



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOMEDICINA Y FARMACIA

**RELEVANCIA DEL MACRÓFAGO COMO FUENTE DE LIGANDOS WNT EN
LAS COMPLICACIONES ASOCIADAS A LA ENFERMEDAD DE CROHN**

Tesis doctoral

PEDRO SALVADOR ESCRIBANO

Directoras:

M^a Dolores Barrachina Sancho

M^a Dolores Ortiz Masià

Valencia, Marzo 2019

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT DE MEDICINA I ODONTOLOGIA

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA

Dra. **M^a Dolores Barrachina Sancho**, Catedrática de la Universidad de Valencia y la Dra. **M^a Dolores Ortiz Masià**, Profesora Ayudante Doctora de la Universidad de Valencia,

Certifican:

Que el trabajo titulado “Relevancia del macrófago como fuente de ligandos WNT en las complicaciones asociadas a la enfermedad de Crohn”, presentado por el Licenciado en Biología **Pedro Salvador Escribano**, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación y la defensa de esta Tesis Doctoral.

Para que así conste a los efectos oportunos, se expide la presente certificación en Valencia, a 11 de Marzo de 2019

Fdo. Dra. M^a Dolores Barrachina Sancho

Fdo. Dra. M^a Dolores Ortiz Masià

Esta Tesis Doctoral se ha realizado con la financiación de las siguientes becas y proyectos:

BECAS:

- **BES-2014-068581** Ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores, concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad. Abril 2015 - Marzo 2019.
- **EEBB-I-17-12695** Ayudas a la movilidad predoctoral para la realización de estancias breves en centros I+D, concedida por el Ministerio de Economía y Competitividad. Mayo 2017 – Julio 2017.

PROYECTOS:

- **SAF2013-43441-P** Modulación de la autofagia epitelial por los macrófagos: relevancia en la reparación mucosa en la enfermedad inflamatoria intestinal. IP: M^a Dolores Barrachina Sancho y Sara Calatayud Romero. Entidad financiera: Ministerio de Ciencia y Tecnología. 2014-2016.
- **SAF2016-80072-P** Modulación de la fibrosis intestinal por el sistema inmune innato en la enfermedad de Crohn. Entidad financiera: Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. 2016-2018.
- **CIBERehd [CB06/04/0071 y CIBER-EHD 2016 / ACCESS EHD16PI02]** Uso del tejido humano en la investigación gastroenterológica traslacional.
- **PROMETEOII 2014/035** Farmacología del tracto digestivo y la inflamación. Entidad financiera: Conselleria d'Educació, Investigació, Cultura i Esport. 2014-2017
- **UGP-14-164** Relevancia del fenotipo macrofágico en la recuperación mucosa en la enfermedad de Crohn. Entidad financiera: FISABIO

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, tengo que agradecer a mis directoras de tesis, Loles y Dolo por haber confiado en mí para realizar este trabajo. Vuestra supervisión ha sido impecable y cada una me habéis aportado un punto de vista muy útil que seguro que seguiré aplicando en el futuro. Loles, tu visión crítica de los datos me ha ayudado a ver que hay que volver a analizar todo una y otra vez y que hay que exprimir al máximo la información que se obtiene. Dolo, tus enseñanzas en el laboratorio han sido fundamentales para mí. Fuiste la primera persona que me confió experimentos en este laboratorio cuando aún no había ni empezado con mi investigación. Gracias a eso cogí la confianza necesaria para encargarme de los míos propios cuando estos empezaron.

Gracias también a Sara y Carlos, por vuestro apoyo en el análisis de los experimentos y por enseñarme a tener una visión crítica ante los resultados.

No me puedo olvidar de que llegué aquí gracias a Dulce, que me ha acompañado como compañera de bancada durante toda mi tesis entre “ahoritas” y “que a cada uno le muerdan los suyos”. Jesús, recuerdo muchos grandes momentos, recuerdo acabar tirados en el suelo de la risa “tesorito”, recuerdo ese pedazo de viaje que nos pegamos. Fer, Mariparo, Mamá, Patrocia, y a ti no se ya ni como decirte, lo dejaré en Mr. napias, con vosotros es con los que más tiempo he pasado fuera del laboratorio, de celebración en celebración, compartiendo grandes momentos y demostrando que no solo somos compañeros de trabajo, sino que somos grandes amigos.

Al liver team al completo, los que están y los que ya se marcharon, Alberto, trabaja un poquito que me tienes hartos ya, señorita Moragrega, te me cuidaas, a mi soviet favorita y ahora compañera de sufrimientos y a Nando y Miriam que se fueron hace ya tiempo, pero su huella aún está presente. A Isa y Ana, que os vais a llevar un tartazo ahora que ya no tengo miedo a represalias. María, Cesar, Samu, Nicole, Jorge, Antonio, son tantas personas las que han pasado por el laboratorio que seguro que hasta me dejo a alguien. A Ana y Eva, sin las cuales no podría haber realizado este trabajo. A ese gran ejército de padawans que año tras año pasan por aquí. No os nombro a todos

porque esto se podría hacer eterno. Al resto de compañeros del departamento, tanto jefes, como técnicos y personal administrativo.

