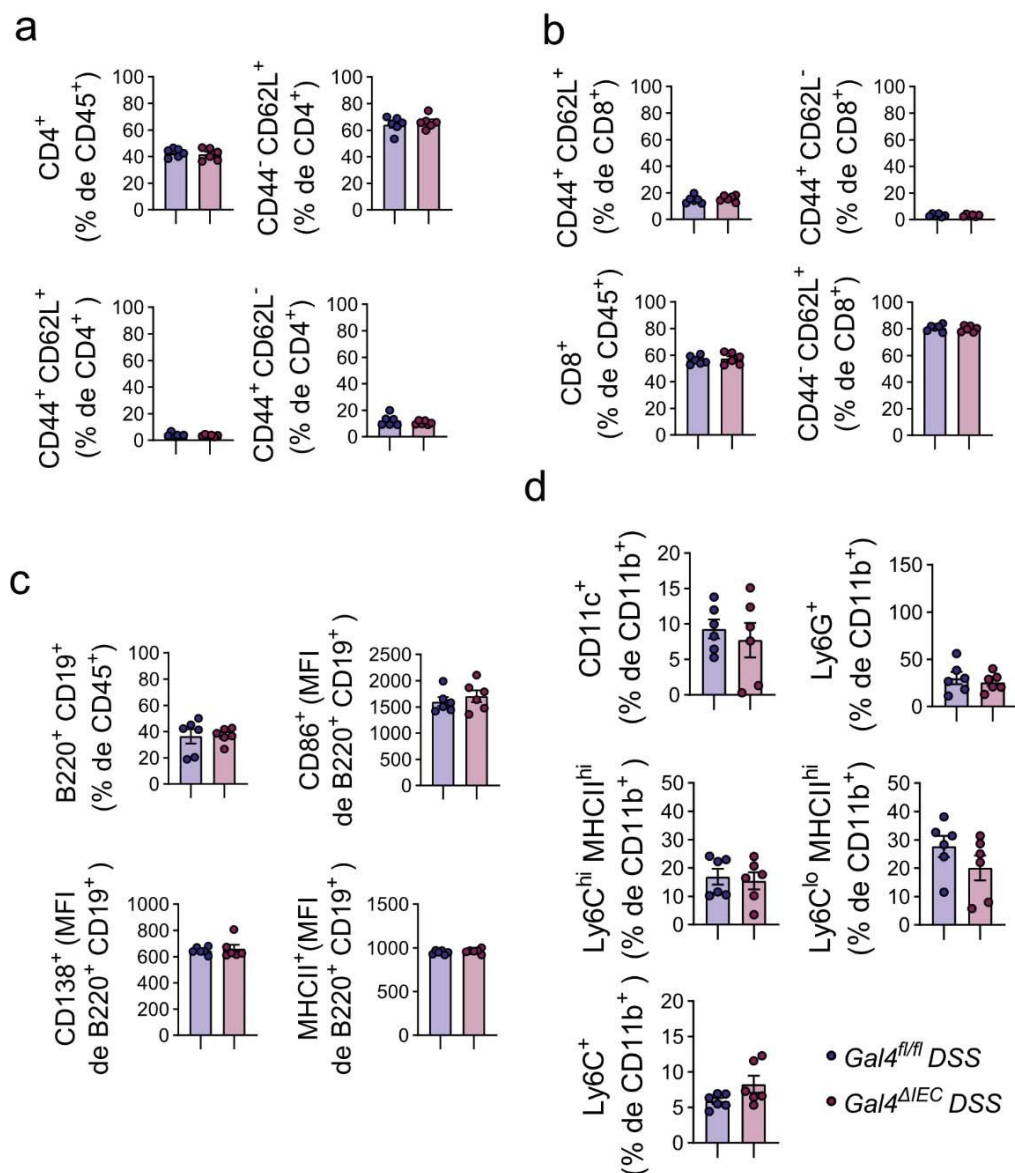


Figura 23. Composición inmune en sangre periférica de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{AIEC}* con inflamación aguda inducida por DSS. (a) Linfocitos T CD4⁺, (b) linfocitos T CD8⁺, (c) linfocitos B y (d) células mieloides. Se representan los valores individuales y la media $\pm$ SD de un experimento representativo (N de experimentos = 2) realizado con 5-6 ratones por grupo experimental (Prueba de t-student), *p<0,05, **p<0,01, *p<0,001.**

4.2.2. La ausencia de Gal-4 epitelial no afecta las diferencias por sexo en inflamación intestinal aguda

Para determinar si existían diferencias en la respuesta a la inflamación aguda entre machos y hembras deficientes en Gal-4, realizamos un ensayo comparativo. En concordancia con estudios en animales WT (C57BL/6), en donde los machos presentaron una mayor sensibilidad al modelo de inflamación intestinal inducida por DSS (Bábíčková

et al. 2015; Pace et al. 2024), los machos mostraron una mayor pérdida de peso tras el tratamiento con DSS, independientemente de su genotipo (**Figura 24**). Estos resultados indican que la delección de Gal-4 en el epitelio intestinal no parece alterar las diferencias asociadas al sexo de los animales en cuanto a la sensibilidad al tratamiento con DSS ya descritas en la literatura. Además, comparando los ratones machos de ambos genotipos, los ratones *Gal4^{ΔIEC}* presentaron una mayor relación peso/largo del colon en comparación con su contraparte *Gal4^{fl/fl}*, lo que indicaría que presentan una mayor inflamación por la ausencia de Gal-4 en el epitelio intestinal (**Figura 24**).

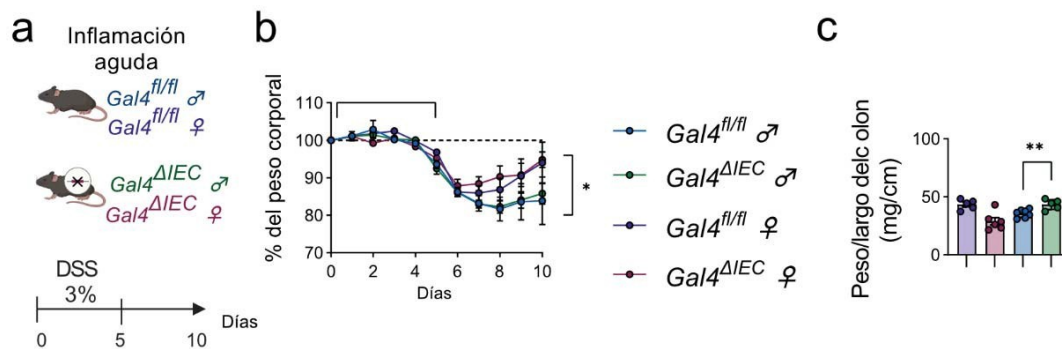


Figura 24. Modelo agudo de inflamación inducida por DSS. (a). Esquema ilustrativo del modelo. **(b)** Curva de porcentaje del peso perdido animales machos y hembras *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* con inflamación aguda inducida por DSS (ANOVA de 2 factores). **(c)** Relación peso/largo del colon (Prueba de t-Student). Se representan los valores individuales y/o la media $\pm$ SD de un experimento representativo (N de experimentos = 2) realizado con 5-6 ratones por grupo experimental * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2.3. La ausencia de Gal-4 en el epitelio afecta el desarrollo de inflamación intestinal crónica

Dado que las alteraciones observadas en el modelo de colitis aguda estaban relacionadas con el compartimento T, y en particular, linfocitos T de memoria (**Figura 22**), decidimos estudiar ahora el desarrollo de inflamación intestinal crónica en animales deficientes en Gal-4 epitelial. En este modelo administramos DSS 2,5% en el agua de bebida durante 3 ciclos sucesivos durante 30 días, como se describió previamente (Morosi et al. 2021). Considerando que, al igual que la literatura (Bábíčková et al. 2015; Pace et al. 2024), nuestros resultados indicaban que los machos eran más sensibles a la inflamación aguda inducida por DSS y se incrementaba su agresividad, y teniendo en cuenta la mayor duración del tratamiento, decidimos emplear únicamente hembras en este modelo.

La administración de DSS generó un aumento de la relación peso/largo de colon y de LCN2 sérica en ambos genotipos, como era de esperarse, pero no se observaron diferencias significativas entre ambos. Sin embargo, las hembras *Gal4^{ΔIEC}* tratadas con DSS experimentaron mayor pérdida de peso que las *Gal4^{fl/fl}* (**Figura 25**).

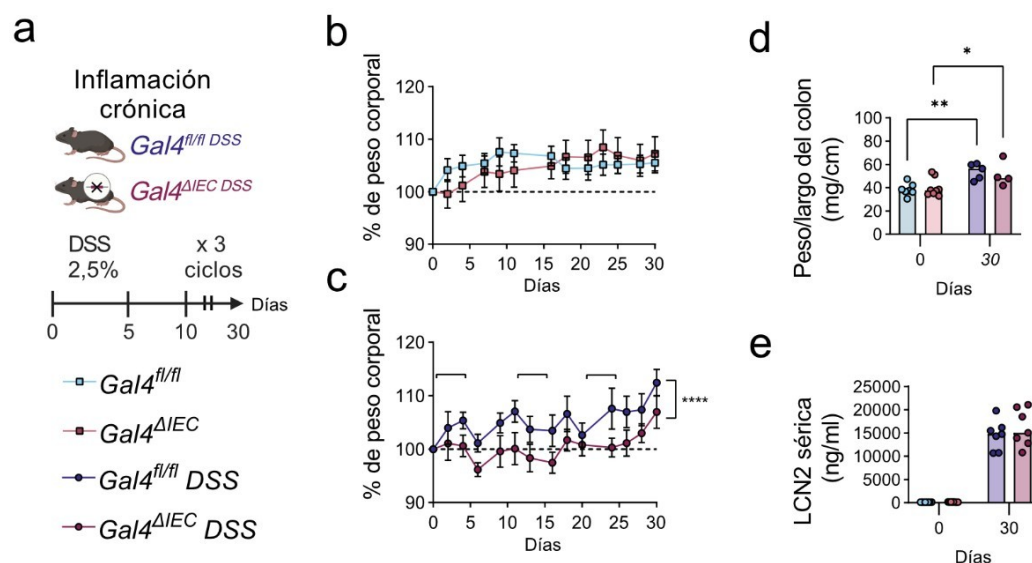


Figura 25. Modelo crónico de inflamación inducida por DSS en animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}*. (a) Esquema ilustrativo del modelo. (b,c) Curva de porcentaje del peso perdido por animales sin tratar (b) y (c) tratados con DSS (ANOVA de 2 factores). (d) Relación peso/largo del colon (Prueba de t de student). (e) Concentración de lipocalina-2 (LCN2) en suero (Prueba de t de student). Se representan los valores individuales y/o la media $\pm$ SD de un experimento representativo (N de experimentos = 2) realizado con 5-6 ratones por grupo experimental, excepto para LCN2 que los valores corresponden a dos experimentos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

A continuación, y para elucidar si esta disminución en el peso se podía asociar a cambios en el compartimento T y el perfil de citoquinas, analizamos por citometría de flujo la proporción de células que expresaban factores de transcripción característicos de los perfiles Th1 (Tbet), Th2 (GATA3), Th17 (ROR γ T), Treg (Foxp3), tanto en ganglio mesentérico (**Figura 26**) como en lámina propia (resultados no mostrados); sin embargo, no encontramos resultados significativos cuando comparamos animales *Gal4^{fl/fl}* vs *Gal4^{ΔIEC}*.

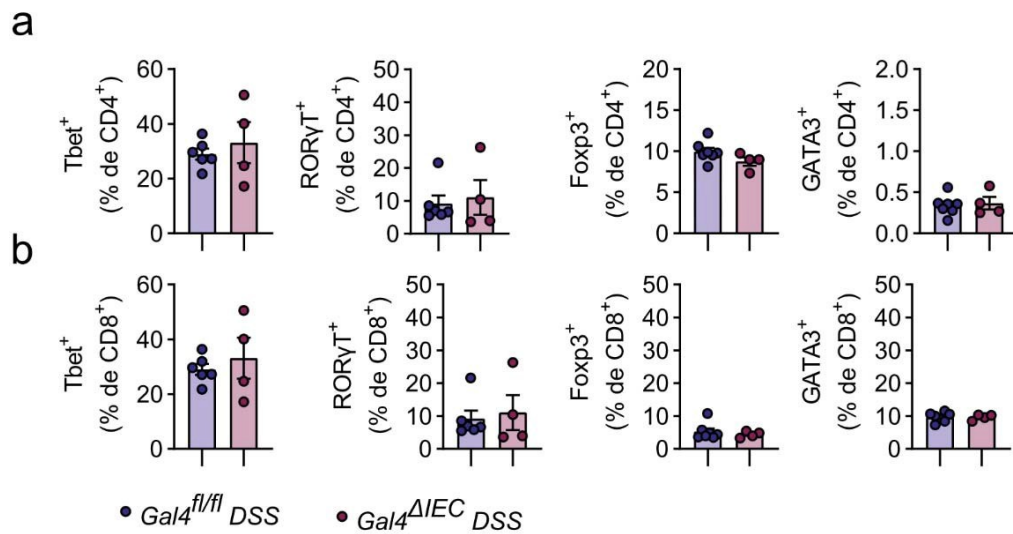


Figura 26. Fenotipificación de factores de transcripción de linfocitos T en ganglios mesentéricos de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* con inflamación crónica inducida por DSS. (a) Linfocitos T CD4⁺ y (b) linfocitos CD8⁺. Se indican los porcentajes de estas poblaciones dentro de las células indicadas entre paréntesis respecto a las células vivas. Se representan los valores individuales y la media $\pm$ SD de un experimento realizado con 5-6 ratones por grupo experimental (Prueba de t-student) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

Al igual que en los experimentos de inflamación aguda (**Figura 22**), observamos el aumento en las células CD4⁺ de memoria en ganglios mesentéricos de los ratones *Gal4^{ΔIEC}* (**Figura 27**). En esta oportunidad evaluamos además, poblaciones de memoria de larga duración (CD127) y terminalmente diferenciadas (KLRG1), pero no observamos diferencias significativas entre ambos genotipos. Por lo tanto, consideramos la posibilidad de que las diferencias observadas podrían estar relacionadas con alteraciones en la migración celular, y que este aumento se deba a una menor capacidad migratoria de las células del ganglio mesentérico hacia el intestino. Para verificar esta hipótesis analizamos marcadores de migración a intestino tras un único ciclo de DSS, de modo de obtener un panorama de los estadios intermedios del proceso inflamatorio, pero los resultados indicaron que estas variaciones no estaban asociadas con diferencias en la capacidad migratoria de las células (**Figura 28**).

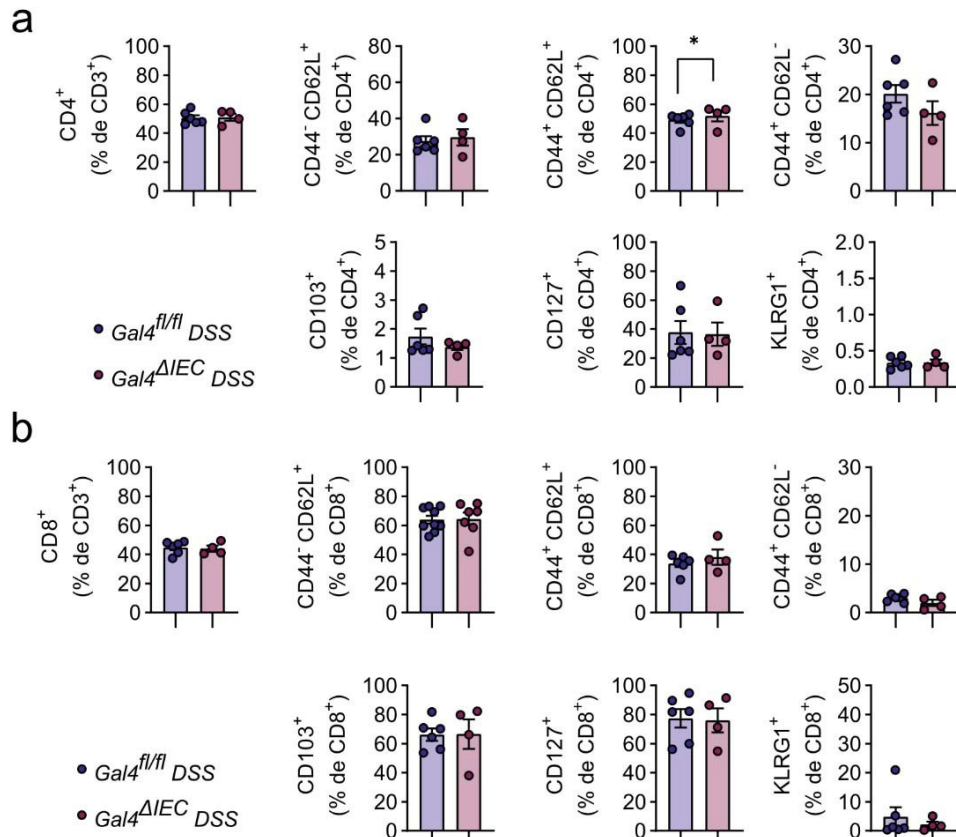


Figura 27. Compartimento T en ganglios mesentéricos de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* con inflamación crónica inducida por DSS. (a) Linfocitos T CD4⁺ y (b) linfocitos CD8⁺. Se indican los porcentajes de estas poblaciones dentro de las células indicadas entre paréntesis respecto a las células vivas. Se representan los valores individuales y la media $\pm$ SD de un experimento representativo (N de experimentos = 2) realizado con 5-6 ratones por grupo experimental (Prueba de t-student) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$.**

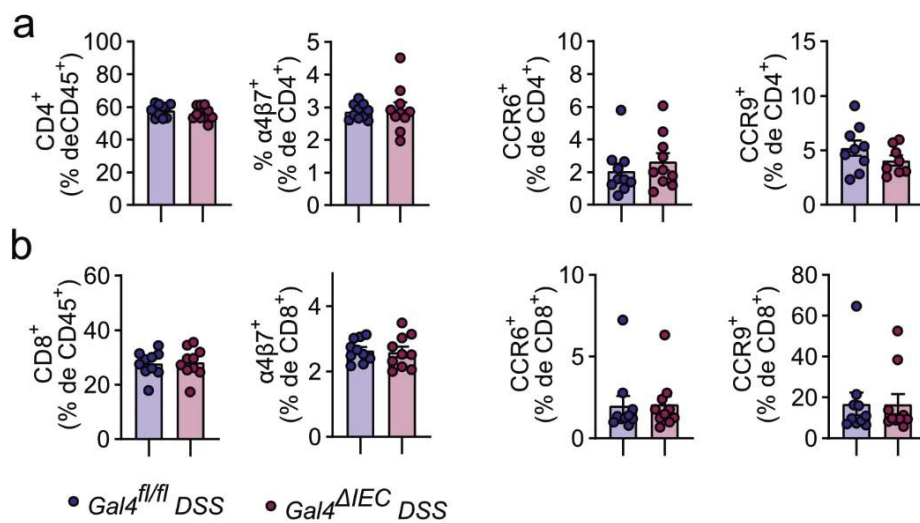


Figura 28 Fenotipificación de migración de linfocitos T en ganglios mesentéricos de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* con sometidos a un ciclo de DSS. (a) Linfocitos T CD4⁺ y (b) linfocitos CD8⁺. Se indican los porcentajes de estas poblaciones dentro de las células indicadas entre paréntesis respecto a las células vivas. Se representan los valores individuales y la media $\pm$ SD de un experimento realizado con 5-6 ratones por grupo experimental (Prueba de t-student) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.2.4. rGal-4 no afecta directamente la diferenciación de linfocitos T

Considerando que la ausencia de Gal-4 aumenta la proporción de linfocitos T CD4⁺ de memoria en el ganglio mesentérico, hipotetizamos sobre un efecto directo e inhibitorio de Gal-4 en la diferenciación de linfocitos a un fenotipo de memoria. Con esta idea en mente, realizamos ensayos *in vitro* de diferenciación de células CD4⁺ con Gal-4 recombinante producida en el laboratorio. Para ello, purificamos linfocitos T CD4⁺ de esplenocitos de ratón, los activamos y los incubamos en presencia o ausencia de rGal-4 y o citoquinas de diferenciación a memoria (IL-7 e IL-15). Sin embargo, no observamos diferencias en la proporción de células CD4⁺CD44⁺CD62L⁺, lo que sugiere que el efecto de Gal-4 sobre esta población no es directo (**Figura 29**).

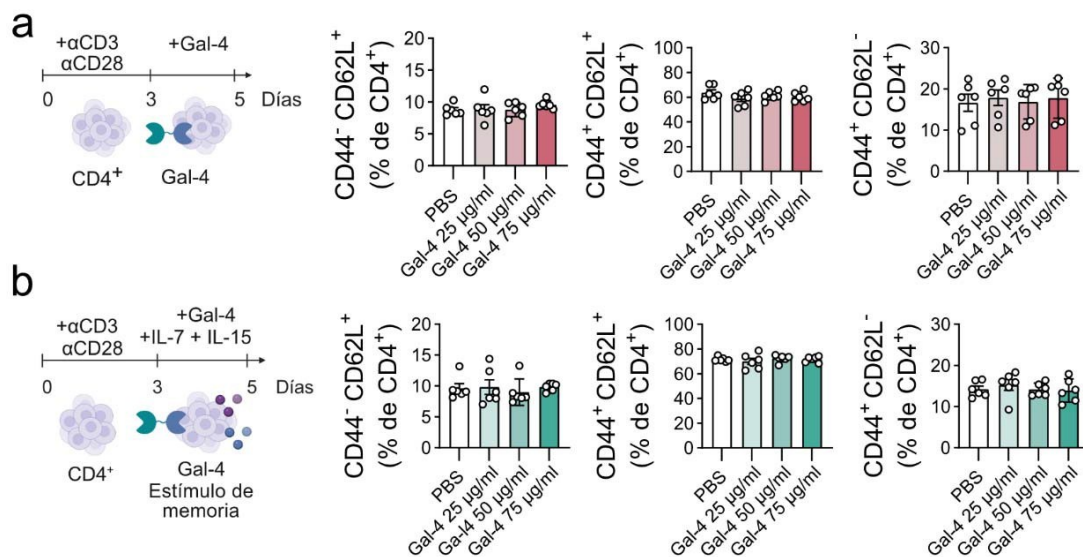


Figura 29. Fenotipificación de linfocitos CD4⁺ (a) activados y estimulados en presencia o ausencia de Gal-4 y (b) citoquinas de memoria. Se indican los porcentajes de estas poblaciones dentro de las células indicadas entre paréntesis respecto a las células vivas. Se representan los valores individuales y la media $\pm$ SD de un experimento representativo (N de experimentos = 2) realizado con 1 ratones por grupo experimental (ANOVA),

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.2.5. Conclusiones del capítulo

Los resultados de este capítulo destacan el efecto de la ausencia de Gal-4 en el epitelio sobre el compartimento inmune intestinal.

La delección específica de Gal-4 en células epiteliales de animales *Gal4^{ΔIEC}* no alteró significativamente las proporciones inmunitarias en estado no inflamatorio. Sin embargo, en inflamación aguda, los ratones *Gal4^{ΔIEC}* mostraron menor nivel del marcador sérico LCN2 y un leve aumento de células CD4⁺ de memoria en ganglios mesentéricos, sin cambios en el compartimento B y mieloide. Consistente con lo observado en animales WT (C57BL/6), los machos *Gal4^{ΔIEC}* fueron más susceptibles a la inflamación aguda inducida por DSS.

En inflamación crónica, los ratones *Gal4^{ΔIEC}* hembras presentaron una mayor pérdida de peso en comparación con los *Gal4^{f/f}*, aunque no se detectaron diferencias significativas en los niveles de LCN2 ni en la relación peso/largo del colon. Se confirmó nuevamente el aumento de linfocitos T CD4⁺ de memoria en los ganglios mesentéricos, pero no se asoció a diferencias en la capacidad migratoria de estas células hacia el intestino ni a un efecto directo de Gal-4 en la diferenciación.

Considerando que los datos transcriptómicos de biopsias de pacientes con colitis ulcerosa (CU) demostraron una disminución significativa en la expresión de *LGALS4* en el tejido inflamado, particularmente asociada al compartimento epitelial. Estos resultados nos llevaron a focalizar nuestros estudios en la importancia de Gal.4 en el compartimento epitelial.