A mis padres, gracias por haberme apoyado siempre y por vuestra inmensa ayuda. No sabéis lo importante que es para mí. A mi hermano, a Marta y a pollete y, aunque aún está en el horno en el momento que escribo esto, a pollete 2.0, que estoy deseando que esté entre nosotros.

To my labmates in Dr. Seidman's lab in Montreal, specially to you Denise, it was a pleasure to know you and to you Melissa for your help.

Y a ti, Laura, cuando empecé en esto no podría haberme imaginado que esa chica tímida con la que fui a Manises a por cachitos de señor terminaría siendo alguien tan importante para mí. Tú has sido mi principal apoyo durante todo este tiempo.

Muchas gracias a todos los que me habéis acompañado durante todo este tiempo. Había tenido malas experiencias en el pasado y gracias a todos vosotros, mi estancia aquí ha sido una de las mejores experiencias de mi vida.

INDICE DE
ABREVIATURAS



ACTB	Beta actina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
APC	Adenomatosis polyposis coli
APE	Endonucleasa apurínica/apirimidinica
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASB	Albúmina de suero bovino
BMP	Proteína morfogenética ósea
CaMK	Calmodulina quinasa
CaN	Calcineurina
CD	Célula dendrítica
Células M	Células microplegadas
Células NK	Células asesinas naturales
CI	Colitis inclasificada
CK	Caseína quinasa
CM	Colitis microscópica
CMLP	Células mononucleares de la lámina propia
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CRL	Receptores de lectina tipo C
FCTC	Factor de crecimiento del tejido conectivo
CU	Colitis ulcerosa
DAMP	Patrones moleculares asociados al daño
DKK	Dickkopf

DVL	Disheveled
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
TEM	Transición epitelial a mesenquimal
EndoMT	Transición endotelial a mesenquimal
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ET-	Endotelina
FAK	Quinasa de adhesión focal
FAP	Proteína de activación de fibroblastos
FCF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FCTC	Factor de crecimiento del tejido conectivo
FZD	Receptor frizzled
GSK	Serina-treonina quinasa glucógeno sintasa quinasa
GWAS	Estudios de asociación de genoma completo
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HGF	Factor de crecimiento de los hepatocitos
ICC	Células intersticiales de Cajal
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IL	Interleucina
IRF	Factor de regulación del interferón

LEF	Factor activador de linfocitos
LP	Lámina propia
LPS	Lipopolisacárido
LRP	Proteína relacionada con el receptor de LDL
LRR-R	Receptores de repeticiones ricas en leucina
MΦ	Macrófago
M(IL4)	Macrófago polarizado con IL4
MAMP	Patrones moleculares asociados a microorganismos
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos
MDP	Muramil dipéptido
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
miARN	MicroARN
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
MMP	Metaloproteasa de matriz
Mreg	Macrófagos reguladores
NLR	Receptores tipo NOD
NOS	Óxido nítrico sintetasa
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCP	Polaridad celular plana
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PCRq	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PPAR	Receptor del activador del proliferador de peroxisoma
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SRA	Sistema renina-angiotensina
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico
Ref	Factor efector redox
RLR	Receptores similares al gen 1 inducible por ácido retinoico
ROCK	Rho-quinasa
RYK	Receptor tirosina quinasa
s.e.m.	Error estándar de la media (standard error of the mean)
SEMF	Miofibroblastos subepiteliales intestinales
SFB	Suero fetal bovino
SFRP	Proteína secretada relacionada con Frizzled
SMA	Actina de músculo liso
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TBS-T	Salino tamponado con Tris- Polisorbato 20
TCF	Factor de células T
TGF	Factor de crecimiento transformante
Th	T ayudante
TIMP	Inhibidor de metaloproteasas de tejido
TLE	Potenciador de la división similar a la transducina
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral

Treg	Células T reguladoras
WB	Western Blotting
WIF	Factor inhibidor de WNT

INDICE DE
FIGURAS



Figura I. 1 Esquema de la transición epitelial a mesenquimal (TEM)	26
Figura I. 2 Esquema de la ruta WNT dependiente de β -catenina	34
Figura III. 1 Inducción de la inflamación crónica de colon y fibrosis	44
Figura IV. 1 La deficiencia de Stat6 promueve la respuesta fibrótica intestinal en la colitis crónica inducida por el ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS)	62
Figura IV. 2 La deficiencia de Stat6 promueve la respuesta fibrótica intestinal en la colitis crónica inducida por TNBS	63
Figura IV. 3 Los macrófagos CD16 + se acumulan en la mucosa de los ratones deficientes en Stat6 tratados con TNBS	64
Figura IV. 4 Wnt6 está regulado al alza en la mucosa colónica de ratones deficientes en Stat6 tratados con TNBS	66
Figura IV. 5 Wnt6 está regulado al alza en macrófagos positivos para CD16 de ratones deficientes en Stat6 tratados con TNBS	67
Figura IV. 6 La transferencia de macrófagos silvestres tratados con IL4 a ratones deficientes en Stat6 reduce la fibrosis	68
Figura IV. 7 Incremento de la presencia de colágeno en muestras intestinales que rodean el tracto de la fístula	71
Figura IV. 8 La expresión génica y proteica de colágeno está incrementada en muestras intestinales que rodean el tracto de la fístula	72
Figura IV. 9 Incremento de la TEM en muestras intestinales que rodean el tracto de la fístula	73
Figura IV. 10 Incremento en la expresión de marcadores de TEM en muestras intestinales que rodean el tracto de la fístula	75
Figura IV. 11 Incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias en muestras intestinales que rodean el tracto de la fístula	75
Figura IV. 12 La expresión proteica de FZD4 aumenta en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula	76
Figura IV. 13 La expresión de β -CATENINA epitelial aumenta en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula	80
Figura IV. 14 La señalización de WNT aumenta en el tejido intestinal y en las criptas intestinales del tejido que rodea el tracto de la fístula	81
Figura IV. 15 La expresión de WNT2B aumenta en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula	82
Figura IV. 16 Macrófagos CD16 + CD86 + se sobreexpresan en el tejido intestinal de pacientes con EC B3	84
Figura IV. 17 Macrófagos CD16 + CD86 + actúan como fuente de WNT2B en el tejido intestinal de pacientes con EC B3	85
Figura IV. 18 WNT2B colocaliza con E-CADHERINA en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula	86
Figura IV. 19 WNT2B interacciona con FZD4 en el tejido intestinal de pacientes con EC B3	87

Figura IV. 20 CMSP tratadas con secretomas procedentes de pacientes con EC B3 muestran un incremento en la expresión de CD16, CD86 y WNT2B _____	88
Figura IV. 21 WNT2B induce la expresión de marcadores de TEM en criptas intestinales aisladas _____	89
Figura IV. 22 WNT2B induce TEM en células HT29 _____	91
Figura IV. 23 WNT2B no induce la señalización WNT en fibroblastos primarios humanos _____	92
Figura V. 1 Modelo propuesto para la aparición de fibrosis en ratones Stat6 ^{-/-} _____	96

INDICE DE
TABLAS



Tabla I. 1 Clasificación de Montreal para la Enfermedad de Crohn _____	10
Tabla I. 2 Efecto de distintas citocinas sobre la generación de fibrosis intestinal _____	29
Tabla III. 1 Características de los pacientes utilizados para el estudio _____	46
Tabla III. 2 Anticuerpos primarios utilizados en las distintas técnicas _____	50
Tabla III. 3 Oligonucleótidos cebadores murinos usados en PCRq _____	52
Tabla III. 4 Oligonucleótidos cebadores humanos usados en PCRq _____	53
Tabla III. 5 Anticuerpos utilizados en citometría de flujo _____	57
Tabla IV. 1 Análisis de la expresión de ARNm de receptores FZD y ligandos WNT en tejido intestinal, criptas intestinales y fibroblastos de pacientes con EC y sin EII _____	78
Tabla IV. 2 WNT2B y FZD4 correlacionan con marcadores TEM en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula en pacientes con EC B3 _____	87