4.3. Papel de Gal-4 en el compartimento epitelial

4.3.1. Gal-4 se expresa en células epiteliales y de manera independiente del tipo celular en el eje proximal-distal del colon murino

Con el objetivo de determinar la expresión de Gal-4 a lo largo del intestino, y en colaboración con el bioinformático Ning He del laboratorio de Eduardo Villablanca (Instituto Karolinska, Suecia) se realizó el análisis de datos de transcriptómica espacial de colon de ratones (Parigi et al. 2022) (GSE169749), observándose que la expresión de Gal-4 es homogénea a lo largo del eje proximal-distal del colon y desde la cripta hasta el vili (**Figura 30a**).

Luego, para determinar si Gal-4 se expresa preferencialmente en algún subtipo de célula epitelial, se integraron diferentes conjuntos de datos de scRNAseq disponibles de ratones sanos (GSE131432, GSE132273, GSE134255, GSE138902, GSE142423, GSE143351, GSE146042, GSE151257, GSE155669, GSE163637, GSE168448, GSE172261, GSE173887, GSE193342, GSE210415, GSE231716). Los análisis UMAP mostraron que la expresión de Gal-4 es exclusiva de las células epiteliales murinas, y no se expresa en células mieloides, musculares, gliales, ni fibroblastos (**Figura 30a**). Además, es uniforme en los distintos subtipos de células epiteliales del colon murino, incluyendo células precursoras de aquellas terminalmente diferenciadas (*transit-amplifying cells*), y células diferenciadas del linaje absorptivo (colonocitos) y del linaje secretorio (enteroendocrinas y células caliciformes).

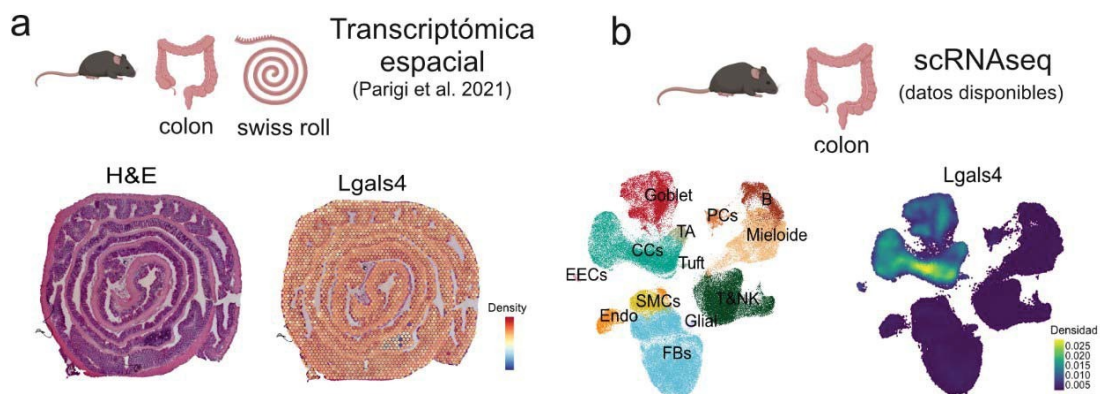


Figura 30. Análisis de datos integrados de transcriptómica espacial y scRNAseq de colon murino. (a) Análisis de datos integrados de transcriptómica espacial. La expresión de *Lgals4* se muestra en un gradiente de menor a mayor desde el azul al rojo. **(b)** scRNAseq integrado de bases de datos murinas. UMAP de poblaciones de células de colon de ratón y expresión de *Lgals4*. La expresión de *Lgals4* se muestra en un gradiente de menor a mayor desde el azul al amarillo. (EECs: células enteroendócrinas, CCs: colonocitos, Goblet o células caliciformes, TA: *Transit-amplifying epithelial cells*, PC: células plasmáticas, Myeloid: células mieloides, Glian: células de la glía, SMCs: células del musculo liso, Endo: células endoteliales, SFB: fibroblastos).

4.3.2. Caracterización de células epiteliales de ratones con una delección específica de Gal-4

Seguidamente, analizamos la composición del compartimento epitelial en colon e intestino delgado de los animales *Gal4^{ΔIEC}* en comparación con los *Gal4^{fl/fl}* mediante citometría de flujo (**Figura 31**). Aunque no existen marcadores completamente definidos para las distintas subpoblaciones epiteliales, las células madre epiteliales (*stem cells*) expresan CD44. Se ha propuesto que dado un gradiente de expresión de CD24 y CD44, las células de linaje absorptivo presentan una mayor expresión de CD24, y las células de linaje secretorio presentan una reducción en la expresión de CD44 (Habowski et al. 2020). Otros estudios han propuesto que la co-expresión de CD44 y CD24 define a las células madre epiteliales (Gracz et al. 2013), y que, dentro de esta población, las células de Paneth constituyen aproximadamente el 30% de las células CD44⁺CD24^{lo} en el intestino delgado (von Furstenberg et al. 2011).

Considerando las limitaciones en la definición de los sublinajes de células epiteliales, utilizamos un panel de marcadores similar al descrito en literatura (Habowski et al. 2020) para garantizar la robustez de nuestros análisis (**Figura 31b**). Cuando comparamos ratones *Gal4^{ΔIEC}* con *Gal4^{fl/fl}* no observamos diferencias significativas en la proporción de células *stem* (CD44⁺), progenitores del linaje secretorio (CD44⁺CD24⁺), células del linaje secretorio (CD24⁺), y células madre epiteliales CD44⁺CD24⁺ del linaje secretorio en el colon (**Figura 31c**). Sin embargo, identificamos una reducción en la proporción de células CD44⁺ en los ratones transgénicos, lo que podría indicar que existen funcionalidades relacionadas con la renovación epitelial y la función de barrera alterada en estos animales (**Figura 31d**).

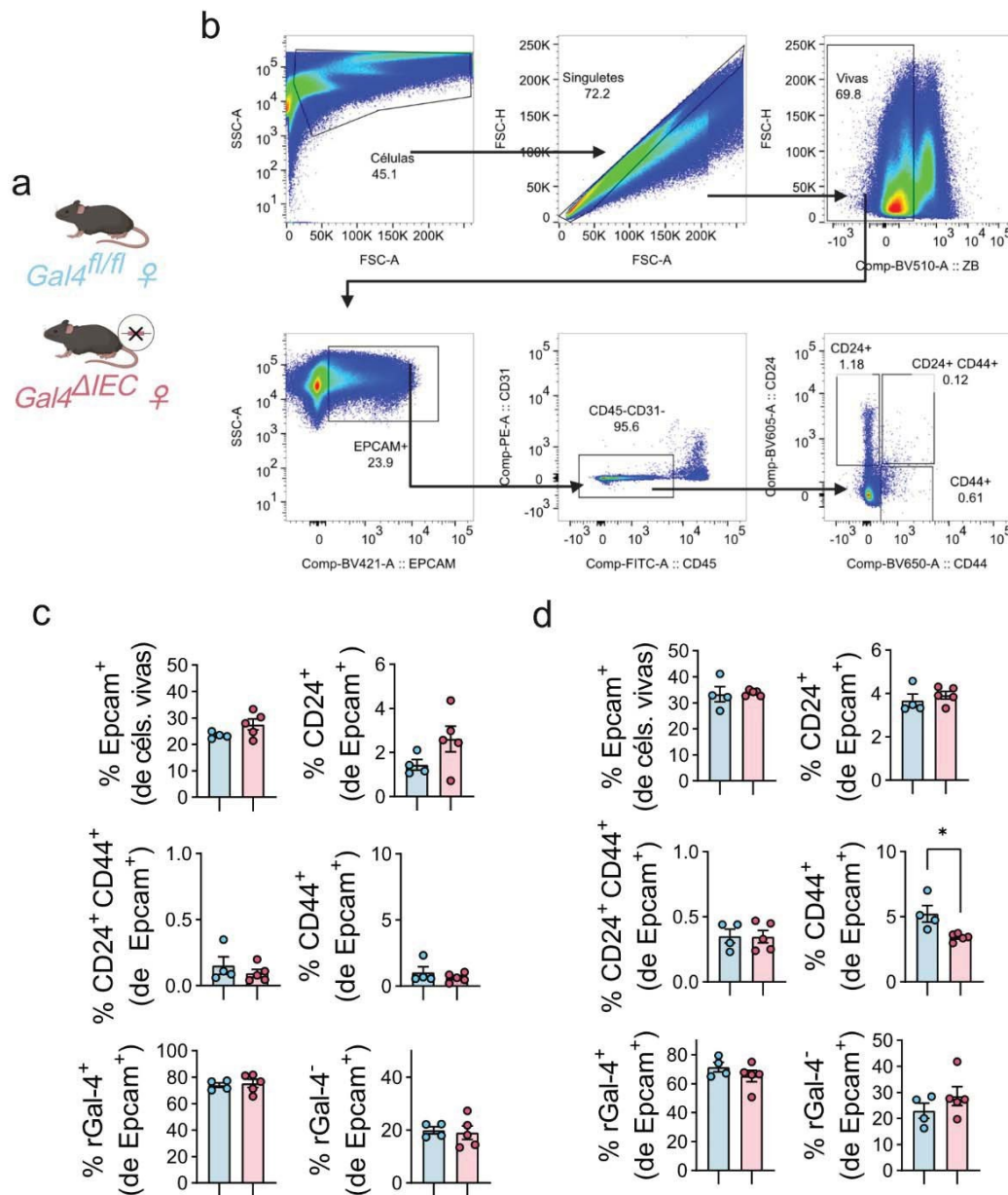


Figura 31. Composición de del compartimento epitelial en animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}*. (a). Genotipos de ratones empleados. (b) Estrategia de *gating*. Proporción de células epiteliales en el (c) colon e (d) intestino delgado. Se representan los valores individuales y la media $\pm$ SD de un experimento. (Prueba de t-student)

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Considerando que mediante experimentos *in vitro* se ha descrito el papel relevante de Gal-4 en el transporte de glicoproteínas a la superficie celular y su secreción (Morelle et al. 2009), decidimos evaluar si la ausencia de esta lectina podría alterar la glicosilación de las células epiteliales en animales transgénicos sanos. Para ello, evaluamos el glicofenotipo de células epiteliales ($Epcam^+CD32^-CD45^-$) del intestino delgado y el colon de ratones *Gal4^{ΔIEC}* y *Gal4^{fl/fl}* mediante la marcación con lectinas vegetales comerciales y evaluación posterior por citometría de flujo. Considerando las preferencias glicosídicas de

Gal-4 (**Sección 4.1.2., Resultados**), utilizamos la lectina *Dolichos biflorus agglutinin* (DBA), que reconoce residuos de α -N-acetilgalactosamina; *Sambucus nigra* (SNA), que detecta ácido siálico en posición $\alpha(2,6)$; y *Ulex europaeus agglutinin I* (Ulex), que se une preferentemente a residuos $\alpha(1,2)$ -fucosilados. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los perfiles de glicosilación entre los dos genotipos, tanto en intestino grueso como en delgado, lo que sugiere que la ausencia de Gal-4 en estas células no altera su glicosilación, al menos para los glicoepitopes estudiados y en las condiciones de purificación empleadas, que involucraron el tratamiento con EDTA y DTT y posterior desprendimiento mecánica de las células (**Sección 3.19 Materiales y métodos**).

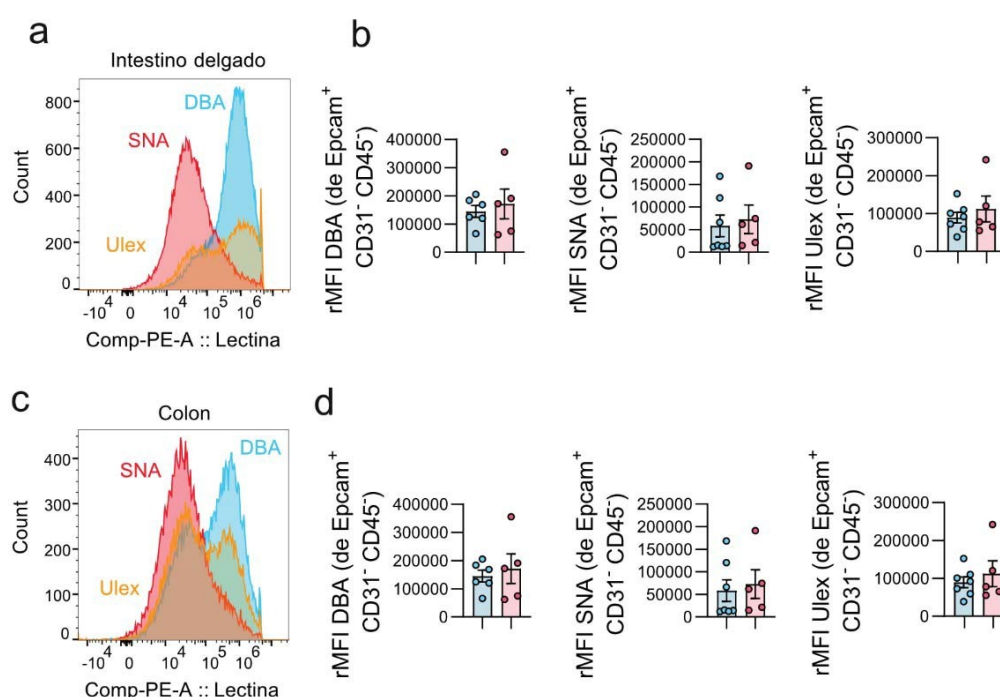


Figura 32. Histogramas representativos de la intensidad de fluorescencia de lectinas biotiniladas en el (a,b) intestino delgado y (c,d) colon. Unión de lectinas a células epiteliales Epcam⁺ de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* el (b) intestino delgado y (d) colon informada como mediana de fluorescencia relativa al negativo (rMFI) Un experimento representativo con 5 ratones. (Prueba de t-student) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.3.3. Gal-4 es capaz de unirse a la superficie de células epiteliales

Estudios previos han demostrado que Gal-4 puede ser externalizada hacia el lado apical de células epiteliales HT29 y reinternalizada a través de la vía endocítica (Stechly et al. 2009), por lo que su presencia (y funciones) son tanto intra- como extracelulares. Considerando la presencia de Gal-4 en el medio epitelial extracelular y que, a diferencia de la línea HT29, la línea celular Caco2 expresa bajos niveles de Gal-4, evaluamos la unión de rhGal-4 a esta última línea celular, de manera de evitar la competencia con Gal-

4 endógena. Para ello, acoplamos Gal-4 a un fluorocromo y determinamos su adhesión celular mediante citometría de flujo. Observamos, en primer lugar que Gal-4 presentó unión a las células Caco2, que esta unión disminuyó en presencia de BGA6, demostrando una interacción es carbohidrato-dependiente (**Figura 33a-c**). Sin embargo, esta disminución en la unión no fue dosis dependiente.

Posteriormente, evaluamos la unión de Gal-4 a diferentes linajes de células epiteliales. Para ello, extraímos células epiteliales del colon e intestino delgado (ID) de ratones sanos *Gal4^{ΔIEC}* y *Gal4^{fl/f}*, y evaluamos mediante citometría de flujo la unión de Gal-4 fluorocromada mediante marcadores de superficie CD24 y CD44, tal como fue publicado previamente (Habowski et al. 2020) (**Figura 33d-f**). La mayoría de las células epiteliales mostraron pegado de Gal-4, aunque las células CD44⁺ presentaron un MFI mayor de rGal-4 en comparación con las CD24⁺, lo que sugiere una mayor afinidad de Gal-4 por estas células *stem-like*, tanto en colon como en intestino delgado (**Figura 33d,e,f**).

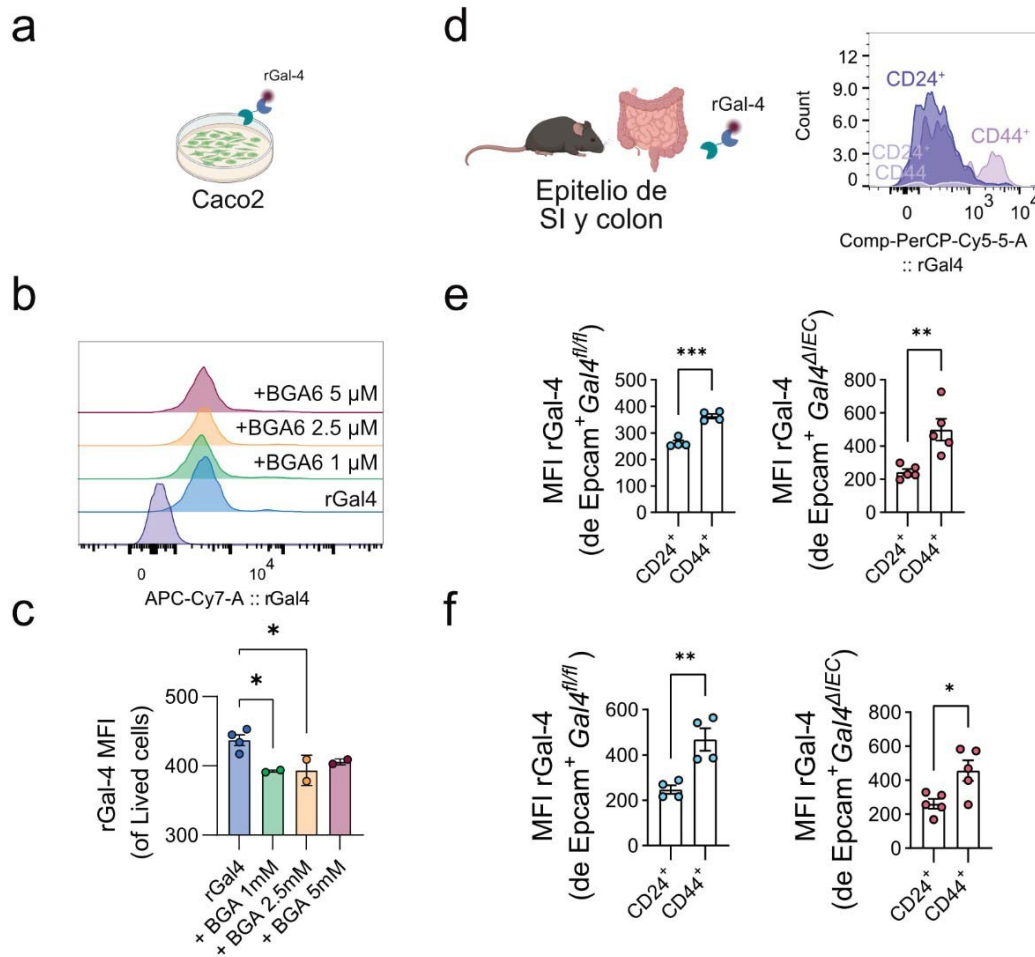


Figura 33. Unión de rGal-4 a células epiteliales. (a) Esquema de experimento con línea celular Caco-2. (b) Histogramas representativos de la intensidad de fluorescencia de Gal-4 fluorocromada a células Caco-2 en presencia o ausencia del ligando BGA6. (c) Cuantificación de Mediana de fluorescencia (MFI) de la unión de Gal-4 fluorocromada a células Caco-2. (d) Histogramas representativos de la intensidad de fluorescencia de Gal-4 fluorocromada a células epiteliales CD44⁺, CD24⁺ o CD24⁺CD44⁺. Unión de Gal-4 fluorocromada a células epiteliales Epcam⁺ de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* del (e) intestino delgado y (f) colon, informadas como Mediana de fluorescencia (MFI). Un experimento representativo con 4-5 ratones por grupo. (Prueba de t- student) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

4.3.4. Determinación de las preferencias de unión de Gal-4 en tejido intestinal

Durante mi pasantía en el laboratorio del Dr. Eduardo Villablanca (Instituto Karolinska, Suecia), realicé un ensayo de inmunofluorescencia sobre cortes de tejido de ratón C57BL/6 sano con el objetivo de determinar la unión de Gal-4 en distintos tipos de células epiteliales en el intestino. Nuestros experimentos previos indicaban que Gal-4 podía unirse a células que expresaran CD44 en su superficie, un marcador expresado tanto células *stem* como Paneth en el intestino delgado (**Sección 4.3.3 Resultados**). Asimismo, en bibliografía, se había descrito que esta galectina presenta afinidad por mucinas y residuos sulfatados de O-glicanos (Ideo et al. 2002; Bum-Erdene et al. 2016), los cuales son producidos en las células caliciformes. Por ello, se utilizaron tinciones simultáneas con Gal-4 conjugada a un fluoróforo y anticuerpos específicos contra Muc2 para identificar células caliciformes, y contra Lyz1 para detectar células de Paneth (**Figura 34a**). Los resultados mostraron que la señal de Gal-4 colocalizó con la de Lyz1 en el íleon, lo que sugiere una preferencia de unión de Gal-4 a las células de Paneth (**Figura 34b**). En contraste, en el colon no se detectó unión aparente, en concordancia con la ausencia de esta población celular en dicho segmento intestinal.

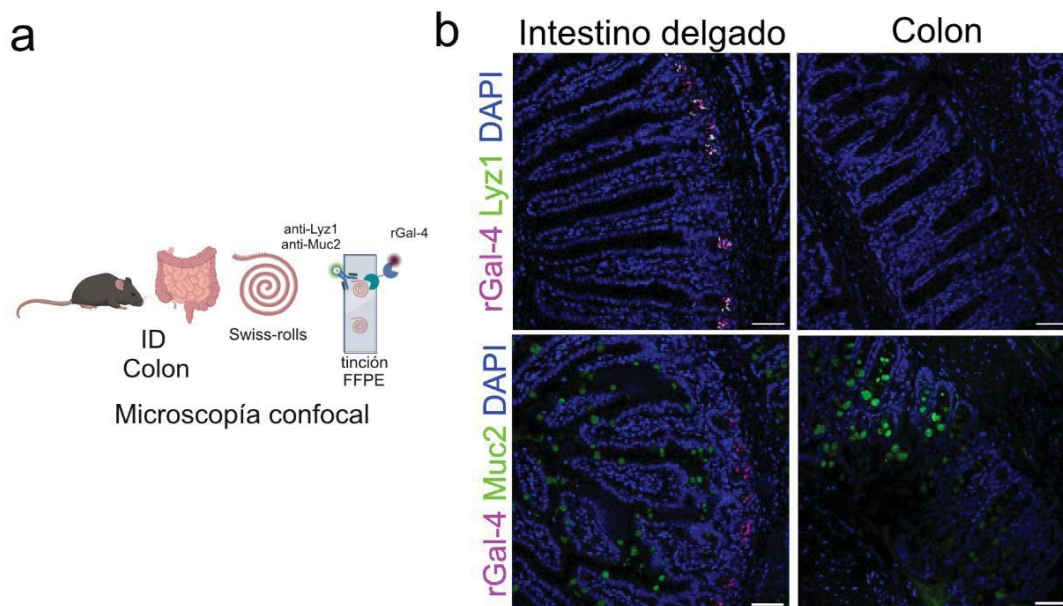


Figura 34. Ensayos de unión de Gal-4 a tejido intestinal (a) Esquema experimental de tinción de *swiss rolls* de intestino delgado y colon con Gal-4 fluorocromada, y anti-Lyz1 (células de Paneth) y anti-Muc2 (células caliciformes). (b) Imágenes de *swiss roll* de intestino delgado y colon teñidas con Gal-4 PerCPCy5.5 y anti- Lyz o anti-Muc2, respectivamente. Las barras representan 100 μ m.

4.3.5. Estimulación de organoides de intestino delgado con Gal-4

Para evaluar el papel funcional de Gal-4 sobre las células epiteliales, cultivamos criptas del intestino delgado (ID) de ratones WT (C57BL/6) sanos *ex vivo* y las estimulamos con rGal-4. A continuación cuantificamos manualmente los organoides, determinando el área y número de los mismos, utilizando QuPath a partir de 5 imágenes obtenidas de todo el well por microscopía (**Figura 35a**). Utilizamos organoides de intestino delgado porque, a diferencia de los del intestino grueso, contienen células de Paneth. Estas células forman un nicho esencial para las células madre intestinales, ya que secretan el factor de crecimiento epidérmico (EGF), así como ligandos de las vías de Notch y Wnt3, promoviendo su autorrenovación y proliferación (Merenda, Fenderico, y Maurice 2020).

La estimulación de estas criptas con rGal-4 resultó en una reducción de su tamaño en comparación con aquellas cultivadas únicamente en medio ENR (EGF, Noggin y R-spondin) (**Figura 35b**). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el número de organoides formados (**Figura 35c**).