RESUMEN



La fibrosis y las fistulas son complicaciones frecuentes de la enfermedad de Crohn cuya etiopatogenia es desconocida. La cronicidad de la inflamación junto con alteraciones en la reparación tisular tras un daño, se han relacionado con estas complicaciones. Los macrófagos son células del sistema inmunitario innato ampliamente implicadas en la regulación de ambos procesos y como consecuencia en el desarrollo de la fibrosis. Estas células presentan elevada plasticidad y un continuo espectro de fenotipos funcionales que explican la diversidad de funciones que regulan. Recientes estudios han demostrado que los macrófagos, a través de vías de señalización dependientes de Stat6, actúan como fuentes de ligandos Wnt y participan en los mecanismos de regeneración mucosa en la colitis murina aguda. El objetivo de la presente tesis doctoral es analizar la relevancia del macrófago como fuente de ligandos Wnt en el desarrollo de fibrosis intestinal y fístulas. Para ello hemos utilizado un modelo murino de colitis crónica y resecciones intestinales de pacientes con enfermedad de Crohn con un patrón clínico estenosante y penetrante. Nuestros resultados muestran que la administración intrarectal semanal de TNBS induce una colitis crónica que provoca una respuesta fibrogénica en ratones *Stat6*^{-/-}, pero no en animales silvestres. Esta fibrosis se asocia con una baja proporción de macrófagos CD206 positivos, y con la acumulación de macrófagos CD16 positivos que producen Wnt6. Además, la transferencia de macrófagos silvestres tratados con IL4 a ratones *Stat6*^{-/-} reduce el número de macrófagos positivos para CD16 y la fibrosis intestinal. La acumulación de macrófagos CD16 positivos es también detectada en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fistula en pacientes con EC penetrante y no en el tejido fibrótico de pacientes con EC estenosante. En ambos casos se detecta acumulación de colágeno y expresión de marcadores de transición epitelial-mesenquimal, pero la colocalización de E-CADHERINA y VIMENTINA es mayor en el tejido intestinal de pacientes con patrón penetrante. Este tejido presenta una mayor expresión génica y proteica de FZD4 y de WNT2B, así como un elevado número de macrófagos CD16/WNT2B positivos. Además, la inmunoprecipitación de FZD4 permite detectar una mayor expresión de WNT2B unido a este receptor en el tejido intestinal que rodea la fístula. Por último, en células aisladas, WNT2B induce transición epitelial-mesenquimal a través de la activación de FZD4 lo que sugiere que la interacción WNT2B/FZD4 puede estar involucrada en la patogénesis de la

fístula y apunta a una nueva diana farmacológica para prevenir las complicaciones de la EC.

ÍNDICE

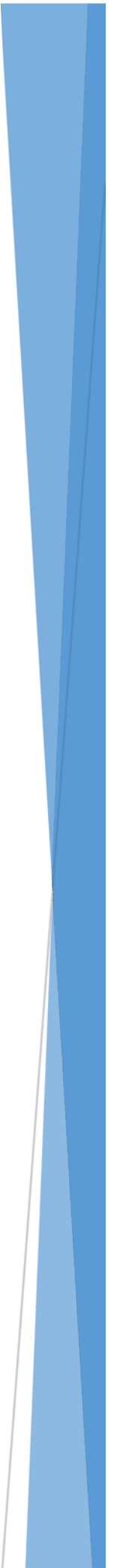


I. INTRODUCCIÓN	1
1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII).....	3
1.1. EPIDEMIOLOGÍA DE LA EII.....	3
1.2. ETIOLOGÍA DE LA EII.....	4
1.2.1. FACTORES GENÉTICOS Y EPIGENÉTICOS	5
1.2.2. FACTORES AMBIENTALES.....	7
1.3. CLASIFICACIÓN	9
2. ETIOPATOGENIA DE LA EII	10
2.1. DISRUPCIÓN DE LA BARRERA EPITELIAL	10
2.1.1. MICROBIOTA INTESTINAL	11
2.1.2. LA BARRERA EPITELIAL	12
2.2. RESPUESTA INFLAMATORIA	13
2.2.1. RESPUESTA INMUNITARIA INNATA	13
2.2.2. POLARIZACIÓN MACROFÁGICA	15
2.2.3. RESPUESTA INMUNITARIA ADAPTATIVA.....	18
2.3. DEFECTOS EN LA REGENERACIÓN MUCOSA	20
3. FIBROSIS EN LA EII.....	22
3.1. MEDIADORES CELULARES DE LA FIBROSIS	22
3.1.1. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO INNATO Y ADAPTATIVO	23
3.1.2. MIOFIBROBLASTOS Y SUS PRECURSORES MESENQUIMALES.....	24
3.1.3. PROLIFERACIÓN CELULAR, APOPTOSIS Y AUTOFAGIA.....	26
3.2. MEDIADORES MOLECULARES DE LA FIBROSIS	27
3.2.1. FACTORES DE CRECIMIENTO.....	27
3.2.2. CITOCINAS.....	28
3.2.3. QUIMIOCINAS	29
3.2.4. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	30
3.2.5. INTEGRINAS	30
3.2.6. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA (SRA).....	30
3.2.7. RUTA WNT	31
3.2.7.1. PROTEÍNAS WNT	31
3.2.7.2. RECEPTORES WNT	32
3.2.7.3. RUTA WNT/B-CATENINA	32
3.2.7.4. RUTAS WNT INDEPENDIENTES DE B-CATENINA.....	35
3.2.7.5. INHIBIDORES DE LA RUTA WNT	35