Considerando estos resultados, y para evaluar la preferencia de unión de rGal-4 a los diferentes tipos celulares presentes en estos organoides, se realizaron tinciones simultáneas con rGal-4 acoplada a un fluoróforo y anti-Lyz1 (marcador de células de

Paneth), anti-Olfm4 (marcador de células madre) y anti-Muc2 (marcador de células caliciformes) (**Figura 35d**). Los resultados mostraron una co-tinción de rGal-4 y anti-Lyz1, lo que sugiere una posible interacción de Gal-4 con las células de Paneth, de manera consistente con los resultados descritos en la sección anterior.

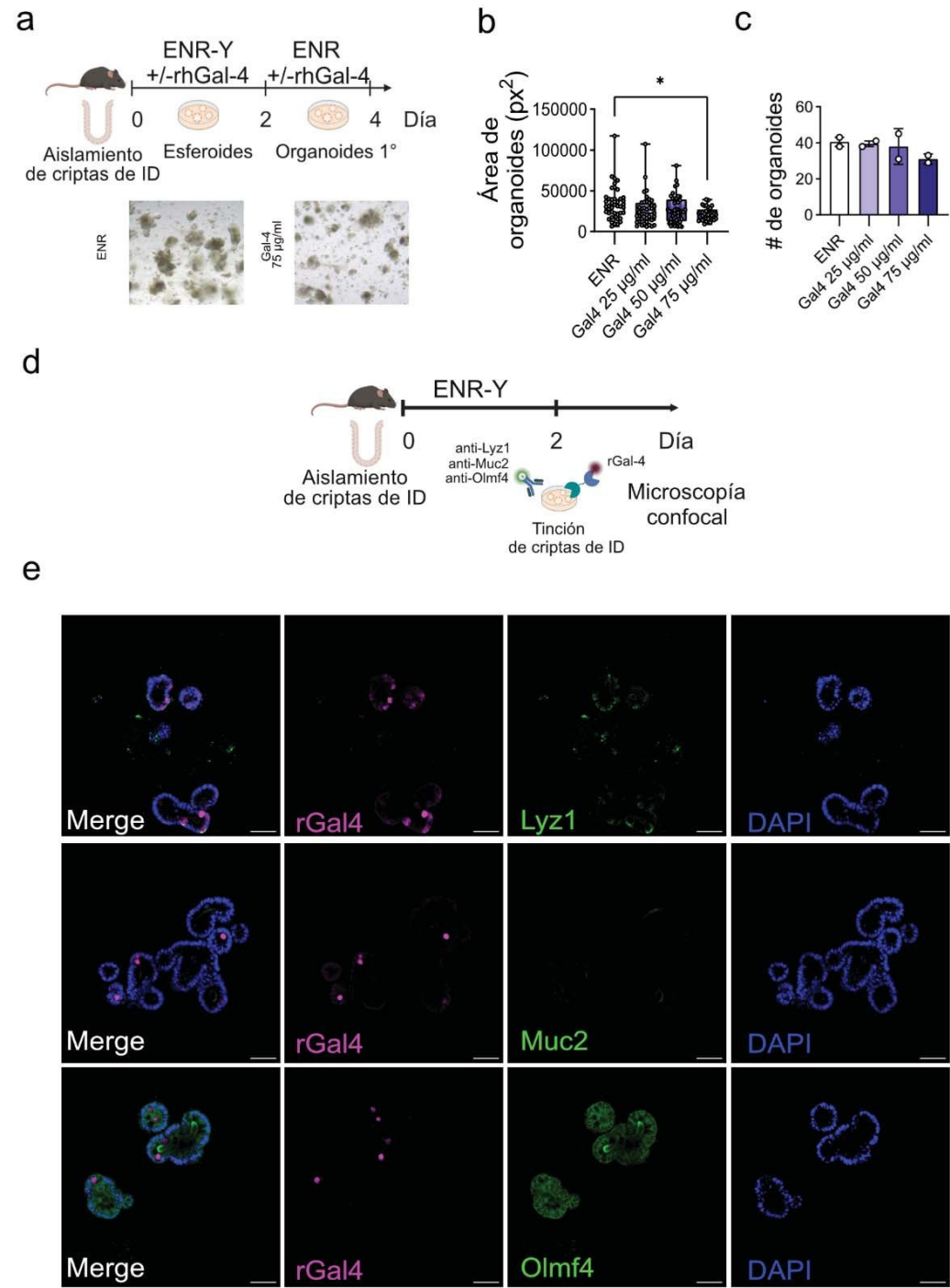


Figura 35. Análisis de datos integrados de transcriptómica espacial (a) Diseño experimental para el análisis de organoides de criptas intestinales, evaluada mediante (b) el área de los organoides y (c) el número de organoides cuantificado a partir de imágenes analizadas en QuPath (Prueba de t-student). (d) Diseño experimental para la tinción de organoides de criptas de intestino delgado evaluados mediante microscopia confocal. (e) Microscopia confocal de organoides de criptas de intestino delgado. La barra indica 50 μ m.
*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Posteriormente, se derivaron organoides a partir de célula única provenientes de criptas de ID y se analizaron utilizando el sistema de análisis de células vivas *Incucyte* (**Figura 36a,b**). Este equipo permite la recolección y análisis automático de datos de imágenes durante todo el experimento (**Figura 36a**). Notablemente, la estimulación de este cultivo con rGal-4 desde el día 5 (antes de la formación de esferoides) resultó en una reducción en el número de organoides (**Figura 36b**). Cuando se administró rGal-4 al cultivo posteriormente de la formación de esferoides (en el día 8), no se observaron cambios ni en el número ni en el tamaño de los organoides, tampoco en la viabilidad (**Figura 36c,d**). Esto podría explicarse considerando que se ha descrito a Gal-4 como capaz de inhibir la vía de señalización de Wnt (Satelli et al. 2011), un factor clave en la formación de esferoides a partir de células únicas. En conclusión, la presencia de Gal-4 podría afectar negativamente el crecimiento y la supervivencia de los organoides durante la formación de esferoides, pero no afecta a los mismos una vez formados.

Con el objetivo de establecer el tipo celular específico al que se une rGal-4 en los organoides de célula única, los mismos se tiñeron con rGal-4 en el día 8 (después de la formación de esferoides) y el día 10 (después de la diferenciación o *budding* (**Figura 36e**). A diferencia de lo observado en los organoides derivados de criptas, la tinción con rGal-4 en el día 8 se distribuyó de manera homogénea en todo el organoide, mientras que en el día 10 se observó una correlación con algunas, pero no todas, las células Lyz^+ (**Figura 36f**). Esto sugiere que la unión de Gal-4 a las células de Paneth no es completamente específica y podría depender de diferencias en el estado de glicosilación de estas células (Kamioka et al. 2022). Asimismo, hipotetizamos que este fenómeno podría estar relacionado con cambios en la glicosilación de las células, posiblemente inducidos por la presencia de factores de crecimiento y diferenciación en el cultivo.

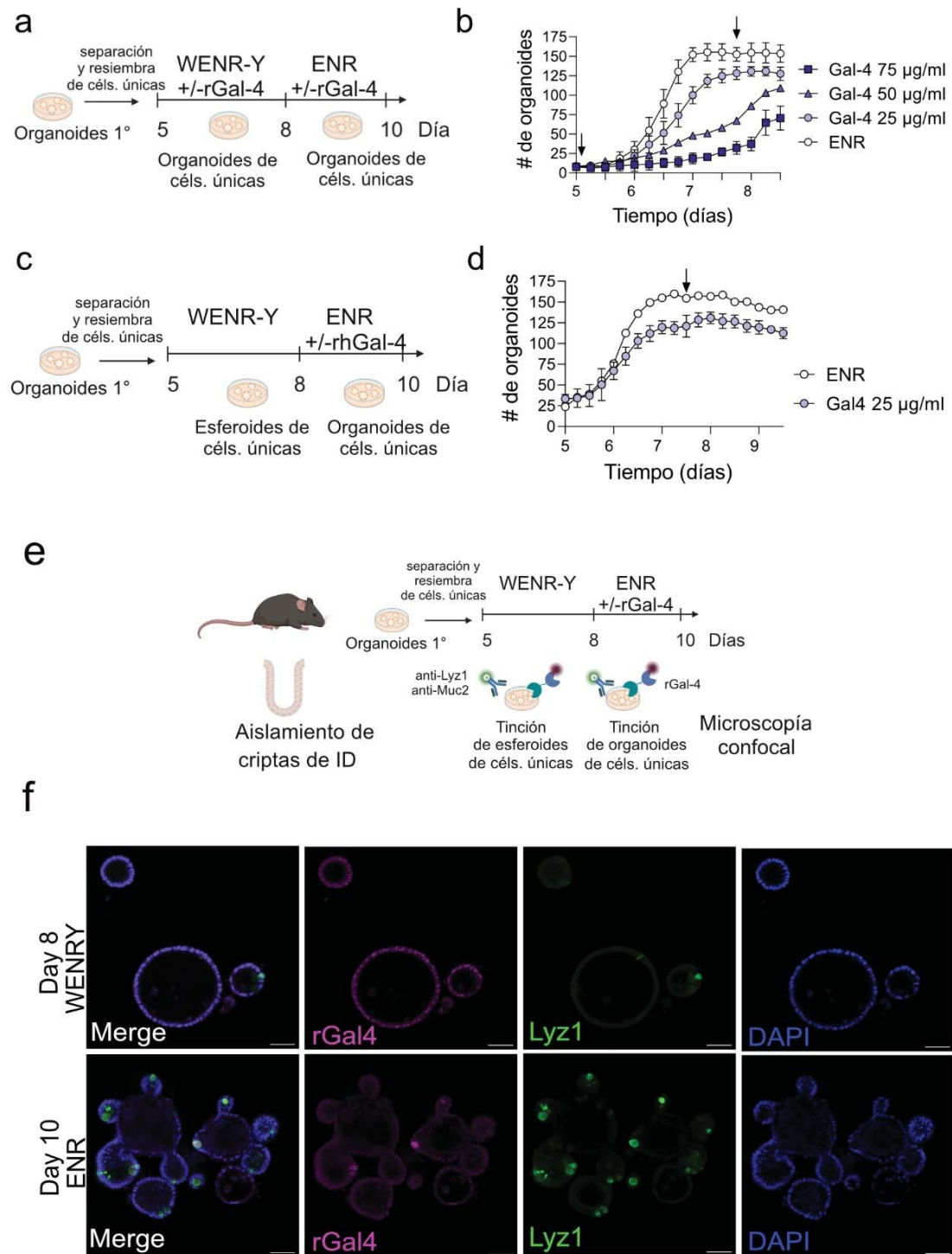


Figura 36. Estimulación de organoides de célula única con Gal-4 (a) Diseño experimental para la estimulación de organoides generados a partir de células únicas desde el día 5 (a) o 8 (c), cuantificada mediante *Incucyte* (b-d). La flecha indica el momento de administración de rGal-4. (e-f) Diseño experimental para la tinción de organoides generados a partir de células únicas en el día 8 o 10, para identificar células de Paneth (Lyz1) y células caliciformes (Muc2), y la unión de rGal-4.

4.3.6. Conclusiones del capítulo

Los resultados de este capítulo contribuyen a la comprensión del papel de Gal-4 en el epitelio intestinal, destacando su interacción con células de Paneth y su posible implicancia en la dinámica de renovación y diferenciación celular.

A partir de análisis de transcriptómica, se determinó que Gal-4 se expresa de manera homogénea en el eje proximal-distal del colon murino, sin restringirse a un linaje epitelial específico.

La delección específica de Gal-4 en animales no alteró significativamente la composición celular epitelial del colon, aunque se observó una reducción en la población CD44⁺. El análisis del glicofenotipo no mostró cambios detectables en la glicosilación de las células epiteliales en ausencia de Gal-4.

Se demostró que rhGal-4 puede unirse a células epiteliales. En particular, las células con fenotipo *stem-like* (CD44⁺) presentaron mayor afinidad por Gal-4 en comparación con las células diferenciadas (CD24⁺). Además, su colocalización con células de Paneth en el intestino delgado sugiere una interacción preferencial dentro del epitelio intestinal.

Los estudios en organoides revelaron que la estimulación con Gal-4 afecta su crecimiento y morfología, reduciendo el tamaño de los organoides derivados de criptas y disminuyendo la formación de organoides a partir de células únicas en etapas tempranas del cultivo. La tinción mostró una fuerte interacción con células de Paneth, aunque esta podría depender del estado de glicosilación celular.

5 Discusión

En esta Tesis nos propusimos investigar el papel de Galectina-4 en la inflamación intestinal mediante la caracterización de sus ligandos específicos, el análisis de firmas transcripcionales, y su impacto funcional en los compartimentos inmunológico y epitelial. Para ello, en primer lugar, optimizamos la producción y purificación de esta proteína en forma recombinante y establecimos un protocolo para su conservación en la forma soluble y activa. Asimismo, llevamos a cabo diversos ensayos para estudiar su afinidad y especificidad de unión, incluyendo ensayos competitivos en fase sólida, determinaciones por calorimetría de titulación isotérmica, cálculos de acoplamiento molecular, modelado estructural y simulaciones de dinámica molecular. Además, realizamos ensayos de estimulación inmunológica *in vitro*, donde administramos Gal-4 recombinante exógena a cultivos de PBMCs.

Asimismo, empleamos animales transgénicos con una delección específica de Gal-4, los cuales caracterizamos, tanto en condiciones de homeostasis, como en respuesta a inflamación intestinal crónica y aguda, determinando cómo su delección afecta el desarrollo de la colitis en un modelo murino. Estos animales constituyen los primeros animales con delección específica de Gal-4 reportados en bibliografía, ya que sólo se ha reportado una variante transgénica de ratones que expresa Gal-4 humana (Li et al. 2023). Finalmente, llevamos a cabo ensayos adicionales para profundizar los mecanismos subyacentes a su función en el contexto inflamatorio, para los cuales empleamos ensayos de estimulación y diferenciación de células T en presencia de Gal-4.

Evaluamos por primera vez la expresión de esta lectina a lo largo del colon murino, y su expresión en los diferentes subtipos de células epiteliales. Si bien estudios previos habían evaluado el rol de esta proteína empleando líneas celulares en monocapa, en este trabajo realizamos por primera vez organoides con células epiteliales intestinales a las cuales estimulamos de forma exógena con Gal-4. Finalmente, mediante estudios por

microscopía, determinamos que Galectina-4, si bien es producida por células epiteliales intestinales, se une preferencialmente a células Paneth.

En las siguientes secciones, discutiremos los resultados obtenidos y las perspectivas que surgen del trabajo de esta Tesis.

5.1. La ausencia de Gal-4 promueve la generación de memoria inmunológica en la inflamación intestinal

Estudios previos han demostrado que la administración de Gal-4 recombinante en un modelo de colitis aguda inducida por DSS post-inicio de la inflamación exacerbaba la inflamación, mientras que el bloqueo de esta lectina mediante un anticuerpo bloqueante durante el modelo favorecía la resolución del daño (Hokama et al. 2004). Esto sugiere un posible papel de Gal-4 en la exacerbación de la inflamación, aunque no en su inducción. No obstante, en modelos agudos más severos de colitis, la administración de Gal-4 desde el inicio del modelo promovió la recuperación de la enfermedad mediante la inhibición de la activación y proliferación de linfocitos T, así como la inducción de apoptosis en estas células (Paclik, Danese, et al. 2008). Estas discrepancias resaltan la complejidad del papel de Gal-4 en la inflamación intestinal, sugiriendo que su efecto puede depender del modelo experimental, la dosis, la vía y el tiempo de administración de Gal-4 y del microambiente inflamatorio.

Análisis previos han demostrado que, aunque el perfil de expresión de galectinas no permite distinguir entre colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC), se ha descrito un aumento en la expresión de Gal-1 y una disminución en Gal-3, -4 y -9 en pacientes con EII que permiten diferenciar estas enfermedades de otras patologías intestinales (Papa Gobbi et al. 2016), asociando la desregulación de Galectinas a las EII. Mediante análisis transcriptómicos, en este trabajo, observamos que la expresión de Gal-4 se encuentra disminuida en las células epiteliales de pacientes con CU, lo que concuerda con estudios previos que han reportado la disminución de esta lectina en EII

En este sentido, nos propusimos explorar el efecto de la delección de Gal-4 específicamente en el epitelio intestinal. Para ello, y utilizando animales transgénicos $Gal4^{\Delta IEC} (CreVillina^{+/-} FloxLgals4^{+/-})$, comenzamos estudiando la relevancia de Gal4 en homeostasis. Observamos que la ausencia de Gal-4 en el epitelio intestinal no afecta las poblaciones inmunes (B, T y mieloides) en el ganglio mesentérico, por lo que decidimos estudiar su relevancia en inflamación intestinal.

En tanto, los experimentos en el modelo de DSS agudo mostraron un aumento en la cantidad de linfocitos T $CD4^{+}$ de memoria (T_{CM}) en ganglios mesentéricos. Según sus marcadores de superficie, las células T de memoria pueden clasificarse en T_{CM} , T_{EM} y T_{RM} (Knauss et al. 2022). Tanto las T_{CM} como las T_{EM} tienen funciones citotóxicas ante la estimulación antigénica, siendo estas últimas más eficientes en la eliminación de antígenos (Knauss et al. 2022). Por su parte, las T_{CM} poseen una menor capacidad

citotóxica, pero pueden secretar IL-2, promoviendo así la proliferación de células T (Knauss et al. 2022). En tanto, diversos estudios describen el papel de las células T_{RM}, con una influencia significativa en distintos modelos de colitis y en las EII. Aunque numerosos estudios les atribuyen un papel proinflamatorio (Lamb et al. 2017; Bishu et al. 2019; Zundler et al. 2019; Sasson et al. 2021), también se han reportado evidencias que contradicen esta función (Roosenboom et al. 2019; Noble et al. 2020), dependiendo del tipo celular con el que interactúan (Knauss et al. 2022).

Estos resultados conciben con lo reportado en bibliografía en muestras de pacientes con EII (Smids et al. 2018; Iwamuro et al. 2022), ya que el análisis por citometría de flujo de PBMCs y linfocitos de la mucosa colorrectal en pacientes con colitis ulcerosa demuestra un enriquecimiento de linfocitos T_{CM} (definidos como CD62L⁺/CD3⁺CD4⁺) (Iwamuro et al. 2022). Al momento del diagnóstico, los pacientes con EII presentan, en biopsias de zonas inflamadas, porcentajes más altos de linfocitos T CD4⁺, Tregs y T_{CM}, que se mantienen cuando la enfermedad esta activa, pero se normalizan en remisión endoscópica (Smids et al. 2018). En concordancia, en un modelo murino de colitis inducida por DSS, se ha reportado un incremento en las células CD4⁺ T_{CM} tanto en colon como en ganglios mesentéricos (Morgan et al. 2013). Se ha propuesto que este aumento podría contribuir a la patología crónica, ya que estas poblaciones son capaces de recuperar funciones efectoras y expandirse tras encontrarse con su antígeno específico, perpetuando la inflamación (Nemoto et al. 2009).

Notablemente, nuestros experimentos *in vitro* muestran que BGA6 inhibe la secreción de IL-6 inducida por Gal-4 de manera dosis-dependiente, lo que resalta el potencial de este oligosacárido natural como un inhibidor de Gal-4. Estos hallazgos están en línea con la actividad proinflamatoria de Gal-4 extracelular previamente descrita (Hokama et al. 2004) en linfocitos aislados de la lámina propia inflamada. Sin embargo, contrastan con los resultados publicados por Paclik (Paclik, Danese, et al. 2008), que reportó una función pro-apoptótica y antiinflamatoria de Gal-4. Es razonable considerar que un incremento en la apoptosis celular podría conllevar una reducción en el número de células productoras de citoquinas, lo que explicaría la disminución en los niveles de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 observada en el estudio de Paclik et al. (Paclik, Danese, et al. 2008).

Una posible explicación para esta discrepancia radica en las concentraciones de Gal-4 empleadas, donde se utilizó una única dosis elevada de 100 μ g/ml (equivalente a 2,7 μ M) sin incluir concentraciones intermedias, la cual podría haber alcanzado niveles citotóxicos (Paclik, Danese, et al. 2008). En nuestro caso, al emplear 100 μ g/ml de nuestra proteína recombinante, no observamos un aumento significativo en la apoptosis celular. Pero a diferencia de los descrito en ese trabajo, en nuestro caso, Gal-4 fue producida y purificada en nuestro propio laboratorio, lo que podría influir en el grado de pureza y ausencia de excipientes con efectos citotóxicos. En este contexto, la reducción de citoquinas en el trabajo descrito por Paclik et al. podría atribuirse principalmente a la muerte celular inducida por los excipientes y no a un efecto intrínseco de Gal-4. Por otro

lado, estudios recientes han demostrado que Gal-4 también es capaz de promover la secreción de IL-6 por monocitos (Hong et al. 2019). Dado que nuestros ensayos fueron realizados con PBMCs, y considerando que la proporción de monocitos es entre el 10-20% (Kleiveland 2015) y que la activación fue inducida mediante estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, inferimos que la modulación observada de BGA6 es atribuible principalmente a células T. Sin embargo, no podemos descartar que dicha modulación también involucre a los monocitos. En este sentido, aún no ha sido explorado el potencial efecto inhibitorio de BGA6 sobre la capacidad de Gal-4 para inducir la secreción de IL-6 en monocitos, por lo que serán necesarios estudios futuros que aborden específicamente esta posibilidad. Del mismo modo, sigue sin esclarecerse si BGA6 puede modular la producción de otras citoquinas reportadas en este estudio, como TNF- α e IL-10 (Hong et al. 2019). En particular, sería interesante investigar si BGA6 es capaz de interferir con la interacción de Gal-4 con los glicanos presentes en CD14, la molécula clave en la diferenciación de monocitos a macrófagos y en la secreción de estas citoquinas.

Nuestra hipótesis inicial con respecto al aumento en la proporción de linfocitos T CD4⁺ de memoria en ganglio mesentérico apuntaba a una migración defectuosa, ya que se sabe que una vez activados en los ganglios, los linfocitos pueden volver al torrente sanguíneo y dirigirse al intestino mediante receptores de superficie específicos. Una integrina clave que media el *homing* intestinal es el heterodímero $\alpha 4\beta 7$, que se une a MAdCAM-1 en las células endoteliales intestinales (Neurath 2019). Otro importante es la integrina $\alpha E\beta 7$ (CD103), que se expresa en la superficie de células T de memoria efectora proinflamatorias en el intestino, y es ligando de la E-cadherina en las células epiteliales intestinales (Neurath 2019). Las células T de memoria residentes en los tejidos expresan CD103, que interactúa con E-cadherina, la lectina tipo C CD69 que interactúa con el receptor de esfingosina-1-fosfato (S1PR1), y bajos niveles de la molécula de adhesión CD62L y del receptor de quimiocinas CX3CR1, para evitar señales de salida (Neurath 2019). Sin embargo, en nuestras determinaciones, no encontramos diferencias en los marcadores de migración a intestino en el ganglio mesentérico.

Es por esto que planteamos la hipótesis de que Gal-4 esté actuando de forma directa en esta población de linfocitos T, ya sea inhibiendo su diferenciación u ocasionando su apoptosis. De esta forma, se podría explicar que en ratones deficientes de esta proteína, se encuentre aumentada esta población de linfocitos T. Si bien nuestros ensayos *in vitro* no mostraron un efecto directo de Gal-4 sobre la diferenciación de estas células, es necesario recordar que para dichos ensayos se emplearon linfocitos obtenidos a partir de bazo de ratones sanos, y no de ganglio mesentérico de ratones con inflamación intestinal, por lo que la glicosilación de estas células podría ser diferente, y por ende la unión y el efecto de Gal-4.

En el trabajo publicado por Paclik et al. (Paclik, Danese, et al. 2008), se propone a CD3 como un posible receptor de Gal-4 en linfocitos T. La evidencia presentada en este trabajo se basa en una inmunoprecipitación y una citometría de flujo donde se evidencia la unión

a CD3, pero sin un control que descarte otras interacciones, ya que el estudio fue realizado con un anticuerpo anti-CD3, que podría interferir en la unión de Gal-4. Considerando la necesidad de identificar con mayor precisión el receptor de Gal-4, un enfoque más adecuado sería realizar una purificación por afinidad utilizando una columna con Gal-4 unida a Affigel-10 y un lisado de membranas plasmáticas de PBMCs activados, seguido de una identificación por espectrometría de masas de las bandas observadas. Considerando que Gal-9 también muestra alta afinidad por glicanos de los grupos sanguíneos y que se ha descrito a CD44 como un ligando (Wu et al. 2014), hipotetizamos que este último podría ser receptor potencial para Gal-4 en estas células. Al momento de presentar esta Tesis, estamos coordinando con la Dra. María Fernanda Troncoso (FFyB, UBA) la determinación de potenciales ligandos de Gal-4 por espectrometría de masas en células epiteliales.