3.3. LA FISTULA.....	35
II. OBJETIVOS.....	37
III. METODOLOGÍA.....	41
1. EXPERIMENTOS CON RATÓN.	43
AISLAMIENTO DE MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS Y POLARIZACIÓN <i>IN VITRO</i>	44
TRANSFERENCIA DE MACRÓFAGOS M(IL4).....	44
AISLAMIENTO DE MACRÓFAGOS DE LA MUCOSA COLÓNICA MURINA.	44
2. EXPERIMENTOS CON MUESTRAS INTESTINALES HUMANAS.	45
MUESTRAS DE MUCOSA INTESTINAL HUMANA.	45
AISLAMIENTO DE CRIPTAS INTESTINALES Y CÉLULAS MONONUCLEARES DE LA LÁMINA PROPIA (CMLP) DE MUESTRAS QUIRÚRGICAS HUMANAS.	46
AISLAMIENTO DE FIBROBLASTOS INTESTINALES.....	46
OBTENCIÓN DE SECRETOMAS DE RESECCIONES INTESTINALES.....	47
OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (CMSP).	47
3. CULTIVO CELULAR Y TRATAMIENTOS.	47
4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	48
TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON.....	48
TINCIÓN SIRIUS RED.	48
INMUNOHISTOQUÍMICA	49
5. INMUNOFLUORESCENCIA.	50
6. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	51
EXTRACCIÓN DE ARN	51
SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO MEDIANTE TRANSCRIPCIÓN REVERSA.	51
PCR CUANTITATIVA (PCRQ).	51
7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA E INMUNOPRECIPITACIÓN.	53
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.	53
CUANTIFICACIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS MEDIANTE EL MÉTODO DE BRADFORD.	54
WESTERN BLOTTING (WB).....	54
INMUNOPRECIPITACIÓN.	56
8. CITOMETRÍA DE FLUJO.	56
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	57

IV. RESULTADOS	59
1. PAPEL DE <i>STAT6</i> EN UN MODELO MURINO CRÓNICO DE COLITIS Y FIBROSIS.	61
1.1. LA DEFICIENCIA DE <i>STAT6</i> FAVORECE LA FIBROSIS EN UN MODELO MURINO CRÓNICO DE COLITIS.	61
1.2. LA DEFICIENCIA DE <i>STAT6</i> DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE CD206 Y AUMENTA LA DE CD16 EN LOS MACRÓFAGOS DE LA MUCOSA DE RATONES TRATADOS CON TNBS.	63
1.3. <i>WNT6</i> ESTÁ REGULADO AL ALZA EN LA MUCOSA COLÓNICA Y EN CÉLULAS POSITIVAS PARA CD16 DE RATONES DEFICIENTES EN <i>STAT6</i> TRATADOS CON TNBS.	65
1.4. LA ADMINISTRACIÓN DE MACRÓFAGOS SILVESTRES TRATADOS CON IL4 A RATONES DEFICIENTES EN <i>STAT6</i> REDUCE LA FIBROSIS.	67
2. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO MACROFÁGICO Y DE LA RUTA WNT EN LAS COMPLICACIONES ASOCIADAS A LA EC.	70
2.1. LA TEM ESTÁ INCREMENTADA EN MUESTRAS INTESTINALES QUE RODEAN EL TRACTO DE LA FÍSTULA EN PACIENTES CON EC	70
2.2. LA EXPRESIÓN DE FZD4 EPITELIAL Y LA SEÑALIZACIÓN WNT AUMENTAN EN LAS MUESTRAS INTESTINALES QUE RODEAN EL TRACTO DE LA FÍSTULA EN PACIENTES CON EC.	76
2.3. LA EXPRESIÓN DE WNT2B AUMENTA EN LAS MUESTRAS INTESTINALES QUE RODEAN EL TRACTO DE LA FÍSTULA EN PACIENTES CON EC.	81
2.4. MACRÓFAGOS CD16 + ACTÚAN COMO FUENTE DE WNT2B EN EL TEJIDO INTESTINAL QUE RODEA EL TRACTO DE LA FÍSTULA EN PACIENTES CON EC	82
2.5. WNT2B COLOCALIZA CON E-CADHERINA, CORRELACIONA CON LOS MARCADORES DE TEM Y SE UNE A FZD4 EN EL TEJIDO INTESTINAL QUE RODEA EL TRACTO DE LA FÍSTULA EN PACIENTES CON EC.	85
2.6. LOS SECRETOMAS PROCEDENTES DE PACIENTES CON EC B3 INDUCEN UN INCREMENTO EN LA EXPRESIÓN DE CD16, CD86 Y WNT2B EN CMSP.	88
3. WNT2B INDUCE TRANSICIÓN EPITELIAL-MESENQUIMAL A TRAVÉS DE FZD4.....	89
V. DISCUSIÓN	93
VI. CONCLUSIONES	97
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	97
VIII. PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA	97
IX. ANEXOS.....	97