5.2. Gal-4 se une preferencialmente a oligosacáridos $\alpha\alpha$ (1,2)-fucosilados tipo grupo sanguíneo, que están presentes en la superficie de microbios

La familia de las galectinas, en particular Gal-3, -4, -7, -8 y -9, ha recibido creciente atención debido a su actividad antibacteriana (Liu y Stowell 2023). Estas proteínas poseen una habilidad única dentro del sistema inmunológico: pueden identificar y atacar específicamente microbios que presentan antígenos similares a los del huésped, sin afectar a las propias células (Liu y Stowell 2023). Esta capacidad les permite actuar como un mecanismo de defensa especializado contra el mimetismo molecular. De este modo, las galectinas complementan la función de los anticuerpos, proporcionando una forma de inmunidad única y altamente selectiva frente a patógenos que simulan componentes del propio organismo (Stowell et al. 2014).

En este sentido, se ha propuesto que la interacción de los antígenos de los grupos sanguíneos (BGAs) con Gal-3, -4 y -7 humanas podría servir como puente entre la inmunidad innata y adaptativa (Kamili et al. 2016; Rath y Haller 2022). Dado que los individuos con grupo sanguíneo A, B o AB positivo no pueden producir anticuerpos contra otros grupos sanguíneos y que muchos microorganismos se encuentran “decorados” con BGAs como una estrategia de mimetismo molecular para la infección, se ha propuesto que el reconocimiento de los BGAs del sistema ABO por galectinas podría conferir protección contra estos patógenos (Arthur et al. 2015). Particularmente, en el caso de Gal-7 con expresión preferencial en la piel y Gal-4 en el intestino, estas interacciones podrían ser relevantes como mecanismos de defensa inmune innata (Arthur et al. 2015; Kamili et al. 2016). Estos efectos no están restringidos a Gal-4 y -7 humanas, ya que se han documentado resultados similares para Gal-8 (Stowell et al. 2008), así como para Gal-9 de longitud completa y sus DRCs (Blenda et al. 2022).

Si bien los oligosacáridos tipo grupo sanguíneo A son reconocidos por diferentes miembros de la familia de las galectinas, se observó una selectividad importante para Gal- 4 humana de longitud completa, cuando evaluamos su afinidad en comparación con Gal- 1, -3, -7 y -12 (Cagnoni et al. 2024). Nuestros datos y los reportes previos indican que Gal- 4 humana completa, al igual que sus dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRDs), exhibe una alta selectividad por glicanos que presentan fucosilación $\alpha(1,2)$ como el antígeno BGA6, un antígeno sanguíneo presente en la superficie celular de eritrocitos de tipo A y en ciertos patógenos (Quintana et al. 2021, 2024).

Desde el punto de vista estructural, nuestros análisis sugieren que el péptido linker de Gal-4 puede contribuir a la estabilización del complejo lectina-glicano, en particular cuando el ligando está presente en ambos dominios DRC. Si bien estudios por ITC y RMN han mostrado que los DRCs pueden unirse independientemente a BGA6, éste no fue el caso para ligandos más complejos como LPS con variantes de antígenos sanguíneos, lo que refuerza la idea de que la arquitectura tándem de Gal-4 adquiere relevancia en contextos multivalentes (J. I. Quintana et al. 2024). La multivalencia permitiría un entrecruzamiento eficiente de glicanos en la superficie bacteriana o celular, dotando a la interacción de una mayor estabilidad y funcionalidad en contextos fisiológicos.

Las discusiones en el área indican que la unión de una galectina a la superficie celular es un fenómeno complejo. Este fenómeno no depende únicamente del epítipo glicosídico, sino también de la naturaleza de la glicoproteína que lo porta. La complejidad aumenta aún más al considerar la capacidad de autoasociación de algunas galectinas, como se ha demostrado para Gal-3 (una galectina quimérica), donde la multimerización facilita el "apilamiento" de lectinas en el sitio de unión. Este efecto potencia la unión a los ligandos y evita la saturación típica de interacciones ligando-receptor (Leffler 2023). En este contexto, adquieren particular relevancia tanto el péptido linker como la presencia simultánea de dos dominios de reconocimiento de carbohidratos (DRCs) en galectinas tándem, con afinidades similares, pero no idénticas, como es el caso de Gal-4. Tomando como referencia los estudios evolutivos que indican que las galectinas prototipo surgen desde las galectinas tándem, y que en recientes estudios biotecnológicos se han generado quimeras Gal-1-Gal-3 con actividad biológica mejorada (Fettis, Farhadi, y Hudalla 2019), estudios futuros sobre la relevancia de los diferentes DRCs y el péptido linker en las galectinas tándem seguramente esclarecerán sus funciones en contextos fisiológicos y patológicos.

Considerando que Gal-4 intracelular es capaz de encapsular bacterias citosólicas e impedir su transporte al ganglio mesentérico (Li et al. 2023) y de eliminar bacterias que expresan grupos sanguíneos en su superficie (Stowell et al. 2010), y nuestros propios resultados sobre la selectividad de Gal-4 hacia los antígenos de los grupos sanguíneos (Cagnoni et al. 2024; Quintana et al. 2021; J. I. Quintana et al. 2024), se refuerza la hipótesis que plantea que las interacciones entre Gal-4 y la microbiota, en particular con bacterias que expresan oligosacáridos tipo grupo sanguíneo, desempeñan papeles clave

aún inexplorados en la evolución de los mecanismos de defensa intestinal. Por lo tanto, proponemos que la ausencia de Gal-4 podría favorecer la expansión de bacterias que expresan estos glicanos, hacia los cuales Gal-4 muestra afinidad preferencial. Tal cambio en la composición microbiana podría contribuir a la disbiosis observada en inflamación intestinal, y facilitar la llegada de bacterias patogénicas al ganglio mesentérico, lo que contribuiría a la expansión de linfocitos T de memoria observada en nuestro modelo experimental de inflamación aguda y crónica. En este sentido, planeamos a futuro, y fuera de esta tesis, estudios de microbiota para determinar que poblaciones bacterianas se alteran en el modelo de inflamación intestinal en ausencia de Gal-4.

La disbiosis asociada a la inflamación intestinal ha dado lugar a estrategias terapéuticas como los probióticos, los prebióticos o el trasplante de microbiota fecal; sin embargo, abordar las causas subyacentes de la disbiosis en el huésped y normalizar las funciones del huésped que controlan el crecimiento microbiano podría proporcionar una mejor comprensión de la disbiosis y un punto de partida alternativo para nuevas estrategias terapéuticas (Winter y Bäumlér 2023). Junto con la IgA secretoria, los péptidos antimicrobianos derivados del huésped (AMP) son moléculas clave en la configuración de la microbiota (Zhang et al. 2023). En este sentido es que resulta interesante evaluar el efecto de la administración de Gal-4 recombinante en animales depletados para esta lectina. Considerando que recientemente se ha descrito que Gal-4C presenta actividad antibacteriana, y que es capaz de autodimerizar, a diferencia del dominio de Gal-4N (Jan et al. 2024), en estudios futuros nos proponemos evaluar la administración de Gal-4 completa y también de su dominio C-terminal (Gal-4C) en animales deficientes en Gal-4 epitelial como prueba de concepto para el control de la disbiosis inducida por inflamación.

5.3. Gal-4 se une a las células de Paneth

Al momento del inicio de esta tesis, Gal-4 se había descrito como una proteína adaptadora que modula el tráfico de glicoproteínas (Ideo et al., 2013), en particular en el transporte apical de proteínas a través de la interacción de esta lectina con los N- y O-glicanos de la superficie (Delacour et al., 2005; Ideo et al., 2013). En particular, algunos estudios apuntaban a que Gal-4 era capaz de interactuar con los glicanos presentes en MUC1 (Delacour et al. 2005). Esto nos llevó a pensar que las células epiteliales de los ratones *Gal4^{ΔIEC}* podrían presentar una glicosilación alterada, como consecuencia de un tráfico deficiente. Sin embargo, la evaluación por citometría de flujo no demostró cambios en la glicosilación de superficie de las células epiteliales de colon ni de intestino delgado, al menos para las lectinas ensayadas y con los marcadores disponibles (Epcam+CD32- CD45-). Para realizar estos ensayos nos encontramos con otra limitación que es la falta de lectinas que evalúen específicamente los ligandos de Gal-4, incluyendo O-glicanos sulfatados. Al momento de la finalización de esta Tesis, hipotetizamos que los cambios en la glicosilación que se producirían durante la inflamación intestinal en mucinas podrían ser consecuencia del déficit en el transporte que se asociaría con la ausencia de Gal-4 y el

microambiente inflamatorio en conjunto, y planeamos ampliar los resultados utilizando anticuerpos específicos (Hirakawa et al. 2010).

Considerando la preferencia de unión de Gal-4 por glicanos sulfatados (abundantes en mucinas producidas por células de Goblet intestinales) (Delacour et al. 2005; Ideo et al. 2002, 2005; Ideo, Seko, y Yamashita 2007), y glicanos $\alpha(1,2)$ -fucosilados (una modificación que se demostró como característica de células Paneth) (Kamioka et al. 2022), hipotetizamos que las Gal-4 podría interaccionar con estos tipos celulares. Notablemente, los ensayos de inmunofluorescencia con rGal-4 mostraron que rGal-4 se une con mayor intensidad a células epiteliales Lyz1⁺, una proteína altamente expresada en células de Paneth y frecuentemente utilizado como marcador de este tipo celular. De manera congruente, los ensayos de citometría de flujo mostraron que rGal-4 es capaz de unirse a células CD44⁺, un marcador de superficie presente (pero no excluyente) de las células de Paneth.

Conectado con nuestros resultados, un trabajo reciente identificó dos subtipos de células de Paneth murinas, diferenciados por su producción y utilización de la fucosiltransferasa 2 (Fut2), enzima que regula la $\alpha(1,2)$ -fucosilación y contribuye a la formación de nichos donde cohabitan bacterias comensales, así como participa en la prevención de la invasión intestinal por bacterias patogénicas (Kamioka et al., 2022). Las células de Paneth Fut2⁺ presentaron mayor granularidad y complejidad estructural en comparación con las Fut2⁻, lo que sugiere que las primeras están involucradas en la defensa del huésped. De acuerdo con nuestros resultados sobre la selectividad de unión de Gal-4 (esta tesis, Cagnoni, Massaro et al., 2024), las células de Paneth Fut2⁺ podrían ser potenciales dianas de unión para Gal-4. Notablemente, y considerando la reciente descripción de un circuito regulador (Kamioka et al. 2022), donde la señalización por bacterias comensales junto con IL-22 induce el desarrollo de Paneth cells Fut2⁺, y donde IL-22 afecta la secreción de α - defensina por modulación de Fut2, al momento de la escritura de esta Tesis nos preguntamos si Gal-4 podría jugar un papel en este circuito, ya sea por interacción con sus ligandos (biosintetizados por esta glicosiltransferasa), o por su capacidad de controlar la microbiota. Esta hipótesis será explorada en trabajos más allá de esta Tesis.

Se ha descrito que, durante una infección bacteriana, la disrupción del aparato de Golgi (responsable, entre otras funciones, de la secreción de lisozima) provoca que la lisozima sea redirigida a través de la autofagia secretora (Cui et al. 2023). La autofagia ha emergido como un proceso clave en la integridad de la barrera intestinal, y se han propuesto compuestos que modulan esta vía como potenciales terapias en enfermedad de Crohn (Tran et al. 2023; Yuan et al. 2024). Galectinas intracelulares como Gal-3, -8 y -9 están implicadas en la vigilancia celular, regulando la autofagia a través de interacciones con TRIM16, ATG16L1 o NDP52 (Thurston et al. 2012; Chauhan et al. 2016; Sudhakar et al. 2020). De manera interesante, Gal-9 regula la autofagia en células de Paneth mediante su interacción con Lamp2, pero no hay datos publicados respecto del papel de Gal-4 en el proceso de autofagia. Como consecuencia de los resultados obtenidos en esta tesis, y

teniendo en cuenta las similitudes en las afinidades de Gal-4 y Gal-9, nos preguntamos si Gal-4 podría tener funciones como las descritas para Gal-9 (Sudhakar et al. 2020) en el contexto de la autofagia. Al momento de entrega de esta Tesis, y en colaboración con el laboratorio de Regulación Hipofisaria (IBYME), y en particular con la Dra. Eleonora Sorianello y el Lic. Luis Méndez estamos realizando inmunofluorescencias para evaluar la unión de Gal-4 a componentes lisosomales asociados con la vía de la autofagia.

Finalmente, y si bien las células Paneth son reconocidas por el control de la composición microbiana, también son capaces de comunicarse y mantener las células madre intestinales, se involucran en la absorción de metales, y están involucradas en la fagocitosis, esferocitosis y la preservación de la función de barrera (Wallaey, Garcia- Gonzalez, y Libert 2022). Por lo tanto, sería interesante estudiar a futuro si alguna de estas funciones se encuentra alterada en estos animales.

5.4. El balance entre los niveles intracelulares y extracelulares de Gal-4 es importante para la promoción de la regeneración epitelial

Uno de los objetivos terapéuticos que ha cobrado importancia en los últimos tiempos para las EII es la reparación de la barrera epitelial, consecuente a la cicatrización de heridas generadas por la inflamación continua (Villablanca et al. 2022). Sin embargo, la mayoría de los tratamientos actuales de las EII apuntan a la inhibición de la respuesta inmune, llevando a la inmunosupresión. Sólo algunos fármacos han demostrado ser capaces de influir en algunos aspectos relacionados a la regeneración epitelial, como la autofagia y la inducción de macrófagos antiinflamatorios, aunque sus efectos principales son en la inhibición de funciones inmunes (Levin, Wildenberg, y van den Brink 2016; Hooper et al. 2017). La diferenciación del epitelio intestinal está gobernada por rutas de señalización como Wnt y está estrechamente vinculada a la salud de las células *stem*. Polimorfismos genéticos asociados a colitis ulcerosa se localizan en regiones regulatorias activas de células epiteliales, y estudios recientes han demostrado que estos epitelios presentan firmas transcripcionales alteradas, incluso después de la resolución de la inflamación (Dotti et al., 2017; Maciak et al., 2024).

En la bibliografía, la disminución en la expresión de Gal-4 en líneas de células tumorales de cáncer de colon (como HT-29) se relacionó con una mayor tumorigénesis (Kim et al. 2013), proliferación, migración y movilidad celular (Satelli et al. 2011). Para nuestra sorpresa, no observamos diferencias los niveles de ARNm por análisis de transcriptómica en los diferentes linajes de células epiteliales (desde menos diferenciadas hacia más diferenciadas), ni una distribución espacial diferencial (desde la cripta con mayor presencia de células *stem*, hacia el vili, con mayor presencia de células diferenciadas, (**Sección 4.3.1**). A pesar de las limitaciones que existen en la identificación de células epiteliales mediante citometría de flujo, encontramos una disminución en la proporción de

células epiteliales que expresan CD44 en los ratones deficientes para Gal-4 (*Gal4^{ΔIEC}*). La expresión de CD44, al igual que de CD24 y CD133, se asocia a células madre intestinales y células de Paneth (Sahlberg et al. 2014). Notablemente, y si bien las células Paneth son reconocidas por el control de la composición microbiana también son capaces de comunicarse y mantener las células madre intestinales y la preservación de la función de barrera (Wallaey et al. 2022). Se ha propuesto también que la delección de CD44 en el tejido epitelial lleva a una disminución en la vía de señalización de Wnt, que resulta suficiente para la regeneración epitelial en condiciones homeostáticas, pero no para restaurar el daño inducido por DSS (Walter et al. 2022). Por lo tanto, resultará interesante evaluar en qué medida la regeneración del tejido epitelial en ratones transgénicos deficientes en Gal-4 epitelial se encuentra afectada, ya que como se demostró en esta Tesis, presentan una menor proporción de células CD44⁺. Si la regeneración de tejido estuviera afectada, ésta podría ser causa de la mayor pérdida de peso observada en ratones transgénicos expuestos al modelo de inflamación crónica inducida por DSS.

En líneas celulares (HT-29, HCT-116, Caco2), la respuesta a la estimulación extracelular con rGal-4 depende de la expresión basal de Gal-4. Esto sugiere que esta lectina actúa de manera contexto-dependiente y que su función puede estar modulada por el entorno molecular preexistente (Satelli et al. 2011). En la línea celular HT29, que presenta una alta expresión basal de Gal-4, la estimulación con rGal-4 induce apoptosis celular, disminución de la expresión de Bcl2, arresto del ciclo celular y reducción de la proliferación y migración celulares (Satelli et al. 2011). Asimismo, la sobreexpresión de Gal-4 en células HCT116, con bajos niveles de expresión de Gal-4, inhibe la vía de Wnt, reduciendo la expresión de sus genes blanco y mostrando una relación inversa entre la expresión de Gal-4 y la activación de Wnt (Satelli et al. 2011). En cambio, en Caco2, donde la expresión basal de Gal-4 es mínima o indetectable, la estimulación con rGal-4 no induce apoptosis, sino que favorece la reparación de heridas y el aumento de ciclinas B1, además de promover la interacción con β -catenina (Paclik, Lohse, et al. 2008). Esto indicaría que el nivel intracelular de Gal-4 determina la respuesta celular a su estimulación exógena y condiciona si la célula activa rutas de apoptosis o proliferación.

Considerando estos antecedentes, nos resultó interesante estudiar el efecto de la estimulación de organoides de intestino delgado, cultivos primarios de células epiteliales tridimensionales, con rGal-4. Una diferencia importante entre las criptas del intestino delgado y del colon es la ausencia de células de Paneth clásicas en este último. En el nicho de células madre del intestino delgado, las células de Paneth son las principales productoras de WNT3, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y señales de Notch (Haramis et al. 2004). Nuestros resultados demuestran que los organoides evaluados (provenientes de criptas de animales WT, con niveles no alterados de Gal-4) apuntan a que la adición de rGal-4 disminuye la proliferación de los organoides generados a partir de criptas, y van en línea con los antecedentes en líneas celulares previamente citados (Satelli et al. 2011). En este sentido sería interesante evaluar si el efecto de la menor

proliferación de los organoides se debe a una menor señalización a través de la vía de Wnt, y aún más intrigante, explorar el comportamiento de organoides generados de intestino de ratones *Gal4^{ΔIEC}*. Estos experimentos serán llevados adelante fuera del marco de esta Tesis.

6 Reflexiones finales

Al comenzar esta tesis, y a lo largo de todo este recorrido doctoral, nos propusimos abordar un interrogante central: ¿cuál es el rol de Gal-4 en la inflamación intestinal? ¿Se comporta como una molécula antiinflamatoria o proinflamatoria? ¿Contribuye al desarrollo de la inflamación o, por el contrario, promueve su resolución? Cinco años más tarde, hemos logrado acercarnos a una posible respuesta, aunque aún no hemos podido desentrañar por completo las múltiples funciones que esta lectina desempeña en el intestino. Lo que sí ha quedado claro es que abordar esta pregunta requiere una perspectiva integradora y contextualizada.

En primer lugar, el rol de Gal-4 es profundamente dependiente del contexto. Factores como el tipo celular con el que interactúa, su localización intra- o extracelular, y los niveles basales de expresión en los distintos compartimentos celulares influyen de manera decisiva en sus efectos funcionales. Nuestros resultados, en línea con algunos estudios previos, muestran que la estimulación de linfocitos T con Gal-4 induce la secreción de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, y en base a nuestros datos y los preexistentes en bibliografía, estamos convencidos de que el rol de esta proteína trasciende el ámbito estrictamente inmune.

Como se discutió en los capítulos iniciales, gran parte del conocimiento disponible al inicio de esta tesis se centraba en el estudio de Gal-4 en linfocitos T, lo cual generaba la impresión de que estos eran los protagonistas exclusivos de su acción. Esta visión estuvo probablemente condicionada por las herramientas tecnológicas disponibles en ese momento, que favorecían el análisis funcional en células inmunes. Hoy, el desarrollo de nuevas tecnologías como la transcriptómica espacial y los modelos tridimensionales multicelulares ha permitido un cambio de enfoque: desde la resolución de la inflamación hacia la promoción de la regeneración, y desde una mirada centrada en el sistema inmune hacia una comprensión más amplia, espacial y multicelular del tejido intestinal.

En este nuevo marco, y frente a los desafíos que plantea la enfermedad inflamatoria intestinal, se vuelve especialmente relevante profundizar en el estudio del papel de Gal-4 en las células epiteliales. En este tipo celular, su función parece depender tanto de los niveles basales de expresión como del contexto inflamatorio. Además, un aspecto no menor es el avance de la bibliografía sobre el rol de Gal-4 como regulador microbiano, con potencial actividad microbicida.

Considerando qué células la producen mayoritariamente y su especificidad de unión a residuos sulfatados y fucosilados, abundantemente presentes en el lumen intestinal, sostenemos que el rol principal de Gal-4 se ejerce sobre la interfaz entre el huésped y la microbiota. Es en ese límite dinámico donde creemos que esta proteína podría cumplir

funciones clave, tanto en la contención microbiana (con efectos en la respuesta inmunológica) como en el mantenimiento de la homeostasis epitelial.

7 Referencias

- Allaire, Joannie M., Shauna M. Crowley, Hong T. Law, Sun-Young Chang, Hyun-Jeong Ko, y Bruce A. Vallance. 2018. «The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity». *Trends in Immunology* 39(9):677-96. doi: 10.1016/j.it.2018.04.002.
- Arthur, Connie M., Seema R. Patel, Amanda Mener, Nourine A. Kamili, Ross M. Fasano, Erin Meyer, Annie M. Winkler, Martha Sola-Visner, Cassandra D. Josephson, y Sean R. Stowell. 2015. «Innate Immunity against Molecular Mimicry: Examining Galectin-Mediated Antimicrobial Activity». *BioEssays* 37(12):1327-37. doi: 10.1002/bies.201500055.
- Bábíčková, Janka, Ľubomíra Tóthová, Eva Lengyelová, Anastázie Bartoňová, Július Hodosy, Roman Gardlík, y Peter Celec. 2015. «Sex Differences in Experimentally Induced Colitis in Mice: A Role for Estrogens». *Inflammation* 38(5):1996-2006. doi: 10.1007/s10753-015-0180-7.
- Belkaid, Yasmine, y Timothy W. Hand. 2014. «Role of the Microbiota in Immunity and Inflammation». *Cell* 157(1):121-41. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.011.
- Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, y J. R. Haak. 1984. «Molecular dynamics with coupling to an external bath». *The Journal of Chemical Physics* 81(8):3684-90. doi: 10.1063/1.448118.
- Berre, Catherine Le, Sailish Honap, y Laurent Peyrin-Biroulet. 2023. «Ulcerative Colitis». *The Lancet* 402(10401):571-84. doi: 10.1016/S0140-6736(23)00966-2.
- Bishu, Shrinivas, Mohammed El Zaatari, Atsushi Hayashi, Guoqing Hou, Nicole Bowers, Jami Kinnucan, Beth Manoogian, Michelle Muza-Moons, Min Zhang, Helmut Grasberger, Charlie Bourque, Weiping Zou, Peter D. R. Higgins, Jason R. Spence, Ryan W. Stidham, Nobuhiko Kamada, y John Y. Kao. 2019. «CD4⁺ Tissue- resident Memory T Cells Expand and Are a Major Source of Mucosal Tumour Necrosis Factor α in Active Crohn's Disease». *Journal of Crohn's & Colitis* 13(7):905-15. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz010.

- Blenda, Anna V., Nourine A. Kamili, Shang-Chuen Wu, William F. Abel, Diyoly Ayona, Christian Gerner-Smidt, Alex D. Ho, Guy M. Benian, Richard D. Cummings, Connie M. Arthur, y Sean R. Stowell. 2022. «Galectin-9 recognizes and exhibits antimicrobial activity toward microbes expressing blood group-like antigens». *Journal of Biological Chemistry* 298(4):101704. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.101704>.
- Block, Mattias, Johan Mölne, Hakon Leffler, Lars Börjesson, y Michael E. Breimer. 2016. «Immunohistochemical Studies on Galectin Expression in Colectomised Patients with Ulcerative Colitis». *BioMed Research International* 2016:5989128. doi: 10.1155/2016/5989128.
- Brazil, Jennifer C., y Charles A. Parkos. 2022. «Finding the Sweet Spot: Glycosylation Mediated Regulation of Intestinal Inflammation». *Mucosal Immunology* 15(2):211-22. doi: 10.1038/s41385-021-00466-8.
- Brockhausen, Inka, Hans H. Wandall, Kelly G. Ten Hagen, y Pamela Stanley. 2022. «O-GalNAc Glycans». en *Essentials of Glycobiology*, editado por A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, y P. H. Seeberger. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bum-Erdene, Khuchtumur, Hakon Leffler, Ulf J. Nilsson, y Helen Blanchard. 2015. «Structural Characterization of Human Galectin-4 C-Terminal Domain: Elucidating the Molecular Basis for Recognition of Glycosphingolipids, Sulfated Saccharides and Blood Group Antigens». *The FEBS Journal* 282(17):3348-67. doi: 10.1111/febs.13348.
- Bum-Erdene, Khuchtumur, Hakon Leffler, Ulf J. Nilsson, y Helen Blanchard. 2016. «Structural Characterisation of Human Galectin-4 N-Terminal Carbohydrate Recognition Domain in Complex with Glycerol, Lactose, 3'-Sulfo-Lactose, and 2'-Fucosyllactose». *Scientific Reports* 6:20289. doi: 10.1038/srep20289.
- Cadwell, Ken, John Y. Liu, Sarah L. Brown, Hiroyuki Miyoshi, Joy Loh, Jochen K. Lennerz, Chieko Kishi, Wumesh Kc, Javier A. Carrero, Steven Hunt, Christian D. Stone, Elizabeth M. Brunt, Ramnik J. Xavier, Barry P. Sleckman, Ellen Li, Noboru Mizushima, Thaddeus S. Stappenbeck, y Herbert W. Virgin IV. 2008. «A Key Role for Autophagy and the Autophagy Gene Atg16l1 in Mouse and Human Intestinal Paneth Cells». *Nature* 456(7219):259-63. doi: 10.1038/nature07416.
- Cagnoni, Alejandro J., José Kovensky, y María Laura Uhrig. 2014. «Design and Synthesis of Hydrolytically Stable Multivalent Ligands Bearing Thiodigalactoside Analogues for Peanut Lectin and Human Galectin-3 Binding». *The Journal of Organic Chemistry* 79(14):6456-67. doi: 10.1021/jo500883v.
- Cagnoni, Alejandro J., Mora Massaro, Anabela M. Cutine, Ana Gimeno, Juan M. Pérez-Sáez, Montana N. Manselle Cocco, Sebastián M. Maller, Santiago Di Lella, Jesús Jiménez-Barbero, Ana Ardá, Gabriel A. Rabinovich, y Karina V. Mariño. 2024. «Exploring Galectin Interactions with Human Milk Oligosaccharides and Blood Group Antigens Identifies BGA6 as a Functional Galectin-4 Ligand». *Journal of Biological Chemistry* 300(8). doi: 10.1016/j.jbc.2024.107573.

- Cao, Zhan-Qi, y Xiu-Li Guo. 2016. «The Role of Galectin-4 in Physiology and Diseases». *Protein & Cell* 7(5):314-24. doi: 10.1007/s13238-016-0262-9.
- Case, D. A., H. M. Aktulga, K. Belfon, I. Y. Ben-Shalom, J. T. Berryman, S. R. Brozell, D. S. Cerutti, T. E. Cheatham, III, G. A. Cisneros, V. W. D. Cruzeiro, T. A. Darden, R. E. Duke, G. Giambasu, M. K. Gilson, H. Gohlke, A. W. Goetz, R. Harris, S. Izadi, S. A. Izmailov, y P. A. Kollman. 2022. «Amber 22».
- Chang, John T. 2020. «Pathophysiology of Inflammatory Bowel Diseases». *New England Journal of Medicine* 383(27):2652-64. doi: 10.1056/NEJMra2002697.
- Chauhan, Santosh, Suresh Kumar, Ashish Jain, Marisa Ponpuak, Michal H. Mudd, Tomonori Kimura, Seong Won Choi, Ryan Peters, Michael Mandell, Jack-Ansgar Bruun, Terje Johansen, y Vojo Deretic. 2016. «TRIMs and Galectins globally cooperate and TRIM16 and Galectin-3 co-direct autophagy in endomembrane damage homeostasis». *Developmental cell* 39(1):13-27. doi: 10.1016/j.devcel.2016.08.003.
- Corfield, A. P., N. Myerscough, N. Bradfield, C. do A. Corfield, M. Gough, J. R. Clamp, P. Durdey, B. F. Warren, D. C. Bartolo, K. R. King, y J. M. Williams. 1996. «Colonic Mucins in Ulcerative Colitis: Evidence for Loss of Sulfation». *Glycoconjugate Journal* 13(5):809-22. doi: 10.1007/BF00702345.
- Cummings, Richard D., Fu-Tong Liu, y Gerardo R. Vasta. 2015. «Galectins». en *Essentials of Glycobiology*, editado por A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, A. G. Darvill, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, y P. H. Seeberger. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cutine, Anabela M., Camila A. Bach, Florencia Veigas, Joaquín P. Merlo, Lorena Laporte, Montana N. Manselle Cocco, Mora Massaro, Nicolas Sarbia, Ramiro M. Perrotta, Yamil D. Mahmoud, y Gabriel A. Rabinovich. 2021. «Tissue-Specific Control of Galectin-1-Driven Circuits during Inflammatory Responses». *Glycobiology* 31(8):891-907. doi: 10.1093/glycob/cwab007.
- Das, Srustidhar, S. Martina Parigi, Xinxin Luo, Jennifer Fransson, Bianca C. Kern, Ali Okhovat, Oscar E. Diaz, Chiara Sorini, Paulo Czarnewski, Anna T. Webb, Rodrigo A. Morales, Sacha Lebon, Gustavo Monasterio, Francisca Castillo, Kumar P. Tripathi, Ning He, Penelope Pelczar, Nicola Schaltenberg, Marjorie De la Fuente, Francisco López-Köstner, Susanne Nylén, Hjalte List Larsen, Raoul Kuiper, Per Antonson, Marcela A. Hermoso, Samuel Huber, Moshe Biton, Sandra Scharaw, Jan-Åke Gustafsson, Pekka Katajisto, y Eduardo J. Villablanca. 2025. «Liver X Receptor Unlinks Intestinal Regeneration and Tumorigenesis». *Nature* 637(8048):1198-1206. doi: 10.1038/s41586-024-08247-6.
- Deacon, Robert M. J. 2006. «Housing, Husbandry and Handling of Rodents for Behavioral Experiments». *Nature Protocols* 1(2):936-46. doi: 10.1038/nprot.2006.120.
- Delacour, Delphine, Valérie Gouyer, Jean-Pierre Zanetta, Hervé Drobecq, Emmanuelle Leteurtre, Georges Grard, Odile Moreau-Hannedouche, Emmanuel Maes, Alexandre Pons, Sabine André, André Le Bivic, Hans Joachim Gubius, Aki Manninen, Kai Simons, y Guillemette Huet. 2005. «Galectin-4 and sulfatides in

- apical membrane trafficking in enterocyte-like cells». *The Journal of Cell Biology* 169(3):491-501. doi: 10.1083/jcb.200407073.
- Demetriou, Michael, Maria Granovsky, Sue Quaggin, y James W. Dennis. 2001. «Negative Regulation of T-Cell Activation and Autoimmunity by Mgat5 N-Glycosylation». *Nature* 409(6821):733-39. doi: 10.1038/35055582.
- Deretic, Vojo, Sharon Master, y Sudha Singh. 2008. «Autophagy Gives a Nod and a Wink to the Inflammasome and Paneth Cells in Crohn's Disease». *Developmental Cell* 15(5):641-42. doi: 10.1016/j.devcel.2008.10.009.
- Dias, Ana M., Alexandra Correia, Márcia S. Pereira, Catarina R. Almeida, Inês Alves, Vanda Pinto, Telmo A. Catarino, Nuno Mendes, Magdalena Leander, M. Teresa Oliva-Teles, Luís Maia, Cristina Delerue-Matos, Naoyuki Taniguchi, Margarida Lima, Isabel Pedroto, Ricardo Marcos-Pinto, Paula Lago, Celso A. Reis, Manuel Vilanova, y Salomé S. Pinho. 2018. «Metabolic Control of T Cell Immune Response through Glycans in Inflammatory Bowel Disease». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(20):E4651-60. doi: 10.1073/pnas.1720409115.
- Dias, Ana M., Joana Dourado, Paula Lago, Joana Cabral, Ricardo Marcos-Pinto, Paulo Salgueiro, Catarina R. Almeida, Sandra Carvalho, Sónia Fonseca, Margarida Lima, Manuel Vilanova, Mário Dinis-Ribeiro, Celso A. Reis, y Salomé S. Pinho. 2014. «Dysregulation of T Cell Receptor N-Glycosylation: A Molecular Mechanism Involved in Ulcerative Colitis». *Human Molecular Genetics* 23(9):2416-27. doi: 10.1093/hmg/ddt632.
- Fachal, L. 2024. «OP08 Multi-ancestry genome-wide association study of inflammatory bowel disease identifies 125 novel loci and directly implicates new genes in disease susceptibility». *Journal of Crohn's and Colitis* 18(Supplement_1):i14-15. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjad212.0008.
- Fakhoury, Marc, Rebecca Negrulj, Armin Mooranian, y Hani Al-Salami. 2014. «Inflammatory bowel disease: clinical aspects and treatments». *J Inflamm Res* 7:113-20. doi: 10.2147/JIR.S65979.
- Faye, Adam S., Kristine Højgaard Allin, Aske T. Iversen, Manasi Agrawal, Jeremiah Faith, Jean-Frederic Colombel, y Tine Jess. 2023. «Antibiotic Use as a Risk Factor for Inflammatory Bowel Disease across the Ages: A Population-Based Cohort Study». *Gut* 72(4):663-70. doi: 10.1136/gutjnl-2022-327845.
- Fettis, Margaret M., Shaheen A. Farhadi, y Gregory A. Hudalla. 2019. «A Chimeric, Multivalent Assembly of Galectin-1 and Galectin-3 with Enhanced Extracellular Activity». *Biomaterials Science* 7(5):1852-62. doi: 10.1039/C8BM01631C.
- Fujii, Hironobu, Shinichiro Shinzaki, Hideki Iijima, Kana Wakamatsu, Chizuru Iwamoto, Tomoaki Sobajima, Ryusuke Kuwahara, Satoshi Hiyama, Yoshito Hayashi, Shinji Takamatsu, Naofumi Uozumi, Yoshihiro Kamada, Masahiko Tsujii, Naoyuki Taniguchi, Tetsuo Takehara, y Eiji Miyoshi. 2016. «Core Fucosylation on T Cells, Required for Activation of T-Cell Receptor Signaling and Induction of Colitis in Mice, Is Increased in Patients With Inflammatory Bowel Disease». *Gastroenterology* 150(7):1620-32. doi: 10.1053/j.gastro.2016.03.002.

- von Furstenberg, Richard J., Ajay S. Gulati, Anand Baxi, Jason M. Doherty, Thaddeus S. Stappenbeck, Adam D. Gracz, Scott T. Magness, y Susan J. Henning. 2011. «Sorting mouse jejunal epithelial cells with CD24 yields a population with characteristics of intestinal stem cells». *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 300(3):G409-17. doi: 10.1152/ajpgi.00453.2010.
- Gaifem, Joana, Cláudia S. Rodrigues, Francesca Petralia, Inês Alves, Eduarda Leite-Gomes, Bruno Cavadas, Ana M. Dias, Catarina Moreira-Barbosa, Joana Revés, Renee M. Laird, Mislav Novokmet, Jerko Štambuk, Siniša Habazin, Berk Turhan, Zeynep H. Gümüş, Ryan Ungaro, Joana Torres, Gordan Lauc, Jean-Frederic Colombel, Chad K. Porter, y Salomé S. Pinho. 2024. «A Unique Serum IgG Glycosylation Signature Predicts Development of Crohn's Disease and Is Associated with Pathogenic Antibodies to Mannose Glycan». *Nature Immunology* 25(9):1692-1703. doi: 10.1038/s41590-024-01916-8.
- Garrido-Trigo, Alba, Ana M. Corraliza, Marisol Veny, Isabella Dotti, Elisa Melón-Ardanaz, Aina Rill, Helena L. Crowell, Ángel Corbí, Victoria Gudiño, Miriam Esteller, Iris Álvarez-Teubel, Daniel Aguilar, M. Carme Masamunt, Emily Killingbeck, Youngmi Kim, Michael Leon, Sudha Visvanathan, Domenica Marchese, Ginevra Caratù, Albert Martin-Cardona, Maria Esteve, Julian Panés, Elena Ricart, Elisabetta Mereu, Holger Heyn, y Azucena Salas. 2023. «Macrophage and Neutrophil Heterogeneity at Single-Cell Spatial Resolution in Human Inflammatory Bowel Disease». *Nature Communications* 14(1):4506. doi: 10.1038/s41467-023-40156-6.
- Gracz, Adam D., Megan K. Fuller, Fengchao Wang, Linheng Li, Matthias Stelzner, James C. Y. Dunn, Martin G. Martin, y Scott T. Magness. 2013. «CD24 and CD44 mark human intestinal epithelial cell populations with characteristics of active and facultative stem cells». *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31(9):2024-30. doi: 10.1002/stem.1391.
- van Gunsteren, Wilfred F., y Herman J. C. Berendsen. 1990. «Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry». *Angewandte Chemie International Edition in English* 29(9):992-1023. doi: https://doi.org/10.1002/anie.199009921.
- Habowski, Amber N., Jessica L. Flesher, Jennifer M. Bates, Chia-Feng Tsai, Kendall Martin, Rui Zhao, Anand K. Ganesan, Robert A. Edwards, Tujin Shi, H. Steven Wiley, Yongsheng Shi, Klemens J. Hertel, y Marian L. Waterman. 2020. «Transcriptomic and Proteomic Signatures of Stemness and Differentiation in the Colon Crypt». *Communications Biology* 3(1):1-17. doi: 10.1038/s42003-020-01181-z.
- Haramis, Anna-Pavlina G., Harry Begthel, Maaïke van den Born, Johan van Es, Suzanne Jonkhoe, G. Johan A. Offerhaus, y Hans Clevers. 2004. «De Novo Crypt Formation and Juvenile Polyposis on BMP Inhibition in Mouse Intestine». *Science (New York, N.Y.)* 303(5664):1684-86. doi: 10.1126/science.1093587.
- Hirakawa, Jotaro, Koichiro Tsuboi, Kaori Sato, Motohiro Kobayashi, Sota Watanabe, Atsushi Takakura, Yasuyuki Imai, Yuki Ito, Minoru Fukuda, y Hiroto Kawashima. 2010. «Novel Anti-carbohydrate Antibodies Reveal the Cooperative Function of

Sulfated *N*- and *O*-Glycans in Lymphocyte Homing*♦». *Journal of Biological Chemistry* 285(52):40864-78. doi: 10.1074/jbc.M110.167296.

- Hokama, Akira, Emiko Mizoguchi, Ken Sugimoto, Yasuyo Shimomura, Yosuke Tanaka, Masaru Yoshida, Svend T. Rietdijk, Ype P. de Jong, Scott B. Snapper, Cox Terhorst, Richard S. Blumberg, y Atsushi Mizoguchi. 2004. «Induced Reactivity of Intestinal CD4(+) T Cells with an Epithelial Cell Lectin, Galectin-4, Contributes to Exacerbation of Intestinal Inflammation». *Immunity* 20(6):681-93. doi: 10.1016/j.immuni.2004.05.009.
- Hong, So-Hee, Jun-Seop Shin, Hyunwoo Chung, y Chung-Gyu Park. 2019. «Galectin-4 Interaction with CD14 Triggers the Differentiation of Monocytes into Macrophage-like Cells via the MAPK Signaling Pathway». *Immune Netw* 19(3).
- Hooper, Kirsty M., Peter G. Barlow, Craig Stevens, y Paul Henderson. 2017. «Inflammatory Bowel Disease Drugs: A Focus on Autophagy». *Journal of Crohn's & Colitis* 11(1):118-27. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw127.
- Hornak, Viktor, Robert Abel, Asim Okur, Bentley Strockbine, Adrian Roitberg, y Carlos Simmerling. 2006. «Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters». *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 65(3):712-25. doi: <https://doi.org/10.1002/prot.21123>.
- Hu, Mingyang, Xiyun Zhang, Jinze Li, Luotong Chen, Xiaolin He, y Tingting Sui. 2022. «Fucosyltransferase 2: A Genetic Risk Factor for Intestinal Diseases». *Frontiers in Microbiology* 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.940196.
- Huang, Chien-Hsin, Tsan-Tzu Yang, y Kuo-I. Lin. 2024. «Mechanisms and functions of SUMOylation in health and disease: a review focusing on immune cells». *Journal of Biomedical Science* 31(1):16. doi: 10.1186/s12929-024-01003-y.
- Huflejt, M. E., E. T. Jordan, M. A. Gitt, S. H. Barondes, y H. Leffler. 1997. «Strikingly Different Localization of Galectin-3 and Galectin-4 in Human Colon Adenocarcinoma T84 Cells. Galectin-4 Is Localized at Sites of Cell Adhesion». *The Journal of Biological Chemistry* 272(22):14294-303. doi: 10.1074/jbc.272.22.14294.
- Humphrey, William, Andrew Dalke, y Klaus Schulten. 1996. «VMD: Visual molecular dynamics». *Journal of Molecular Graphics* 14(1):33-38. doi: [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- Ideo, Hiroko, Ikue Hoshi, Katsuko Yamashita, y Masaru Sakamoto. 2013. «Phosphorylation and Externalization of Galectin-4 Is Controlled by Src Family Kinases». *Glycobiology* 23(12):1452-62. doi: 10.1093/glycob/cwt073.
- Ideo, Hiroko, Akira Seko, Takashi Ohkura, Khushi L. Matta, y Katsuko Yamashita. 2002. «High-Affinity Binding of Recombinant Human Galectin-4 to SO₃→3Galβ1→3GalNAc Pyranoside». *Glycobiology* 12(3):199-208. doi: 10.1093/glycob/12.3.199.
- Ideo, Hiroko, Akira Seko, y Katsuko Yamashita. 2005. «Galectin-4 Binds to Sulfated Glycosphingolipids and Carcinoembryonic Antigen in Patches on the Cell Surface

- of Human Colon Adenocarcinoma Cells». *J. Biol. Chem.* 280(6):4730-37. doi: 10.1074/jbc.M410362200.
- Ideo, Hiroko, Akira Seko, y Katsuko Yamashita. 2007. «Recognition Mechanism of Galectin-4 for Cholesterol 3-Sulfate». *J. Biol. Chem.* 282(29):21081-89. doi: 10.1074/jbc.M703770200.
- Iwamuro, Masaya, Takahide Takahashi, Natsuki Watanabe, Takehiro Tanaka, Toshihiro Inokuchi, Sakiko Hiraoka, Fumio Otsuka, y Hiroyuki Okada. 2022. «Enriched CD45RA-CD62L+ Central Memory T and Decreased CD3+CD56+ Natural Killer T Lymphocyte Subsets in the Rectum of Ulcerative Colitis Patients». *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 36:20587384211051982. doi: 10.1177/20587384211051982.
- Jan, Hau-Ming, Shang-Chuen Wu, Carter J. Stowell, Mary L. Vallecillo-Zúniga, Anu Paul, Kashyap R. Patel, Sasikala Muthusamy, Hsien-Ya Lin, Diyoly Ayona, Ryan Philip Jajosky, Samata P. Varadkar, Hirotomo Nakahara, Rita Chan, Devika Bhawe, William J. Lane, Melissa Yeung, Marie Hollenhorst, Seth Rakoff-Nahoum, Richard D. Cummings, Connie M. Arthur, y Sean R. Stowell. 2024. «Galectin-4 antimicrobial activity primarily occurs through its C-terminal domain». *Molecular & Cellular Proteomics* 100747. doi: 10.1016/j.mcpro.2024.100747.
- Johannes, Ludger, Ralf Jacob, y Hakon Leffler. 2018. «Galectins at a Glance». *Journal of Cell Science* 131(9):jcs208884. doi: 10.1242/jcs.208884.
- Jones, Gareth-Rhys, Calum C. Bain, Thomas M. Fenton, Aoife Kelly, Sheila L. Brown, Alasdair C. Ivens, Mark A. Travis, Peter C. Cook, y Andrew S. MacDonald. 2018. «Dynamics of Colon Monocyte and Macrophage Activation During Colitis». *Frontiers in Immunology* 9:2764. doi: 10.3389/fimmu.2018.02764.
- Jostins, Luke, Stephan Ripke, Rinse K. Weersma, Richard H. Duerr, Dermot P. McGovern, Ken Y. Hui, James C. Lee, L. Philip Schumm, Yashoda Sharma, Carl A. Anderson, Jonah Essers, Mitja Mitrovic, Kaida Ning, Isabelle Cleynen, Emilie Theate, Sarah L. Spain, Soumya Raychaudhuri, Philippe Goyette, Zhi Wei, Clara Abraham, Jean- Paul Achkar, Tariq Ahmad, Leila Amininejad, Ashwin N. Ananthakrishnan, Vibeke Andersen, Jane M. Andrews, Leonard Baidoo, Tobias Balschun, Peter A. Bampton, Alain Bitton, Gabrielle Boucher, Stephan Brand, Carsten Büning, Ariella Cohain, Sven Cichon, Mauro D'Amato, Dirk De Jong, Kathy L. Devaney, Marla Dubinsky, Cathryn Edwards, David Ellinghaus, Lynnette R. Ferguson, Denis Franchimont, Karin Fransen, Richard Gearry, Michel Georges, Christian Gieger, Jürgen Glas, Talin Haritunians, Ailsa Hart, Chris Hawkey, Matija Hedl, Xinli Hu, Tom H. Karlsen, Limas Kupcinskas, Subra Kugathasan, Anna Latiano, Debby Laukens, Ian C. Lawrance, Charlie W. Lees, Edouard Louis, Gillian Mahy, John Mansfield, Angharad R. Morgan, Craig Mowat, William Newman, Orazio Palmieri, Cyriel Y. Ponsioen, Uros Potocnik, Natalie J. Prescott, Miguel Regueiro, Jerome I. Rotter, Richard K. Russell, Jeremy D. Sanderson, Miquel Sans, Jack Satsangi, Stefan Schreiber, Lisa A. Simms, Jurgita Sventoraityte, Stephan R. Targan, Kent D. Taylor, Mark Tremelling, Hein W. Verspaget, Martine De Vos, Cisca Wijmenga, David C. Wilson, Juliane Winkelmann, Ramnik J. Xavier, Sebastian Zeissig, Bin Zhang, Clarence K. Zhang, Hongyu Zhao, International IBD Genetics Consortium (IBDGC), Mark S. Silverberg, Vito Annese, Hakon Hakonarson, Steven R. Brant, Graham Radford-Smith, Christopher G. Mathew, John D. Rioux, Eric E. Schadt,

- Mark J. Daly, Andre Franke, Miles Parkes, Severine Vermeire, Jeffrey C. Barrett, y Judy H. Cho. 2012. «Host-Microbe Interactions Have Shaped the Genetic Architecture of Inflammatory Bowel Disease». *Nature* 491(7422):119-24. doi: 10.1038/nature11582.
- Kamili, Nourine A., Connie M. Arthur, Christian Gerner-Smidt, Eden Tafesse, Anna Blenda, Marcelo Dias-Baruffi, y Sean R. Stowell. 2016. «Key Regulators of Galectin– Glycan Interactions». *PROTEOMICS* 16(24):3111-25. doi: 10.1002/pmic.201600116.
- Kamioka, Mariko, Yoshiyuki Goto, Kiminori Nakamura, Yuki Yokoi, Rina Sugimoto, Shuya Ohira, Yosuke Kurashima, Shingo Umemoto, Shintaro Sato, Jun Kunisawa, Yu Takahashi, Steven E. Domino, Jean-Christophe Renauld, Susumu Nakae, Yoichiro Iwakura, Peter B. Ernst, Tokiyoshi Ayabe, y Hiroshi Kiyono. 2022. «Intestinal Commensal Microbiota and Cytokines Regulate Fut2⁺ Paneth Cells for Gut Defense». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119(3):e2115230119. doi: 10.1073/pnas.2115230119.
- Kaplan, Gilaad G., y Joseph W. Windsor. 2021. «The Four Epidemiological Stages in the Global Evolution of Inflammatory Bowel Disease». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 18(1):56-66. doi: 10.1038/s41575-020-00360-x.
- Kelm, Matthias, Sylvain Lehoux, Veronica Azcutia, Richard D. Cummings, Asma Nusrat, Charles A. Parkos, y Jennifer C. Brazil. 2020. «Regulation of neutrophil function by selective targeting of glycan epitopes expressed on the integrin CD11b/CD18». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34(2):2326-43. doi: 10.1096/fj.201902542R.
- Khaloian, Sevana, Eva Rath, Nassim Hammoudi, Elisabeth Gleisinger, Andreas Blutke, Pieter Giesbertz, Emanuel Berger, Amira Metwaly, Nadine Waldschmitt, Matthieu Allez, y Dirk Haller. 2020. «Mitochondrial Impairment Drives Intestinal Stem Cell Transition into Dysfunctional Paneth Cells Predicting Crohn's Disease Recurrence». doi: 10.1136/gutjnl-2019-319514.
- Kim, David E., Dylan Chivian, y David Baker. 2004. «Protein structure prediction and analysis using the Robetta server». *Nucleic Acids Research* 32(Web Server issue):W526. doi: 10.1093/nar/gkh468.
- Kim, Seung Won, Ki Cheong Park, Soung Min Jeon, Tak Bum Ohn, Tae Il Kim, Won Ho Kim, y Jae Hee Cheon. 2013. «Abrogation of Galectin-4 Expression Promotes Tumorigenesis in Colorectal Cancer». *Cellular Oncology (Dordrecht)* 36(2):169-78. doi: 10.1007/s13402-013-0124-x.
- Kleiveland, Charlotte R. 2015. «Peripheral Blood Mononuclear Cells». en *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, editado por K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, y H. Wichers. Cham (CH): Springer.
- Knauss, Annkathrin, Michael Gabel, Markus F. Neurath, y Benno Weigmann. 2022. «The Memory T Cell “Communication Web” in Context with Gastrointestinal Disorders — How Memory T Cells Affect Their Surroundings and How They Are Influenced by It». *Cells* 11(18):2780. doi: 10.3390/cells11182780.