I.INTRODUCCIÓN



1. Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un trastorno intestinal crónico de etiología desconocida que incluye tanto la colitis ulcerosa (CU) como la enfermedad de Crohn (EC). La EII es causada por interacciones complejas entre factores inmunológicos, microbianos, ambientales, nutricionales y genéticos. El curso clínico de la EII se caracteriza por períodos alternos de remisión y recaída. Aunque la EC y la CU son patologías similares, presentan varias diferencias. La CU se asocia con inflamación y ulceraciones en las capas mucosa y submucosa del colon, mientras que la EC se caracteriza por agregados linfoides transmurales, granulomas no necróticos y fístulas. La CU suele comenzar en el recto, extendiéndose de manera continua en dirección proximal, pero limitándose al colon. La localización del tejido dañado varía según los pacientes. Entre el 20-30% tienen afectación en todo el colon (pancolitis). La colitis del lado izquierdo está limitada desde la porción colorrectal distal a la flexión esplénica y aparece en el 20-30% de los pacientes con CU. La más frecuente, con un 40-60% de todos los casos, se localiza en el área rectosigmoidea. A diferencia de la CU, en la EC las lesiones coexisten con áreas sanas y pueden aparecer en cualquier tramo del tracto gastrointestinal. Sin embargo, la zona ileocecal, el íleon terminal y el colon son las regiones más afectadas. La localización de las lesiones en la porción terminal colónica, en todo el intestino grueso o en la porción ileocolónica aparecen con una frecuencia similar. A diferencia de lo que ocurre en la CU, la ubicación anatómica de la EC es relativamente estable en el tiempo (Burisch, Munkholm, 2015, Sobczak et al., 2014).

1.1. Epidemiología de la EII

La EII es una patología de alta prevalencia caracterizada por fases alternas de remisión y recaída clínica, no existiendo un tratamiento farmacológico curativo. En la actualidad, el tratamiento clínico de la enfermedad se limita a prolongar los períodos de remisión clínica, por lo que su prevalencia está, en consecuencia, aumentando con el tiempo. Hoy en día, la EII es la segunda enfermedad inflamatoria crónica más común en el mundo, solo por detrás de la artritis reumatoide (Rohr et al., 2018).

La mayor incidencia y prevalencia se encuentra en los países occidentalizados, con alrededor de 3,1 millones de estadounidenses y 2,2 millones de europeos que actualmente sufren de EII (Rohr et al., 2018). Sin embargo, la tasa de incidencia ha

umentado continuamente en el sur de Europa y Asia. La incidencia global de la EII en Asia se estima en menos de 5 por cada 100.000 personas año. En Europa, la incidencia de CU es de 0,6-24,3 por 100.000 personas y la de EC es de 0,3-12,7 por 100.000. En América del Norte, la incidencia anual varía de 0 a 19,2 por 100,000 y de 0 a 20,2 por 100,000 para CU y EC, respectivamente. Desde 1990, la mayoría de los estudios muestran una incidencia estable o decreciente tanto en EC como en CU en países industrializados, mientras que continúa aumentando en países recientemente industrializados. Se ha observado que la incidencia es mayor en las poblaciones urbanas que en las rurales y que existe un gradiente norte-sur en la enfermedad de Crohn, habiendo mayor incidencia en las latitudes del norte que en las latitudes del sur. Podría existir una relación inversa similar en el hemisferio sur, ya que se ha reportado una alta incidencia de EII en Nueva Zelanda.

Atendiendo a la edad al debut de la enfermedad, en la mayoría de los estudios, la incidencia máxima de la EII se encuentra entre la segunda y la cuarta década de la vida. Algunos estudios han sugerido una tasa de incidencia bimodal con un segundo pico entre la sexta y séptima décadas de la vida. Las diferencias en cuanto a la incidencia entre géneros no están claras, y se asume que es similar entre hombres y mujeres; sin embargo si que está influenciada por la raza y el origen étnico, siendo el riesgo más alto en la población judía, especialmente en la residente en Europa y Estados Unidos en comparación con la que reside en Israel, seguida de la población caucásica (Ananthakrishnan, 2015, Molodecky et al., 2012).

1.2. Etiología de la EII

La EII se desarrolla como resultado de una combinación de interacciones complejas entre los factores genéticos del individuo, las alteraciones en la composición de la microbiota intestinal en un nivel cualitativo y cuantitativo, un sistema inmunitario innato y adaptativo desregulado y factores ambientales, como la dieta, los fármacos y el tabaquismo. Hay hipótesis que relacionan la falta de exposición a antígenos a causa de la vida urbana como un factor de riesgo para la enfermedad, de forma similar a como ocurriría en algunas alergias (Wawrzyniak, Scharl, 2018).