- Kudelka, Matthew R., Sean R. Stowell, Richard D. Cummings, y Andrew S. Neish. 2020. «Intestinal Epithelial Glycosylation in Homeostasis and Gut Microbiota Interactions in IBD». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 17(10):597-617. doi: 10.1038/s41575-020-0331-7.
- Lamb, Christopher A., John C. Mansfield, Gaik W. Tew, Deena Gibbons, Anna K. Long, Peter Irving, Lauri Diehl, Jeff Eastham-Anderson, Maria B. Price, Graeme O'Boyle, David E. J. Jones, Sharon O'Byrne, Adrian Hayday, Mary E. Keir, Jackson G. Egen, y John A. Kirby. 2017. « $\alpha\text{E}\beta 7$ Integrin Identifies Subsets of Pro-Inflammatory Colonic CD4⁺ T Lymphocytes in Ulcerative Colitis». *Journal of Crohn's & Colitis* 11(5):610-20. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw189.
- Lamb, Christopher A., Sharon O'Byrne, Mary E. Keir, y Eugene C. Butcher. 2018. «Gut-Selective Integrin-Targeted Therapies for Inflammatory Bowel Disease». *Journal of Crohn's & Colitis* 12(suppl_2):S653-68. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjy060.
- Larsson, Jessica M. Holmn, Hasse Karlsson, Jessica Gråberg Crespo, Malin E. V. Johansson, Lisbeth Eklund, Henrik Sjövall, y Gunnar C. Hansson. 2011. «Altered O-Glycosylation Profile of MUC2 Mucin Occurs in Active Ulcerative Colitis and Is Associated with Increased Inflammation». *Inflammatory Bowel Diseases* 17(11):2299-2307. doi: 10.1002/ibd.21625.
- Lee, In-Gu, Yong-Hyun Joo, Hoyeon Jeon, Raehyuk Jeong, Eui Ho Kim, Hyunwoo Chung, Seong-il Eyun, Jeongkyu Kim, Young-Jin Seo, y So-Hee Hong. 2023. «Galectin-4 increases the ability of M2 macrophages to enhance antiviral CD4⁺ T-cell responses». *Journal of Leukocyte Biology* 113(1):71-83. doi: 10.1093/jleuko/qiac008.
- Lee, Jee-Yon, Stephanie A. Cevallos, Mariana X. Byndloss, Connor R. Tiffany, Erin E. Olsan, Brian P. Butler, Briana M. Young, Andrew W. L. Rogers, Henry Nguyen, Kyongchol Kim, Sang-Woon Choi, Eunsoo Bae, Je Hee Lee, Ui-Gi Min, Duk-Chul Lee, y Andreas J. Bäuml. 2020. «High-Fat Diet and Antibiotics Cooperatively Impair Mitochondrial Bioenergetics to Trigger Dysbiosis That Exacerbates Pre-Inflammatory Bowel Disease». *Cell Host & Microbe* 28(2):273-284.e6. doi: 10.1016/j.chom.2020.06.001.
- Leffler, Hakon. 2023. «Structure and Biochemical Analysis of Galectin Interactions with Glycoproteins». *Glycoforum* 26:A17.
- Lerner, Aaron, y Torsten Matthias. 2015. «Changes in Intestinal Tight Junction Permeability Associated with Industrial Food Additives Explain the Rising Incidence of Autoimmune Disease». *Autoimmunity Reviews* 14(6):479-89. doi: 10.1016/j.autrev.2015.01.009.
- Levin, Alon D., Manon E. Wildenberg, y Gijs R. van den Brink. 2016. «Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease». *Journal of Crohn's & Colitis* 10(8):989-97. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw053.
- Li, Chi-Shan, Tzu-Han Lo, Ting-Jui Tu, Di-Yen Chueh, Cheng-I. Yao, Chun-Hung Lin, Peilin Chen, y Fu-Tong Liu. 2023. «Cytosolic galectin-4 enchains bacteria, restricts their motility, and promotes inflammasome activation in intestinal epithelial cells».

- Proceedings of the National Academy of Sciences* 120(5):e2207091120. doi: 10.1073/pnas.2207091120.
- Liu, Fu-Tong, y Charles L. Bevins. 2010. «A Sweet Target for Innate Immunity». *Nature Medicine* 16(3):263-64. doi: 10.1038/nm0310-263.
- Liu, Fu-Tong, y Gabriel A. Rabinovich. 2005. «Galectins as Modulators of Tumour Progression». *Nature Reviews. Cancer* 5(1):29-41. doi: 10.1038/nrc1527.
- Liu, Fu-Tong, y Sean R. Stowell. 2023. «The Role of Galectins in Immunity and Infection». *Nature Reviews. Immunology* 23(8):479-94. doi: 10.1038/s41577-022-00829-7.
- Lozano-Ojalvo, Daniel, Rosina López-Fandiño, y Iván López-Expósito. 2015. «PBMC-Derived T Cells BT - The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models». Pp. 169-80 en, editado por K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, y H. Wichers. Cham: Springer International Publishing.
- Luis, Ana S., Arnaud Baslé, Dominic P. Byrne, Gareth SA Wright, James London, Jin Chunsheng, Niclas G. Karlsson, Gunnar C. Hansson, Patrick A. Eyers, Mirjam Czjzek, Tristan Barbeyron, Edwin A. Yates, Eric C. Martens, y Alan Cartmell. 2022. «Sulfated glycan recognition by carbohydrate sulfatases of the human gut microbiota». *Nature chemical biology* 18(8):841-49. doi: 10.1038/s41589-022-01039-x.
- Mabbott, N. A., D. S. Donaldson, H. Ohno, I. R. Williams, y A. Mahajan. 2013. «Microfold (M) Cells: Important Immunosurveillance Posts in the Intestinal Epithelium». *Mucosal Immunology* 6(4):666-77. doi: 10.1038/mi.2013.30.
- Maller, Sebastián M., Alejandro J. Cagnoni, Nadia Bannoud, Lorena Sigaut, Juan M. Pérez Sáez, Lía I. Pietrasanta, Ri-Yao Yang, Fu-Tong Liu, Diego O. Croci, Santiago Di Lella, Victoria Sundblad, Gabriel A. Rabinovich, y Karina V. Mariño. 2020. «An Adipose Tissue Galectin Controls Endothelial Cell Function via Preferential Recognition of 3-Fucosylated Glycans». *The FASEB Journal* 34(1):735-53. doi: 10.1096/fj.201901817R.
- Mann, Elizabeth A., y Shehzad A. Saeed. 2012. «Gastrointestinal Infection as a Trigger for Inflammatory Bowel Disease». *Current Opinion in Gastroenterology* 28(1):24-29. doi: 10.1097/MOG.0b013e32834c453e.
- Mariño, Karina V., Alejandro J. Cagnoni, Diego O. Croci, y Gabriel A. Rabinovich. 2023. «Targeting Galectin-Driven Regulatory Circuits in Cancer and Fibrosis». *Nature Reviews Drug Discovery* 22(4):295-316. doi: 10.1038/s41573-023-00636-2.
- Martini, Eva, Susanne M. Krug, Britta Siegmund, Markus F. Neurath, y Christoph Becker. 2017. «Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease». *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 4(1):33-46. doi: 10.1016/j.jcmgh.2017.03.007.
- Merenda, Alessandra, Nicola Fenderico, y Madelon M. Maurice. 2020. «Wnt Signaling in 3D: Recent Advances in the Applications of Intestinal Organoids». *Trends in Cell Biology* 30(1):60-73. doi: 10.1016/j.tcb.2019.10.003.

- Mirdita, Milot, Konstantin Schütze, Yoshitaka Moriwaki, Lim Heo, Sergey Ovchinnikov, y Martin Steinegger. 2022. «ColabFold: Making Protein Folding Accessible to All». *Nature Methods* 19(6):679-82. doi: 10.1038/s41592-022-01488-1.
- Mitrev, N., N. Vande Casteele, y C. H. Seow. 2017. «IBD Sydney Organisation and the Australian Inflammatory Bowel Diseases Consensus Working Group. Review article: consensus statements on therapeutic drug monitoring of anti-tumour necrosis factor therapy in inflammatory bowel diseases». *Aliment Pharmacol Ther* 46:1037-53.
- Modenutti, Carlos P., Juan I. Blanco Capurro, Santiago Di Lella, y Marcelo A. Martí. 2019. «The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design». *Front Chem* 7. doi: 10.3389/fchem.2019.00823.
- Morelle, Willy, Laurence Stechly, Sabine André, Isabelle Van Seuningen, Nicole Porchet, Hans-Joachim Gabius, Jean-Claude Michalski, y Guillemette Huet. 2009. «Glycosylation Pattern of Brush Border-Associated Glycoproteins in Enterocyte-like Cells: Involvement of Complex-Type N-Glycans in Apical Trafficking». 390(7):529-44. doi: 10.1515/BC.2009.075.
- Morgan, Mary E., Bin Zheng, Pim J. Koelink, Hendrick J. G. van de Kant, Lizette C. J. M. Haazen, Manon van Roest, Johan Garssen, Gert Folkerts, y Aletta D. Kraneveld. 2013. «New Perspective on Dextran Sodium Sulfate Colitis: Antigen-Specific T Cell Development during Intestinal Inflammation». *PloS One* 8(7):e69936. doi: 10.1371/journal.pone.0069936.
- Morosi, Luciano G., Anabela M. Cutine, Alejandro J. Cagnoni, Montana N. Manselle-Cocco, Diego O. Croci, Joaquín P. Merlo, Rosa M. Morales, María May, Juan M. Pérez-Sáez, María R. Girotti, Santiago P. Méndez-Huergo, Betiana Pucci, Aníbal H. Gil, Sergio P. Huernos, Guillermo H. Docena, Alicia M. Sambuelli, Marta A. Toscano, Gabriel A. Rabinovich, y Karina V. Mariño. 2021. «Control of intestinal inflammation by glycosylation-dependent lectin-driven immunoregulatory circuits». *Science Advances* 7(25):eabf8630. doi: 10.1126/sciadv.abf8630.
- Muglia, C., N. Mercer, M. A. Toscano, M. Schattner, R. Pozner, J. P. Cerliani, R. Papa Gobbi, G. A. Rabinovich, y G. H. Docena. 2011. «The Glycan-Binding Protein Galectin-1 Controls Survival of Epithelial Cells along the Crypt-Villus Axis of Small Intestine». *Cell Death & Disease* 2(5):e163. doi: 10.1038/cddis.2011.44.
- Muglia, Cecilia I., Rodrigo Papa Gobbi, Paola Smaldini, María Lucía Orsini Delgado, Martín Candia, Carolina Zanuzzi, Alicia Sambuelli, Andrés Rocca, Marta A. Toscano, Gabriel A. Rabinovich, y Guillermo H. Docena. 2016. «Inflammation Controls Sensitivity of Human and Mouse Intestinal Epithelial Cells to Galectin-1». *Journal of Cellular Physiology* 231(7):1575-85. doi: 10.1002/jcp.25249.
- Na, Yi Rang, Michelle Stakenborg, Seung Hyeok Seok, y Gianluca Matteoli. 2019. «Macrophages in Intestinal Inflammation and Resolution: A Potential Therapeutic Target in IBD». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 16(9):531-43. doi: 10.1038/s41575-019-0172-4.

- Navarro, Pilar, Neus Martínez-Bosch, Ada G. Blidner, y Gabriel A. Rabinovich. 2020. «Impact of Galectins in Resistance to Anticancer Therapies». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 26(23):6086-6101. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3870.
- Neelamegham, Sriram, Kiyoko Aoki-Kinoshita, Evan Bolton, Martin Frank, Frederique Lisacek, Thomas Lütteke, Noel O'Boyle, Nicolle H. Packer, Pamela Stanley, Philip Toukach, Ajit Varki, Robert J. Woods, y SNFG Discussion Group. 2019. «Updates to the Symbol Nomenclature for Glycans Guidelines». *Glycobiology* 29(9):620-24. doi: 10.1093/glycob/cwz045.
- Nemoto, Yasuhiro, Takanori Kanai, Kaori Kameyama, Tamako Shinohara, Naoya Sakamoto, Teruji Totsuka, Ryuichi Okamoto, Kiichiro Tsuchiya, Tetsuya Nakamura, Tetsuo Sudo, Satoshi Matsumoto, y Mamoru Watanabe. 2009. «Long-Lived Colitogenic CD4+ Memory T Cells Residing Outside the Intestine Participate in the Perpetuation of Chronic Colitis¹». *The Journal of Immunology* 183(8):5059- 68. doi: 10.4049/jimmunol.0803684.
- Neurath, Markus F. 2014. «Cytokines in Inflammatory Bowel Disease». *Nature Reviews Immunology* 14(5):329-42. doi: 10.1038/nri3661.
- Neurath, Markus F. 2019. «Targeting Immune Cell Circuits and Trafficking in Inflammatory Bowel Disease». *Nature Immunology* 20(8):970-79. doi: 10.1038/s41590-019-0415-0.
- Ng, Siew C., Hai Yun Shi, Nima Hamidi, Fox E. Underwood, Whitney Tang, Eric I. Benchimol, Remo Panaccione, Subrata Ghosh, Justin C. Y. Wu, Francis K. L. Chan, Joseph J. Y. Sung, y Gilaad G. Kaplan. 2017. «Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies». *The Lancet* 390(10114):2769-78. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32448-0.
- Nishi, Nozomu. 2020. «A note on expression and purification of recombinant galectins». *Glycoforum* 23(5).
- Nishida, Atsushi, Kiyotaka Nagahama, Hirotsugu Imaeda, Atsuhiko Ogawa, Cindy W. Lau, Taku Kobayashi, Tadakazu Hisamatsu, Frederic I. Preffer, Emiko Mizoguchi, Hiroki Ikeuchi, Toshifumi Hibi, Minoru Fukuda, Akira Andoh, Richard S. Blumberg, y Atsushi Mizoguchi. 2012. «Inducible Colitis-Associated Glycome Capable of Stimulating the Proliferation of Memory CD4+ T Cells». *The Journal of Experimental Medicine* 209(13):2383-94. doi: 10.1084/jem.20112631.
- Noble, Alistair, Lydia Durant, Lesley Hoyles, Anne L. McCartney, Ripple Man, Jonathan Segal, Samuel P. Costello, Philip Hendy, Durga Reddi, Sonia Bouri, Dennis N. F. Lim, Toby Pring, Matthew J. O'Connor, Pooja Datt, Ana Wilson, Naila Arebi, Ayesha Akbar, Ailsa L. Hart, Simon R. Carding, y Stella C. Knight. 2020. «Deficient Resident Memory T Cell and CD8 T Cell Response to Commensals in Inflammatory Bowel Disease». *Journal of Crohn's & Colitis* 14(4):525-37. doi: 10.1093/ecco-jcc/ijz175.
- Pace, Simona, Katharina Paula Lydia Meyer, Fabiana Troisi, Rossella Bilancia, Danilo D'Avino, Olga Parisi, Roberta Rizza, Paola Stiuso, Jana Gerstmeier, Patrick

- Schädel, Armando Ialenti, Lidia Sautebin, Charles N. Serhan, Antonietta Rossi, Francesca Borrelli, y Oliver Werz. 2024. «Sex Hormone Deprivation Abolishes Sex-Specific Differences in Murine Colon Inflammation and Related Lipid Mediator Production». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 38(14):e23828. doi: 10.1096/fj.202400320R.
- Pacheco, Alline R., Meredith M. Curtis, Jennifer M. Ritchie, Diana Munera, Matthew K. Waldor, Cristiano G. Moreira, y Vanessa Sperandio. 2012. «Fucose Sensing Regulates Bacterial Intestinal Colonization». *Nature* 492(7427):113-17. doi: 10.1038/nature11623.
- Paclik, Daniela, Uta Berndt, Claudia Guzy, Anja Dankof, Silvio Danese, Pamela Holzloehner, Stefan Rosewicz, Bertram Wiedenmann, Bianca M. Wittig, Axel U. Dignass, y Andreas Sturm. 2008. «Galectin-2 Induces Apoptosis of Lamina Propria T Lymphocytes and Ameliorates Acute and Chronic Experimental Colitis in Mice». *Journal of Molecular Medicine* 86(12):1395-1406. doi: 10.1007/s00109-007-0290-2.
- Paclik, Daniela, Silvio Danese, Uta Berndt, Bertram Wiedenmann, Axel Dignass, y Andreas Sturm. 2008. «Galectin-4 Controls Intestinal Inflammation by Selective Regulation of Peripheral and Mucosal T Cell Apoptosis and Cell Cycle». *PLoS ONE* 3(7):e2629. doi: 10.1371/journal.pone.0002629.
- Paclik, Daniela, Katrin Lohse, Bertram Wiedenmann, Axel U. Dignass, y Andreas Sturm. 2008. «Galectin-2 and -4, but not Galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism». *Inflammatory Bowel Diseases* 14(10):1366-72. doi: 10.1002/ibd.20499.
- Paclik, Daniela, Lael Werner, Olaf Guckelberger, Bertram Wiedenmann, y Andreas Sturm. 2011. «Galectins distinctively regulate central monocyte and macrophage function». *Cellular Immunology* 271(1):97-103. doi: 10.1016/j.cellimm.2011.06.003.
- Papa Gobbi, Rodrigo, Nicolás De Francesco, Constanza Bondar, Cecilia Muglia, Fernando Chirido, Martín Rumbo, Andrés Rocca, Marta A. Toscano, Alicia Sambuelli, Gabriel A. Rabinovich, y Guillermo H. Docena. 2016. «A galectin-specific signature in the gut delineates Crohn's disease and ulcerative colitis from other human inflammatory intestinal disorders». *BioFactors* 42(1):93-105. doi: <https://doi.org/10.1002/biof.1252>.
- Papa-Gobbi, Rodrigo, Cecilia I. Muglia, Andrés Rocca, Renata Curciarello, Alicia M. Sambuelli, Martín Yantorno, Gustavo Correa, Luciano G. Morosi, Antonio Di Sabatino, Paolo Biancheri, Thomas T. MacDonald, Marta A. Toscano, Karina V. Mariño, Gabriel A. Rabinovich, y Guillermo H. Docena. 2021. «Spatiotemporal Regulation of Galectin-1-Induced T-Cell Death in Lamina Propria from Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Patients». *Apoptosis* 26(5):323-37. doi: 10.1007/s10495-021-01675-z.
- Paramsothy, Sudarshan, Adam K. Rosenstein, Saurabh Mehandru, y Jean-Frederic Colombel. 2018. «The Current State of the Art for Biological Therapies and New Small Molecules in Inflammatory Bowel Disease». *Mucosal Immunology* 11(6):1558. doi: 10.1038/s41385-018-0050-3.

- Parigi, Sara M., Ludvig Larsson, Srustidhar Das, Ricardo O. Ramirez Flores, Annika Frede, Kumar P. Tripathi, Oscar E. Diaz, Katja Selin, Rodrigo A. Morales, Xinxin Luo, Gustavo Monasterio, Camilla Engblom, Nicola Gagliani, Julio Saez-Rodriguez, Joakim Lundeberg, y Eduardo J. Villablanca. 2022. «The Spatial Transcriptomic Landscape of the Healing Mouse Intestine Following Damage». *Nature Communications* 13(1):828. doi: 10.1038/s41467-022-28497-0.
- Pullan, R. D., G. A. Thomas, M. Rhodes, R. G. Newcombe, G. T. Williams, A. Allen, y J. Rhodes. 1994. «Thickness of Adherent Mucus Gel on Colonic Mucosa in Humans and Its Relevance to Colitis.» *Gut* 35(3):353-59. doi: 10.1136/gut.35.3.353.
- Quintana, Sandra Delgado, Miriam Rábano, Mikel Azkargorta, Mirane Florencio-Zabaleta, Luca Unione, Maria dM Vivanco, Félix Elortza, Jesús Jiménez-Barbero, y Ana Ardá. 2024. «The impact of glycosylation on the structure, function, and interactions of CD14». *Glycobiology* 34(3):cwae002. doi: 10.1093/glycob/cwae002.
- Quintana, J. I., Mora Massaro, Alejandro J. Cagnoni, Reyes Núñez-Franco, Sandra Delgado, Gonzalo Jiménez-Osés, Karina V. Mariño, Gabriel A. Rabinovich, Jesús Jiménez-Barbero, y Ana Ardá. 2024. «Different Roles of the Heterodimer Architecture of Galectin-4 in Selective Recognition of Oligosaccharides and Lipopolysaccharides Having ABH Antigens». *Journal of Biological Chemistry* 300(8). doi: 10.1016/j.jbc.2024.107577.
- Quintana, Jon I., Sandra Delgado, Reyes Núñez-Franco, F. Javier Cañada, Gonzalo Jiménez-Osés, Jesús Jiménez-Barbero, y Ana Ardá. 2021. «Galectin-4 N-Terminal Domain: Binding Preferences Toward A and B Antigens With Different Peripheral Core Presentations». *Frontiers in Chemistry* 9:664097. doi: 10.3389/fchem.2021.664097.
- Rabinovich, Gabriel A., Marta A. Toscano, Shawn S. Jackson, y Gerardo R. Vasta. 2007. «Functions of Cell Surface Galectin-Glycoprotein Lattices». *Current Opinion in Structural Biology* 17(5):513-20. doi: 10.1016/j.sbi.2007.09.002.
- Rabinovich, Gabriel Adrián. 2023. «The Multifaceted Roles of Galectins: Glycan-Binding Proteins with Multiple Personalities». *Glycoforum* 26:A12.
- Raphael, Itay, Rachel R. Joern, y Thomas G. Forsthuber. 2020. «Memory CD4+ T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases». *Cells* 9(3):531. doi: 10.3390/cells9030531.
- Rapoport, E. M., T. V. Pochechueva, O. V. Kurmyshkina, G. V. Pazynina, V. V. Severov, E. A. Gordeeva, I. M. Belyanchikov, S. André, H. J. Gabius, y N. V. Bovin. 2010. «Solid-Phase Assays for Study of Carbohydrate Specificity of Galectins». *Biochemistry Mosc.* 75(3):310-19. doi: 10.1134/s0006297910030077.
- Rath, Eva, y Dirk Haller. 2022. «Intestinal epithelial cell metabolism at the interface of microbial dysbiosis and tissue injury». *Mucosal Immunology* 15(4):595-604. doi: 10.1038/s41385-022-00514-x.

- Reily, Colin, Tyler J. Stewart, Matthew B. Renfrow, y Jan Novak. 2019. «Glycosylation in Health and Disease». *Nature Reviews. Nephrology* 15(6):346-66. doi: 10.1038/s41581-019-0129-4.
- Rini, James M., Kelley W. Moremen, Benjamin G. Davis, y Jeffrey D. Esko. 2022. «Glycosyltransferases and Glycan-Processing Enzymes». en *Essentials of Glycobiology*, editado por A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, y P. H. Seeberger. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Romero, Juan M., Madia Trujillo, Darío A. Estrin, Gabriel A. Rabinovich, y Santiago Di Lella. 2016. «Impact of human galectin-1 binding to saccharide ligands on dimer dissociation kinetics and structure». *Glycobiology* 26(12):1317-27. doi: 10.1093/glycob/cww052.
- Roosenboom, Britt, Peter J. Wahab, Carolijn Smids, Marcel J. M. Groenen, Elly van Koolwijk, Ellen G. van Lochem, y Carmen S. Horjus Talabur Horje. 2019. «Intestinal CD103+CD4+ and CD103+CD8+ T-Cell Subsets in the Gut of Inflammatory Bowel Disease Patients at Diagnosis and During Follow-Up». *Inflammatory Bowel Diseases* 25(9):1497-1509. doi: 10.1093/ibd/izz049.
- Rustiguel, Joane K., Patricia S. Kumagai, Marcelo Dias-Baruffi, Antonio J. Costa-Filho, y Maria Cristina Nonato. 2016. «Recombinant Expression, Purification and Preliminary Biophysical and Structural Studies of C-Terminal Carbohydrate Recognition Domain from Human Galectin-4». *Protein Expr. Purif.* 118:39-48. doi: 10.1016/j.pep.2015.09.026.
- Sahlberg, Sara Häggblad, Diana Spiegelberg, Bengt Glimelius, Bo Stenerlöv, y Marika Nestor. 2014. «Evaluation of Cancer Stem Cell Markers CD133, CD44, CD24: Association with AKT Isoforms and Radiation Resistance in Colon Cancer Cells». *PLOS ONE* 9(4):e94621. doi: 10.1371/journal.pone.0094621.
- Santucci, Luca, Stefano Fiorucci, Natalia Rubinstein, Andrea Mencarelli, Barbara Palazzetti, Barbara Federici, Gabriel A. Rabinovich, y Antonio Morelli. 2003. «Galectin-1 Suppresses Experimental Colitis in Mice». *Gastroenterology* 124(5):1381-94. doi: 10.1016/S0016-5085(03)00267-1.
- Sasson, Sarah C., Stephanie M. Slevin, Vincent T. F. Cheung, Isar Nassiri, Anna Olsson-Brown, Eve Fryer, Ricardo C. Ferreira, Dominik Trzuppek, Tarun Gupta, Lulia Al-Hillawi, Mari-Lenna Issaias, Alistair Easton, Leticia Campo, Michael E. B. FitzPatrick, Joss Adams, Meenali Chitnis, Andrew Protheroe, Mark Tuthill, Nicholas Coupe, Alison Simmons, Miranda Payne, Mark R. Middleton, Simon P. L. Travis, Oxford Inflammatory Bowel Disease Cohort Investigators, Benjamin P. Fairfax, Paul Klenerman, y Oliver Brain. 2021. «Interferon-Gamma-Producing CD8+ Tissue Resident Memory T Cells Are a Targetable Hallmark of Immune Checkpoint Inhibitor-Colitis». *Gastroenterology* 161(4):1229-1244.e9. doi: 10.1053/j.gastro.2021.06.025.
- Satelli, Arun, Prema S. Rao, Seshadri Thirumala, y U. Subrahmanyeswara Rao. 2011. «Galectin-4 Functions as a Tumor Suppressor of Human Colorectal Cancer». *International Journal of Cancer* 129(4):799-809. doi: 10.1002/ijc.25750.

- Sato, Toshiro, Johan H. van Es, Hugo J. Snippert, Daniel E. Stange, Robert G. Vries, Maaike van den Born, Nick Barker, Noah F. Shroyer, Marc van de Wetering, y Hans Clevers. 2011. «Paneth Cells Constitute the Niche for Lgr5 Stem Cells in Intestinal Crypts». *Nature* 469(7330):415-18. doi: 10.1038/nature09637.
- Sazonovs, Aleksejs, Christine R. Stevens, Guhan R. Venkataraman, Kai Yuan, Brandon Avila, Maria T. Abreu, Tariq Ahmad, Matthieu Allez, Ashwin N. Ananthakrishnan, Gil Atzmon, Aris Baras, Jeffrey C. Barrett, Nir Barzilai, Laurent Beaugerie, Ashley Beecham, Charles N. Bernstein, Alain Bitton, Bernd Bokemeyer, Andrew Chan, Daniel Chung, Isabelle Cleynen, Jacques Cosnes, David J. Cutler, Allan Daly, Oriana M. Damas, Lisa W. Datta, Noor Dawany, Marcella Devoto, Sheila Dodge, Eva Ellinghaus, Laura Fachal, Martti Farkkila, William Faubion, Manuel Ferreira, Denis Franchimont, Stacey B. Gabriel, Tian Ge, Michel Georges, Kyle Gettler, Mamta Giri, Benjamin Glaser, Siegfried Goerg, Philippe Goyette, Daniel Graham, Eija Hämäläinen, Talin Haritunians, Graham A. Heap, Mikko Hiltunen, Marc Hoepfner, Julie E. Horowitz, Peter Irving, Vivek Iyer, Chaim Jalas, Judith Kelsen, Hamed Khalili, Barbara S. Kirschner, Kimmo Kontula, Jukka T. Koskela, Subra Kugathasan, Juozas Kupcinskis, Christopher A. Lamb, Matthias Laudes, Chloé Lévesque, Adam P. Levine, James D. Lewis, Claire Liewerincx, Britt-Sabina Loescher, Edouard Louis, John Mansfield, Sandra May, Jacob L. McCauley, Emebet Mengesha, Myriam Mni, Paul Moayyedi, Christopher J. Moran, Rodney D. Newberry, Sirimon O'Charoen, David T. Okou, Bas Oldenburg, Harry Ostrer, Aarno Palotie, Jean Paquette, Joel Pekow, Inga Peter, Marieke J. Pierik, Cyriel Y. Ponsioen, Nikolas Pontikos, Natalie Prescott, Ann E. Pulver, Souad Rahmouni, Daniel L. Rice, Päivi Saavalainen, Bruce Sands, R. Balfour Sartor, Elena R. Schiff, Stefan Schreiber, L. Philip Schumm, Anthony W. Segal, Philippe Seksik, Rasha Shawky, Shehzad Z. Sheikh, Mark S. Silverberg, Alison Simmons, Jurgita Skeiceviciene, Harry Sokol, Matthew Solomonson, Hari Somineni, Dylan Sun, Stephan Targan, Dan Turner, Holm H. Uhlig, Andrea E. van der Meulen, Séverine Vermeire, Sare Verstockett, Michiel D. Voskuil, Harland S. Winter, Justine Young, Richard H. Duerr, Andre Franke, Steven R. Brant, Judy Cho, Rinse K. Weersma, Miles Parkes, Ramnik J. Xavier, Manuel A. Rivas, John D. Rioux, Dermot P. B. McGovern, Hailiang Huang, Carl A. Anderson, y Mark J. Daly. 2022. «Large-Scale Sequencing Identifies Multiple Genes and Rare Variants Associated with Crohn's Disease Susceptibility». *Nature Genetics* 54(9):1275-83. doi: 10.1038/s41588-022-01156-2.
- Schenkel, Jason M., y David Masopust. 2014. «Tissue-Resident Memory T Cells». *Immunity* 41(6):886-97. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.007.
- Schneider, Christoph, Claire E. O'Leary, y Richard M. Locksley. 2019. «Regulation of Immune Responses by Tuft Cells». *Nature Reviews Immunology* 19(9):584-93. doi: 10.1038/s41577-019-0176-x.
- Seeliger, Daniel, y Bert L. de Groot. 2010. «Ligand Docking and Binding Site Analysis with PyMOL and Autodock/Vina». *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 24(5):417-22. doi: 10.1007/s10822-010-9352-6.
- Shah, Shailja C., y Steven H. Itzkowitz. 2022. «Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Management». *Gastroenterology* 162(3):715-730.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2021.10.035.

- Shan, Yue, Mirae Lee, y Eugene B. Chang. 2022. «The Gut Microbiome and Inflammatory Bowel Diseases». *Annual review of medicine* 73:455-68. doi: 10.1146/annurev-med-042320-021020.
- Shirato, Haruko, Satoko Ogawa, Hiromi Ito, Takashi Sato, Akihiko Kameyama, Hisashi Narimatsu, Zheng Xiaofan, Tatsuo Miyamura, Takaji Wakita, Koji Ishii, y Naokazu Takeda. 2008. «Noroviruses Distinguish between Type 1 and Type 2 Histo-Blood Group Antigens for Binding». *Journal of Virology* 82(21):10756-67. doi: 10.1128/JVI.00802-08.
- Simovic Markovic, Bojana, Aleksandar Nikolic, Marina Gazdic, Sanja Bojic, Ljubica Vucicevic, Milica Kosic, Slobodanka Mitrovic, Milos Milosavljevic, Gurdyal Besra, Vladimir Trajkovic, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic, y Vladislav Volarevic. 2016. «Galectin-3 Plays an Important Pro-inflammatory Role in the Induction Phase of Acute Colitis by Promoting Activation of NLRP3 Inflammasome and Production of IL-1 β in Macrophages». *Journal of Crohn's and Colitis* 10(5):593-606. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw013.
- Šimurina, Mirna, Noortje de Haan, Frano Vučković, Nicholas A. Kennedy, Jerko Štambuk, David Falck, Irena Trbojević-Akmačić, Florent Clerc, Genadij Razdorov, Anna Khon, Anna Latiano, Renata D'Inca, Silvio Danese, Stephan Targan, Carol Landers, Marla Dubinsky, Dermot P. B. McGovern, Vito Annese, Manfred Wuhler, y Gordan Lauc. 2018. «Glycosylation of Immunoglobulin G Associates With Clinical Features of Inflammatory Bowel Diseases». *Gastroenterology* 154(5):1320- 1333.e10. doi: 10.1053/j.gastro.2018.01.002.
- Singh, Siddharth. 2023. «Positioning Therapies for the Management of Inflammatory Bowel Disease». *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 20(7):411-12. doi: 10.1038/s41575-023-00744-9.
- Smids, Carolijn, Carmen S. Horjus Talabur Horje, Julia Drylewicz, Britt Roosenboom, Marcel J. M. Groenen, Elly van Koolwijk, Ellen G. van Lochem, y Peter J. Wahab. 2018. «Intestinal T Cell Profiling in Inflammatory Bowel Disease: Linking T Cell Subsets to Disease Activity and Disease Course». *Journal of Crohn's & Colitis* 12(4):465-75. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjx160.
- Smith, Benjamin A. H., y Carolyn R. Bertozzi. 2021. «The Clinical Impact of Glycobiology: Targeting Selectins, Siglecs and Mammalian Glycans». *Nature Reviews Drug Discovery* 20(3):217-43. doi: 10.1038/s41573-020-00093-1.
- de Souza, Heitor S. P., y Claudio Fiocchi. 2016. «Immunopathogenesis of IBD: Current State of the Art». *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 13(1):13-27. doi: 10.1038/nrgastro.2015.186.
- Stanley, Pamela. 2024. «Genetics of Glycosylation in Mammalian Development and Disease». *Nature Reviews Genetics* 25(10):715-29. doi: 10.1038/s41576-024-00725-x.
- Stechly, Laurence, Willy Morelle, Anne-Frédérique Dessein, Sabine André, Georges Grard, Dave Trinel, Marie-José Dejonghe, Emmanuelle Leteurtre, Hervé Drobecq, Germain Trugnan, Hans Joachim Gabius, y Guillemette Huet. 2009. «Galectin-4-Regulated Delivery of Glycoproteins to the Brush Border Membrane of Enterocyte-

- like Cells». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 10(4):438-50. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00882.x.
- Stowell, Sean R., Connie M. Arthur, Marcelo Dias-Baruffi, Lilian C. Rodrigues, Jean-Philippe Gourdiere, Jamie Heimbürg-Molinaro, Tongzhong Ju, Ross J. Molinaro, Carlos Rivera-Marrero, Baoyun Xia, David F. Smith, y Richard D. Cummings. 2010. «Innate Immune Lectins Kill Bacteria Expressing Blood Group Antigen». *Nat. Med.* 16(3):295-301. doi: 10.1038/nm.2103.
- Stowell, Sean R., Connie M. Arthur, Ryan McBride, Oren Berger, Nahid Razi, Jamie Heimbürg-Molinaro, Lilian C. Rodrigues, Jean-Philippe Gourdiere, Alexander J. Noll, Stephan von Gunten, David F. Smith, Yuriy A. Knirel, James C. Paulson, y Richard D. Cummings. 2014. «Microbial Glycan Microarrays Define Key Features of Host-Microbial Interactions». *Nature Chemical Biology* 10(6):470-76. doi: 10.1038/nchembio.1525.
- Stowell, Sean R., Connie M. Arthur, Kristin A. Slanina, John R. Horton, David F. Smith, y Richard D. Cummings. 2008. «Dimeric Galectin-8 Induces Phosphatidylserine Exposure in Leukocytes through Polylactosamine Recognition by the C-Terminal Domain». *J. Biol. Chem.* 283(29):20547-59. doi: 10.1074/jbc.M802495200.
- Sudhakar, Janaki N., Hsueh-Han Lu, Hung-Yu Chiang, Ching-Shu Suen, Ming-Jing Hwang, Sung-Yu Wu, Chia-Ning Shen, Yao-Ming Chang, Fu-An Li, Fu-Tong Liu, y Jr-Wen Shui. 2020. «Luminal Galectin-9-Lamp2 Interaction Regulates Lysosome and Autophagy to Prevent Pathogenesis in the Intestine and Pancreas». *Nature Communications* 11(1):4286. doi: 10.1038/s41467-020-18102-7.
- Sundblad, Victoria, Luciano G. Morosi, Jorge R. Geffner, y Gabriel A. Rabinovich. 2017. «Galectin-1: A Jack-of-All-Trades in the Resolution of Acute and Chronic Inflammation». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 199(11):3721-30. doi: 10.4049/jimmunol.1701172.
- Syed, Sana, Brigid S. Boland, Lauren T. Bourke, Lea Ann Chen, Laurie Churchill, Angela Dobes, Adam Greene, Caren Heller, Christina Jayson, Benjamin Kostiuk, Alan Moss, Fedaa Najdawi, Lori Plung, John D. Rioux, Michael J. Rosen, Joana Torres, Fatima Zulqarnain, y Jack Satsangi. 2024. «Challenges in IBD Research 2024: Precision Medicine». *Inflammatory Bowel Diseases* 30(Supplement_2):S39-54. doi: 10.1093/ibd/izae084.
- Tanaka, Masanori, Hiroshi Saito, Tomomi Kusumi, Shinsaku Fukuda, Tadashi Shimoyama, Yoshihiro Sasaki, Koji Suto, Akihiro Munakata, y Hajime Kudo. 2001. «Spatial Distribution and Histogenesis of Colorectal Paneth Cell Metaplasia in Idiopathic Inflammatory Bowel Disease». *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 16(12):1353-59. doi: 10.1046/j.1440-1746.2001.02629.x.
- Thurston, Teresa L. M., Michal P. Wandel, Natalia von Muhlinen, Agnes Foeglein, y Felix Randow. 2012. «Galectin 8 Targets Damaged Vesicles for Autophagy to Defend Cells against Bacterial Invasion». *Nature* 482(7385):414-18. doi: 10.1038/nature10744.
- Tian, Chuan, Koushik Kasavajhala, Kellon A. A. Belfon, Lauren Raguette, He Huang, Angela N. Miguez, John Bickel, Yuzhang Wang, Jorge Pincay, Qin Wu, y Carlos

- Simmerling. 2020. «ff19SB: Amino-Acid-Specific Protein Backbone Parameters Trained against Quantum Mechanics Energy Surfaces in Solution». *Journal of Chemical Theory and Computation* 16(1):528-52. doi: 10.1021/acs.jctc.9b00591.
- Toscano, Marta A., Germán A. Bianco, Juan M. Ilarregui, Diego O. Croci, Jorge Correale, Joseph D. Hernandez, Norberto W. Zwirner, Francoise Poirier, Eleanor M. Riley, Linda G. Baum, y Gabriel A. Rabinovich. 2007. «Differential Glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 Effector Cells Selectively Regulates Susceptibility to Cell Death». *Nat. Immunol.* 8(8):825-34. doi: 10.1038/ni1482.
- Toscano, Marta A., Verónica C. Martínez Allo, Anabela M. Cutine, Gabriel A. Rabinovich, y Karina V. Mariño. 2018. «Untangling Galectin-Driven Regulatory Circuits in Autoimmune Inflammation». *Trends in Molecular Medicine* 24(4):348-63. doi: 10.1016/j.molmed.2018.02.008.
- Tran, Sharon, Juliani Juliani, W. Douglas Fairlie, y Erinna F. Lee. 2023. «The Emerging Roles of Autophagy in Intestinal Epithelial Cells and Its Links to Inflammatory Bowel Disease». *Biochemical Society Transactions* 51(2):811-26. doi: 10.1042/BST20221300.
- Troncoso, María F., María T. Elola, Ada G. Blidner, Luciana Sarrias, María V. Espelt, y Gabriel A. Rabinovich. 2023. «The Universe of Galectin-Binding Partners and Their Functions in Health and Disease». *The Journal of Biological Chemistry* 299(12):105400-105400. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105400.
- Turnbull, W. Bruce, y Antonio H. Daranas. 2003. «On the Value of c: Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry?». *Journal of the American Chemical Society* 125(48):14859-66. doi: 10.1021/ja036166s.
- Van der Sluis, Maria, Barbara A. E. De Koning, Adrianus C. J. M. De Bruijn, Anna Velcich, Jules P. P. Meijerink, Johannes B. Van Goudoever, Hans A. Büller, Jan Dekker, Isabelle Van Seuningen, Ingrid B. Renes, y Alexandra W. C. Einerhand. 2006. «Muc2-Deficient Mice Spontaneously Develop Colitis, Indicating That MUC2 Is Critical for Colonic Protection». *Gastroenterology* 131(1):117-29. doi: 10.1053/j.gastro.2006.04.020.
- Varadi, Mihaly, Stephen Anyango, Mandar Deshpande, Sreenath Nair, Cindy Natassia, Galabina Yordanova, David Yuan, Oana Stroe, Gemma Wood, Agata Laydon, Augustin Židek, Tim Green, Kathryn Tunyasuvunakool, Stig Petersen, John Jumper, Ellen Clancy, Richard Green, Ankur Vora, Mira Lutfi, Michael Figurnov, Andrew Cowie, Nicole Hobbs, Pushmeet Kohli, Gerard Kleywegt, Ewan Birney, Demis Hassabis, y Sameer Velankar. 2022. «AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models». *Nucleic Acids Research* 50(D1):D439-44. doi: 10.1093/nar/gkab1061.
- Varki, Ajit, y Stuart Kornfeld. 2022. «Historical Background and Overview». en *Essentials of Glycobiology*, editado por A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, y P. H. Seeberger. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Villablanca, Eduardo J., Katja Selin, y Charlotte R. H. Hedin. 2022. «Mechanisms of Mucosal Healing: Treating Inflammatory Bowel Disease without Immunosuppression?» *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 19(8):493-507. doi: 10.1038/s41575-022-00604-y.
- Wallaeys, Charlotte, Natalia Garcia-Gonzalez, y Claude Libert. 2022. «Paneth cells as the cornerstones of intestinal and organismal health: a primer». *EMBO Molecular Medicine* 15(2):e16427. doi: 10.15252/emmm.202216427.
- Walter, Romina J., Steffen J. Sonnentag, Leonel Munoz-Sagredo, Melanie Merkel, Ludovic Richert, Felix Bunert, Yvonne M. Heneka, Thomas Loustau, Michael Hodder, Rachel A. Ridgway, Owen J. Sansom, Yves Mely, Ulrich Rothbauer, Mark Schmitt, y Véronique Orian-Rousseau. 2022. «Wnt Signaling Is Boosted during Intestinal Regeneration by a CD44-Positive Feedback Loop». *Cell Death & Disease* 13(2):1-16. doi: 10.1038/s41419-022-04607-0.
- Wangchuk, Phurpa, Karma Yeshe, y Alex Loukas. 2024. «Ulcerative Colitis: Clinical Biomarkers, Therapeutic Targets, and Emerging Treatments». *Trends in Pharmacological Sciences* 45(10):892-903. doi: 10.1016/j.tips.2024.08.003.
- Webb, Benjamin, y Andrej Sali. 2016. «Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER». *Current Protocols in Bioinformatics* 54(1):5.6.1-5.6.37. doi: <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>.
- Winter, Sebastian E., y Andreas J. Bäuml. 2023. «Gut Dysbiosis: Ecological Causes and Causative Effects on Human Disease». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120(50):e2316579120. doi: 10.1073/pnas.2316579120.
- Wu, Chuan, Theresa Thalhamer, Rafael F. Franca, Sheng Xiao, Chao Wang, Chie Hotta, Chen Zhu, Mitsuomi Hirashima, Ana C. Anderson, y Vijay K. Kuchroo. 2014. «Galectin-9-CD44 Interaction Enhances Stability and Function of Adaptive Regulatory T Cells». *Immunity* 41(2):270-82. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.011.
- Yoshida, Hiromi, Satoshi Yamashita, Misa Teraoka, Aiko Itoh, Shin-ichi Nakakita, Nozomu Nishi, y Shigehiro Kamitori. 2012. «X-Ray Structure of a Protease-Resistant Mutant Form of Human Galectin-8 with Two Carbohydrate Recognition Domains». *The FEBS Journal* 279(20):3937-51. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08753.x.
- Yu, Tony B., Susanna Dodd, Lu-Gang Yu, y Sreedhar Subramanian. 2020. «Serum Galectins as Potential Biomarkers of Inflammatory Bowel Diseases». *PLOS ONE* 15(1):e0227306. doi: 10.1371/journal.pone.0227306.
- Yuan, Ziyue, Jing Ye, Bo Liu, y Lan Zhang. 2024. «Unraveling the Role of Autophagy Regulation in Crohn's Disease: From Genetic Mechanisms to Potential Therapeutics». *Advanced Biotechnology* 2(2):14. doi: 10.1007/s44307-024-00021-z.
- Zhang, Chenguang, Huifeng Liu, Lei Sun, Yue Wang, Xiaodong Chen, Juan Du, Åsa Sjöling, Junhu Yao, y Shengru Wu. 2023. «An Overview of Host-Derived Molecules That Interact with Gut Microbiota». *iMeta* 2(2):e88. doi: 10.1002/imt2.88.

- Zhang, Yang, y Jeffrey Skolnick. 2005. «TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score». *Nucleic Acids Research* 33(7):2302-9. doi: 10.1093/nar/gki524.
- Zhao, Nan, Chuanguo Liu, Ning Li, Shuang Zhou, Yuting Guo, Shihua Yang, y Huimin Liu. 2023. «Role of Interleukin-22 in ulcerative colitis». *Biomedicine & Pharmacotherapy* 159:114273. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114273.
- Zhou, Royce W., Noam Harpaz, Steven H. Itzkowitz, y Ramon E. Parsons. 2023. «Molecular Mechanisms in Colitis-Associated Colorectal Cancer». *Oncogenesis* 12(1):1-11. doi: 10.1038/s41389-023-00492-0.
- Zundler, Sebastian, Emily Becker, Marta Spocinska, Monique Slawik, Loreto Parga-Vidal, Regina Stark, Maximilian Wiendl, Raja Atreya, Timo Rath, Moritz Leppkes, Kai Hildner, Rocío López-Posadas, Sören Lukassen, Arif B. Ekici, Clemens Neufert, Imke Atreya, Klaas P. J. M. van Gisbergen, y Markus F. Neurath. 2019. «Hobit- and Blimp-1-Driven CD4+ Tissue-Resident Memory T Cells Control Chronic Intestinal Inflammation». *Nature Immunology* 20(3):288-300. doi: 10.1038/s41590-018-0298-5.