1.2.1. Factores genéticos y epigenéticos

El componente genético de la EII se pone de relevancia mediante la observación de la existencia de una coincidencia de entre el 20 y el 50% en la ocurrencia de la EC en gemelos monocigóticos, mientras que en gemelos dicigóticos esta coincidencia es menor del 7%. Por otra parte, la tasa de concordancia de CU en gemelos monocigóticos es de aproximadamente el 16% y en gemelos dicigóticos de alrededor del 4%. Estudios de agregación familiar demuestran que entre un 2% y un 14% de los pacientes de EC, un 7% y un 11% de los pacientes con CU y un 5% y un 16% de los pacientes con EII tienen antecedentes familiares de la enfermedad. Sin embargo, no está claro como el componente genético de la enfermedad afecta al comportamiento de la misma (Halme et al., 2006).

Aún no se conoce bien la relevancia de las alteraciones genéticas y epigenéticas en la patogénesis de la EII. Hasta la fecha se han identificado 240 loci de susceptibilidad mediante estudios de asociación de genoma completo (GWAS). Los genes implicados participan principalmente en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa, así como en el mantenimiento de la función de barrera epitelial intestinal (Wawrzyniak, Scharl, 2018).

Los factores genéticos han sido ampliamente considerados como factores de riesgo importantes para el inicio de la enfermedad inflamatoria intestinal. *NOD2*, que codifica un receptor intracelular de componentes de la pared celular bacteriana, fue el primer locus asociado con la enfermedad de Crohn (Hugot et al., 2001). Los GWAS realizados en los últimos años han identificado una gran cantidad de genes que contribuyen a la susceptibilidad de la EII. La mayoría de los genes identificados muestran un efecto en la misma dirección en EC y CU, pero hay algunas excepciones. Por ejemplo, *NOD2* y *PTPN22* muestran un efecto protector en CU, pero son considerados factores de riesgo en EC. Es interesante el hecho de que muchos loci de riesgo para la EII, como *NOD2*, *CDKAL1*, *PTPN22* o *IRF5* (Vlachos et al., 2016, Bae et al., 2017), se comparten con otras enfermedades inflamatorias autoinmunes o crónicas, como la artritis reumatoide, el lupus sistémico eritematoso, la esclerosis múltiple, la diabetes tipo 1, el vitiligo o la psoriasis. Además, hay loci de riesgo de EII que están asociados con ambas subformas de EII y algunos que solo están asociados con la EC, como *NOD2* o *ATG16L1*, o la CU,

como *HNF4A*, *CDH1*, *LAMB1* o *GNA12* (Ek, D'Amato & Halfvarson, 2014). Algunas variantes genéticas han sido relacionadas con fenotipos concretos de la enfermedad, como por ejemplo, variaciones en los genes asociados con la autofagia, la fagocitosis o la insuficiencia de células de paneth, como *NOD2*, *IRGM*, *ATG16L1* o *NCF4/NCF2* se han relacionado con enfermedad segmentaria de inicio temprano o enfermedad estenosante (Knights, Lassen & Xavier, 2013) o variantes en el gen codificante del receptor de vitamina D, que se han relacionado con un fenotipo fistulizante en la EC (Gisbert-Ferrandiz et al., 2018).

Los microARNs (miARNs) son ARNs de cadena corta no codificantes que modulan post-transcripcionalmente la expresión de los genes a través de la degradación de los ARNs mensajeros (ARNm) objetivo, o la inhibición de sus traducciones. Hay varios miARNs que han sido relacionados con la inmunomodulación y patogénesis de la EII. miR-23a, miR-24, miR-124 miR-143, miR-145, miR-192, miR-422b se encuentran regulados a la baja y miR-16, miR-21, miR-126, miR-195 y Let-7f al alza en CU (Wu et al., 2008, Pekow et al., 2012, Koukos et al., 2013). En EC, un estudio realizado comparando tejido sano y enfermo de pacientes, identificó 28 miARNs diferencialmente expresados, 14 de los cuales estaban sobreexpresados, entre los que destacaban miR-4284, miR-3194 y miR-21, que tienen conocidas interacciones funcionales con mecanismos clave implicados en la EII (Palmieri et al., 2017). Por ejemplo, miR-21 promueve la diferenciación de células Th2 y altera la función de la barrera epitelial (Kalla et al., 2015). Los modelos knock-out miR-21 murinos con colitis inducida por dodecil sulfato de sodio tienen tasas de supervivencia más altas y menos inflamación del tejido que los ratones de tipo salvaje, debido a la regulación de su gen diana *Rhob*, que regula la permeabilidad intestinal (Shi et al., 2013). Además, se ha demostrado que algunos miARNs regulan la expresión esencial de genes relacionados con la autofagia, como *NOD2*, *ATG16L1* o *IRGM*, incluyendo miR-192, miR-122, miR-29 y miR-146a, que se han asociado con un mayor riesgo de desarrollo de la patología (Kalla et al., 2015).