Lista de Figuras

Figura 1. Características clínicas de la EI. (a) La inflamación en la EC (izquierda) presenta un patrón segmentado y afecta con frecuencia al íleon terminal (flecha). En contraste, la CU (derecha) suele afectar al recto (flecha) y pudiendo evolucionar hacia la inflamación de todo el colon. (b) Características endoscópicas de la CU (arriba a la derecha) y EC (fila inferior) en comparación con intestino sano (arriba a la izquierda): se observan erosiones y sangrado, úlceras grandes y úlceras con estenosis. (c) Manifestaciones extraintestinales de las EI (Neurath 2019).....6

Figura 2. Composición y arquitectura del epitelio. (a) Esquema representativo del epitelio del intestino delgado. Los enterocitos constituyen el tipo celular predominante en el eje cripta-vellosidad y son capaces de secretar péptidos antimicrobianos (RegIIIy, β -defensinas, catelicidina). Las células de Paneth, en la base de la cripta, producen péptidos antimicrobianos específicos (lisozima, α -defensinas, sPLA2). Las células M se localizan en el epitelio asociado a los folículos (FAE) que recubre las placas de Peyer y participan en la captación y el transporte de antígenos. Además, las células caliciformes facilitan la transferencia de antígenos lumenales a las células dendríticas a través de los pasajes de antígenos asociados a células caliciformes (GAPs) (b) Esquema representativo del epitelio del colon. Los colonocitos y las células caliciformes son los principales tipos celulares de la cripta colónica. Las células caliciformes son responsables de la formación de la capa de moco externa e interna mediante la secreción de mucina MUC2, así como de otras proteínas (AGR2, ZG16, CCLA1, RELM β) asociadas con esta barrera protectora. CD: célula dendrítica. IEL: linfocito intraepitelial. (Allaire et al. 2018).....10

Figura 3. Circuitos inmunológicos en colitis ulcerosa. (a) En presencia de una microbiota comensal equilibrada, las células epiteliales intestinales secretan mucinas y péptido antimicrobianos (AMPs), y los PAMPs inducen la secreción de citoquinas epiteliales (TSLP, IL-33, IL-25 y TGF- β) que promueven el desarrollo de células dendríticas y macrófagos tolerogénicos. A su vez, las células dendríticas, inducen el desarrollo de linfocitos T regulatorios inducibles (iT_{reg}) a través de procesos dependientes de TGF- β . Además, TGF- β derivado de linfocitos T_{regs}, así como BAFF (Factor activador de célula B) y APRIL derivados del epitelio promueven la generación de células plasmáticas productoras de IgA (CPs IgA⁺). A través de mecanismos adicionales, incluida la secreción de TGF- β e IL-10 por las células iTreg y la secreción de IL-10 por los macrófagos, se induce y mantiene el estado fisiológico de tolerancia. (b) En colitis ulcerosa se observa una microbiota alterada en su composición; los PAMPs estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6 e IL-18 de células epiteliales e IL-6, IL-12 e IL-23 de células dendríticas y macrófagos/monocitos) que inducen desarrollo de células T CD4⁺ efectoras (Th1 y Th17). Dependiendo de la citoquina, se generan linfocitos Th2 o Th9, estos últimos son esenciales en el deterioro la función de barrera epitelial.

Células linfoides innatas intestinales, que incluyen las células NK-like (del inglés *Natural killer-like*), las células inductoras de tejido linfóide (LTi) y los $\gamma\delta$ IEL (linfocitos intraepiteliales) responden a la regulación positiva de las citoquinas proinflamatorias IL-22 (que protege la barrera epitelial), IL-17A e IL-17F (que reclutan neutrófilos para promover la inflamación y la proliferación epitelial mediada por IL-22) (Wangchuk, Yeshi, y Loukas 2024)..... 13

Figura 4. Activación y tráfico de linfocitos T en EII. A diferencia de los linfocitos T de memoria central (T_{CM}), los linfocitos T de memoria efectora (T_{EM}) reingresan al tejido intestinal mediante mecanismos específicos de migración al epitelio, lo que lleva a su acumulación en EII. Los linfocitos T_{EM} pueden diferenciarse en linfocitos T efectores (T_{eff}), que causan daño tisular, o en linfocitos T de memoria residente en tejidos (T_{RM}), que permanecen de manera permanente en el tejido. En el contexto de la EII, los linfocitos T_{EM} , T_{eff} y T_{RM} contribuyen a la inflamación junto con células inmunitarias locales, como macrófagos, células dendríticas (DCs) y células linfoides innatas (ILCs) (Neurath 2019). 14

Figura 5. Diversidad estructural de glicoconjugados. Las glicoproteínas se caracterizan por la sustitución de residuos de Asn y Ser/Thr por N- y O-glicanos, respectivamente. Los N-glicanos se unen a un motivo de glicosilación consensuado Asn-X-Ser/Thr (donde X denota cualquier aminoácido excepto Pro), y consisten en un glicano core o núcleo que contiene dos residuos de GlcNAc y tres residuos de manosa (Man), sustituido solo por manosa (alta manosa) o por lactosaminas (complejos). En la O-glicosilación de tipo mucina (O-GalNAc), la N-acetilgalactosamina inicial se extiende formando diversas estructuras núcleo y elongadas con residuos de lactosamina. Los glicosaminoglicanos pueden aparecer como componentes de la matriz extracelular (ej. hialuronano), o como parte de proteoglicanos donde se unen a proteínas en los motivos Ser-Gly-X-Gly. Los glicolípidos son componentes clave de la membrana celular. IdoA, ácido idurónico. Fuc, fucosa; Gal, galactosa; GalNAc, N-acetilgalactosamina; Glc, glucosa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; IdoA, ácido idurónico; Man, manosa; NXS/T, asparagina-X-serina o treonina; Rib, ribosa; Sia, ácido siálico; Xyl, xilosa. (Kudelka et al. 2020; Stanley 2024)..... 15

Figura 6. Estructuras de glicanos alteradas en la EII. Se representan los principales O- glicanos (a) en intestino sano (b) descriptos como parte de las alteraciones observadas en EII (Kudelka et al. 2020)..... 17

Figura 7. Esquema que muestra los cambios en la glicosilación durante la inflamación intestinal. El panel izquierdo muestra la homeostasis intestinal con capas de *mucus* intactas, eubiosis microbiana y expresión de glicanos maduros en la superficie. El panel derecho representa la inflamación intestinal con capas de *mucus* degradadas, sobrecrecimiento de bacterias patógenas, aumento del tráfico de PMN (neutrófilos) hacia el lumen y alteración de la expresión de glicanos en la superficie de las células epiteliales, células inmunitarias y mucinas intestinales (Brazil y Parkos 2022)..... 19

Figura 8. Las galectinas y sus funciones (a-c) Clasificación estructural de las galectinas. La naturaleza multivalente de las galectinas y el reconocimiento de residuos específicos en glicoconjugados de la membrana celular permiten la formación de estructuras macromoleculares complejas, denominadas *lattices*. **(d)** Las galectinas extracelulares pueden unirse a motivos comunes de glicanos que están presentes en la superficie de la mayoría de las células. Estas interacciones pueden ser alteradas durante procesos como la activación y diferenciación celular, e influyen sobre la secreción de citoquinas, la quimiotaxis y el destino celular. **(e)** Las galectinas se sintetizan y pueden ser secretadas o permanecer en el citosol, ya que carecen de una secuencia señal clásica, pero también pueden trasladarse al núcleo. Las galectinas citosólicas pueden influir en la señalización celular al unirse directamente a objetivos intracelulares, como BCL-2 y la proteína ALIX (*ALG2-interacting protein X*), a través de interacciones independientes de carbohidratos. Esto puede afectar la señalización celular, la supervivencia, la fagocitosis y la autofagia. **(f)** Las galectinas intracelulares también pueden unirse a glicanos expuestos tras el daño de organelas, lo que induce la autofagia (Liu y Stowell 2023; Mariño et al. 2023).....21

Figura 9. Funciones de Gal-4 en el intestino. Gal-4 ha sido descrita como mediadora de mecanismos inmunológicos de relevancia en inflamación intestinal por interacción con células T, monocitos y macrófagos. Asimismo, su expresión se relaciona con funciones de transporte y reparación de la barrera epitelial. Se ha descrito como una lectina con actividad antibacteriana, además de participar en el proceso de migración de microorganismos hacia ganglios mesentéricos.....26

Figura 10. Purificación y evaluación de la actividad de rhGal-4. (a) Esquema del flujo de trabajo para la obtención de Gal-4 utilizando **(a)** una columna His-Trap o **(b)** una columna de lactosil-sepharosa. **(c)** Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñida por Coomassie Blue de las fracciones obtenidas durante la purificación por columna His-Trap: 1: marcador de peso molecular; 2: percolado inicial de la columna con 25 mM de imidazol, 3-5: lavados de la columna; 6: elución de His₆-SUMO-Gal-4 con 250 mM de imidazol; 7: fracción tras proteólisis con ULP1; 8: percolado de rGal-4 con imidazol 25 mM en la segunda columna; 9: lavado de la segunda columna; 10: SUMO y ULP1 eluyen en imidazol 250mM. **(d)** Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) teñida por Coomassie Blue de las fracciones obtenidas durante la purificación por columna de lactosil-sepharosa: 1: marcador de peso molecular; 2: sobrenadante del lisado de *E. coli*; 3: percolado inicial de la columna; 4: lavado; 5: elución de His₆-SUMO- Gal-4 con 200 mM de lactosa; 6: fracción tras proteólisis de SUMO con ULP1; 7: fracción 6 en buffer de siembra para la segunda cromatografía de afinidad por lactosa; 8: percolado de SUMO y ULP1 en la segunda columna; 9: lavado de la segunda columna; 10: elución de rGal-4 con 200 mM de lactosa.(Peso molecular del constructo His₆-SUMO-Gal-4: 47,30 kDa; PM de Gal-4: 36 kDa)..... 48

Figura 11. Ensayo de afinidad en fase sólida . (a) Esquema del ensayo. rGal-4 se une a los glicanos de la asialofetuína inmovilizada en las placas. Luego, la unión de rGal-4 es detectada por un anticuerpo anti-Gal-4, estreptavidina-HRP y TMB. **(b)** Estructura de los oligosacáridos seleccionados como posibles ligandos de rGal-4 siguiendo la nomenclatura de símbolos para glicanos (SNFG) (Neelamegham et al. 2019). **(c)** *Heatmap* que resume los datos obtenidos por ensayos de fase sólida para Gal-4. Se muestra la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) para cada ligando competitivo.....49

Figura 12. Ensayo de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación (a) Diseño del ensayo Gal-4 con eritrocitos (RBC). **(b)** Ensayo de hemaglutinación con Gal-4 en eritrocitos humanos (panel superior).....50

Figura 13. Simulaciones de dinámica molecular (MD) de los complejos (a) Gal-4N-BGA6 y **(b)** Gal-4C-BGA6. Los dominios CRD de Gal-4 se representan en formato *new cartoon*, mientras que BGA6 se muestra en formato de *licorice*. Las interacciones clave de enlaces de hidrógeno (HB) para los complejos Gal-4N-BGA6 y Gal-4C-BGA6 **(a y b,** respectivamente) se obtuvieron mediante simulaciones MD. Los gráficos de barras muestran la frecuencia de enlaces de hidrógeno considerando los donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, separados por un guion ("-"). Los residuos de aminoácidos no conservados se destacan en negrita.....52

Figura 14. Modelos moleculares de Galectina-4 construidos con **(a)** un modelo templado del *linker* (Robetta y Modeller), **(b)** sin modelo templado del *linker* (Modeller), **(c)** AlphaFold V2. Las flechas indican el sentido de las caras S y F desde el residuo conservado de Trp de cada DRC. **(d)** Ampliación de la zona de contacto entre los DRC para el modelo construido con AlphaFold V2. Los residuos claves involucrados en la interacción entre los DRC se encuentran resaltados.....54

Figura 15. Simulaciones de dinámica molecular de Galectina-4 de longitud completa (FL) en complejo con el glicano BGA6 (a) en los dominios N-terminal (NBGA6), C- terminal (CBGA6) o en ambos dominios (2BGA6). **(b)** Gráficos de barras que representa el análisis de los enlaces de hidrógeno entre ambos DRCs (panel izquierdo), los DRCs y el *linker* (panel central), y BGA6 y los aminoácidos de Gal-4 (panel derecho). Cuando se detectaron múltiples puentes de hidrógeno, se representaron en una sola barra. **(c)** El gráfico de puntos muestran la frecuencia de los contactos más frecuentes (<4,5 Å) entre los glicanos y los aminoácidos de Gal-4. Cada punto representa un contacto.....56

Figura 16. Espectros de RMN-¹H STD para los complejos de rGal-4 con (a) 2'-FL, **(b)** BGA6 y **(c)** BGA2. Panel superior: mapeo del epítopo para cada oligosacárido determinado basado en irradiación a 0,17 ppm. Los círculos indican las posiciones cuyas intensidades de STD son reportadas (normalizadas contra la STD más intensa) y están codificados por colores según esta intensidad normalizada. Panel inferior: espectros de una solución de oligosacárido 2,5 mM en presencia de 50 µM de rGal-4 (relación 50:1). Primer espectro: espectro de referencia con anotaciones para las señales que muestran

intensidad de STD; segundo espectro: espectro STD con irradiación de la proteína en la región alifática (0,17 ppm); tercer espectro: espectro STD con irradiación de la proteína en la región aromática (6,73 ppm).(0,17 ppm); tercer espectro: espectro STD con irradiación de la proteína en la región aromática (6,73 ppm).....57

Figura 17. Ensayo de estimulación de PBMCs con Gal-4 (a) Esquema del experimento en presencia o ausencia de BGA6. (b) La secreción de IL-6 se determinó mediante ELISA en sobrenadantes de las células en cultivo. (ANOVA de una vía, prueba post-hoc de Tukey). Los puntos individuales representan réplicas biológicas independientes. Los datos se presentan como medias $\pm$ SEM y son representativos de dos experimentos independientes. *P < 0,05 y **P < 0,01.....58

Figura 18. Análisis de expresión diferencial de Gal-4 en biopsias inflamadas de CU, en comparación con individuos sanos, (a) de datos de microarray o (b) scRNAseq de células epiteliales. Se resaltan el gen de Gal-4 (*LGALS4*, foco de esta tesis) y *LGALS1*, que condice con lo previamente obtenido en literatura (Morosi et al. 2021). (c) Análisis por RT-PCR de los niveles de expresión de *Lgals4* en muestras de colon obtenidas de ratones *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* (Prueba de t-student), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. (d) Muestras histológicas obtenidas de ratones *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}*, teñidas con hematoxilina/eosina o mediante inmunohistoquímica con anti-Gal-4.....61

Figura 19. Composición del compartimento T en ganglios mesentéricos de animales sanos no tratados *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}*. (a) Estrategia de *gating* para linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. (b) Proporción de linfocitos T CD4⁺ y (c) linfocitos CD8⁺. Se indican los porcentajes de estas poblaciones dentro de las células indicadas entre paréntesis respecto a las células vivas. Se representan los valores individuales y la media $\pm$ SD de un experimento realizado con 5-6 ratones por grupo experimental, prueba de t-student, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.....63

Figura 20. Los linfocitos B y las células mieloides en ganglios mesentéricos de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* no presentan diferencias significativas. (a) Estrategia de *gating* para linfocitos B y células mieloides. (b) Proporción de linfocitos B y (c) células mieloides. Se indican los porcentajes de estas poblaciones dentro de las células indicadas entre paréntesis respecto a las células vivas. Se representan los valores individuales y la media $\pm$ SD de un experimento realizado con 5-6 ratones por grupo experimental (Prueba de t-student) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.....64

Figura 21. Modelo agudo de inflamación aguda inducida por DSS. (a) Esquema ilustrativo del modelo. (b) Curva de porcentaje del peso perdido por animales tratados (DSS) o no (ANOVA de 2 factores). (c) Relación peso/largo del colon (Prueba de t-Student). (d) Concentración de lipocalina-2 (LCN2) en suero (Prueba de t-Student). Se representan los valores individuales y/o la media $\pm$ SD de un experimento representativo realizado con 5-6 ratones por grupo experimental, excepto para LCN2 que los valores corresponden a dos experimentos *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.....65

Figura 22. Composición inmune de ganglios mesentéricos de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* con inflamación aguda inducida por DSS. (a) linfocitos T CD4⁺, (b) linfocitos T CD8⁺, (c) linfocitos B y (d) células mieloides. Se representan los valores individuales y la media ± SD de un experimento representativo (N de experimentos = 2) realizado con 5-6 ratones por grupo experimental (Prueba de t-student) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001... 67

Figura 23. Composición inmune en sangre periférica de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* con inflamación aguda inducida por DSS. (a) Linfocitos T CD4⁺, (b) linfocitos T CD8⁺, (c) linfocitos B y (d) células mieloides. Se representan los valores individuales y la media ± SD de un experimento representativo (N de experimentos = 2) realizado con 5-6 ratones por grupo experimental (Prueba de t-student), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. .68

Figura 24. Modelo agudo de inflamación inducida por DSS. (a). Esquema ilustrativo del modelo. **(b)** Curva de porcentaje del peso perdido animales machos y hembras *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* con inflamación aguda inducida por DSS (ANOVA de 2 factores). **(c)** Relación peso/largo del colon (Prueba de t-Student). Se representan los valores individuales y/o la media ± SD de un experimento representativo (N de experimentos = 2) realizado con 5-6 ratones por grupo experimental *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.....69

Figura 25. Modelo crónico de inflamación inducida por DSS en animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}*. (a) Esquema ilustrativo del modelo. **(b,c)** Curva de porcentaje del peso perdido por animales sin tratar **(b)** y **(c)** tratados con DSS (ANOVA de 2 factores). **(d)** Relación peso/largo del colon (Prueba de t de student). **(e)** Concentración de lipocalina-2 (LCN2) en suero (Prueba de t de student). Se representan los valores individuales y/o la media ± SD de un experimento representativo (N de experimentos = 2) realizado con 5-6 ratones por grupo experimental, excepto para LCN2 que los valores corresponden a dos experimentos *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.....70

Figura 26. Fenotipificación de factores de transcripción de linfocitos T en ganglios mesentéricos de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* con inflamación crónica inducida por DSS. (a) Linfocitos T CD4⁺ y (b) linfocitos CD8⁺. Se indican los porcentajes de estas poblaciones dentro de las células indicadas entre paréntesis respecto a las células vivas. Se representan los valores individuales y la media ± SD de un experimento realizado con 5-6 ratones por grupo experimental (Prueba de t-student) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. 71

Figura 27. Compartimento T en ganglios mesentéricos de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* con inflamación crónica inducida por DSS. (a) Linfocitos T CD4⁺ y (b) linfocitos CD8⁺. Se indican los porcentajes de estas poblaciones dentro de las células indicadas entre paréntesis respecto a las células vivas. Se representan los valores individuales y la media ± SD de un experimento representativo (N de experimentos = 2) realizado con 5-6 ratones por grupo experimental (Prueba de t-student) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001...72

Figura 28 Fenotipificación de migración de linfocitos T en ganglios mesentéricos de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* con sometidos a un ciclo de DSS. (a) Linfocitos T CD4⁺

y **(b)** linfocitos CD8⁺. Se indican los porcentajes de estas poblaciones dentro de las células indicadas entre paréntesis respecto a las células vivas. Se representan los valores individuales y la media $\pm$ SD de un experimento realizado con 5-6 ratones por grupo experimental (Prueba de t-student) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.....73

Figura 29. Fenotipificación de linfocitos CD4⁺ (a) activados y estimulados en presencia o ausencia de Gal-4 y (b) citoquinas de memoria. Se indican los porcentajes de estas poblaciones dentro de las células indicadas entre paréntesis respecto a las células vivas. Se representan los valores individuales y la media $\pm$ SD de un experimento representativo (N de experimentos = 2) realizado con 1 ratones por grupo experimental (ANOVA), *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.....73

Figura 30. Análisis de datos integrados de transcriptómica espacial y scRNAseq de colon murino. (a) Análisis de datos integrados de transcriptómica espacial. La expresión de *Lgals4* se muestra en un gradiente de menor a mayor desde el azul al rojo. **(b)** scRNAseq integrado de bases de datos murinas. UMAP de poblaciones de células de colon de ratón y expresión de *Lgals4*. La expresión de *Lgals4* se muestra en un gradiente de menor a mayor desde el azul al amarillo. (EECs: células enteroendócrinas, CCs: colonocitos, Goblet o células caliciformes, TA: *Transit-amplifying epithelial cells*, PC: células plasmáticas, Myeloid: células mieloides, Glial: células de la glía, SMCs: células del musculo liso, Endo: células endoteliales, SFB: fibroblastos).....75

Figura 31. Composición de del compartimento epitelial en animales Gal4^{fl/fl} y Gal4^{ΔIEC}. (a). Genotipos de ratones empleados. **(b)** Estrategia de *gating*. Proporción de células epiteliales en el **(c)** colon e **(d)** intestino delgado. Se representan los valores individuales y la media $\pm$ SD de un experimento. (Prueba de t-student) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.....77

Figura 32. Histogramas representativos de la intensidad de fluorescencia de lectinas biotiniladas en el (a,b) intestino delgado y (c,d) colon. Unión de lectinas a células epiteliales Epcam⁺ de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* el **(b)** intestino delgado y **(d)** colon informada como mediana de fluorescencia relativa al negativo (rMFI) Un experimento representativo con 5 ratones.(Prueba de t-student) *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.....78

Figura 33. Unión de rGal-4 a células epiteliales. (a) Esquema de experimento con línea celular Caco-2. **(b)** Histogramas representativos de la intensidad de fluorescencia de Gal-4 fluorocromada a células Caco-2 en presencia o ausencia del ligando BGA6. **(c)** Cuantificación de Mediana de fluorescencia (MFI) de la unión de Gal-4 fluorocromada a células Caco-2. **(d)** Histogramas representativos de la intensidad de fluorescencia de Gal-4 fluorocromada a células epiteliales CD44⁺, CD24⁺ o CD24⁺CD44⁺. Unión de Gal-4 fluorocromada a células epiteliales Epcam⁺ de animales *Gal4^{fl/fl}* y *Gal4^{ΔIEC}* del **(e)** intestino delgado y **(f)** colon, informadas como Mediana de fluorescencia (MFI). Un experimento

representativo con 4-5 ratones por grupo. (Prueba de t-student) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 80

Figura 34. Ensayos de unión de Gal-4 a tejido intestinal (a) Esquema experimental de tinción de *swiss rolls* de intestino delgado y colon con Gal-4 fluorocromada, y anti-Lyz1 (células de Paneth) y anti-Muc2 (células caliciformes). **(b)** Imágenes de *swiss roll* de intestino delgado y colon teñidas con Gal-4 PerCPCy5.5 y anti-Lyz o anti-Muc2, respectivamente. Las barras representan 100 μm 81

Figura 35. Análisis de datos integrados de transcriptómica espacial (a) Diseño experimental para el análisis de organoides de criptas intestinales, evaluada mediante **(b)** el área de los organoides y **(c)** el número de organoides cuantificado a partir de imágenes analizadas en QuPath (Prueba de t-student). **(d)** Diseño experimental para la tinción de organoides de criptas de intestino delgado evaluados mediante microscopia confocal. **(e)** Microscopia confocal de organoides de criptas de intestino delgado. La barra indica 50 μm . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 83

Figura 36. Estimulación de organoides de célula única con Gal-4 (a) Diseño experimental para la estimulación de organoides generados a partir de células únicas desde el día 5 **(a)** o 8 **(c)**, cuantificada mediante *Incucyte* **(b-d)**. La flecha indica el momento de administración de rGal-4. **(e-f)** Diseño experimental para la tinción de organoides generados a partir de células únicas en el día 8 o 10, para identificar células de Paneth (Lyz1) y células caliciformes (Muc2), y la unión de rGal-4.....84

Lista de Tablas

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para el reconocimiento de poblaciones celulares por citometría de flujo.....40

Tabla 2. Evaluación por ITC de los parámetros termodinámicos de unión de rGal-4 hacia los tres mejores ligandos identificados previamente mediante SPA. ND: no determinado. 51

Tabla 3. Efecto de las condiciones de almacenamiento de rhGal-4 sobre su actividad hemaglutinante. Se evaluaron ocho condiciones de almacenamiento para Gal-4 recombinante, como se describió en la **Sección 3.2** de **Materiales y Métodos**. Brevemente, todas las condiciones contienen 50 mM HEPES pH 7,2 y 150 mM NaCl, y se combinan con: (1) 14 mM β -mercaptoetanol (β -ME); (2) 14 mM β -ME y 100 mM lactosa; (3) 14 mM β -ME y 25% PEG 6000; (4) 14 mM β -ME, 100 mM lactosa y 25% PEG 6000; (5) 4 mM TCEP; (6) 4 mM TCEP y 100 mM lactosa; (7) 4 mM TCEP y 25% PEG 6000; y (8) 4 mM TCEP, 100 mM lactosa y 25% PEG 6000. Los resultados se expresan como la dilución de una solución de rhGal-4 120 ug/ml límite a la cual se observa actividad hemaglutinante..... 51