En lo que respecta a los factores epigenéticos, hace ya más de dos décadas que se sugirió su participación en el desarrollo de la EII (Petronis, Petroniene, 2000). Hasta el momento son muchos los estudios que han tratado de establecer relaciones claras entre las alteraciones epigenéticas y la EII. Ya en uno de los primeros estudios realizados

en este tema se demostró que, en comparación con los controles sanos y pacientes con enfermedad inactiva, la mucosa rectal de pacientes con CU activa se caracterizó por una hipometilación global (Gloria et al., 1996). También se han demostrado fenómenos de hipermetilación relacionada con la CU en genes concretos (Issa et al., 2001). Tanto la hipometilación en oncogenes como la hipermetilación en genes supresores de tumor han sido relacionadas con el incremento en la susceptibilidad a sufrir cáncer de colon que tienen los pacientes de CU. Los fenómenos de metilación diferencial también se han encontrado en genes relacionados con la respuesta inmunitaria, como *CFI*, *FLNA*, *HKDC1*, *IGHG1*, *MT1H*, *PTN*, *SLC7A7*, *SPINK4*, *THY1* y *TK1* (Hasler et al., 2012).

1.2.2. Factores ambientales

Aunque el componente genético tiene una gran importancia en el desarrollo de la EII, este no puede explicarla completamente. Son varios los factores ambientales que han sido relacionados con la EII, entre los que destacan la dieta, el tabaquismo y el estrés.

Al igual que en otras patologías como trastornos metabólicos y cardiovasculares o cáncer, en la EII también se produce un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas ERO son principalmente producidas por linfocitos T y B presentes en el intestino para eliminar patógenos, pero tienen otros efectos, como el aumento de la permeabilidad intestinal al dificultar la polimerización del moco.

Debido a las limitaciones en el diseño de estudios epidemiológicos y a la variación interindividual en la microbiota intestinal, todavía no hay una conexión directa entre la dieta y el desarrollo de la EII. Algunos componentes alimentarios como emulsionantes, oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y polioles fermentables han sido asociados con un deterioro de la barrera epitelial en la EC; alimentos que inducen una producción excesiva de óxido nítrico y sulfuro en el lumen del intestino grueso se han relacionado con la CU; y partículas no digeribles o la exposición a varias combinaciones o lípidos individuales con la modulación directa del control de los procesos inflamatorios en la mucosa. Estudios de asociación de una dieta específica con la actividad de la enfermedad han conseguido establecer posibles factores de riesgo, pero hasta el momento no se conoce cuál sería la importancia de cada uno de ellos. Por ejemplo, una

dieta baja en fibra, frutas y verduras o un alto consumo de carne roja, sulfatos y sulfitos, grasas animales o azúcares han sido relacionados con un mayor riesgo de EII y un peor pronóstico (Halmos, Gibson, 2015). La malnutrición es una de las principales complicaciones en los pacientes de EII. Los datos existentes sugieren que afecta a una gran parte de los pacientes con EII, estimada en 65 a 75% de los pacientes con EC y en 18 a 62% de los pacientes con CU. Las causas de esta malnutrición son principalmente dos, una menor ingesta por parte de los pacientes causada por los síntomas de la enfermedad, como náuseas, dolor abdominal, vómito o diarrea y el ayuno a causa de hospitalizaciones o dietas restrictivas prolongadas (Scaldaferri et al., 2017). A causa de esta malnutrición, micronutrientes como la vitamina D pueden escasear. Los niveles más bajos de vitamina D se correlacionan con un mayor riesgo de cirugía en la EC, mientras que los niveles más altos de vitamina D se correlacionan con un menor riesgo de desarrollo de la EII. El zinc y el hierro también se han asociado con la EII debido a que el primero modula las funciones inmunológicas de los macrófagos (MΦ), los neutrófilos y las células asesinas naturales (células NK) al inhibir la ruta NF-κβ y la actividad de la mieloperoxidasa, mientras que el hierro induce la inflamación intestinal debido a la activación de la señalización IL6-IL11-STAT3 y al incremento del estrés oxidativo (Ananthkrishnan, 2015).

Algunos hábitos de vida también han sido relacionados con el desarrollo y curso de la EII. Por ejemplo, la mala calidad del sueño puede alterar la función del sistema inmunológico y tener una influencia en el proceso de inflamación. De hecho, se ha reportado una mayor probabilidad de recurrencia y una mayor severidad de la EII en individuos con trastornos del sueño (Ali et al., 2013, Jarasvaraparn et al., 2018).

El tabaquismo afecta de manera distinta a la CU y a la EC, ya que aumenta el riesgo de desarrollar EC, aunque mejora los síntomas de la CU. Esto se ha explicado por los efectos diferenciales de la nicotina en el intestino delgado y grueso; la nicotina aumenta la actividad de la óxido nítrico sintetasa (NOS) en el intestino delgado, contribuyendo a la formación de ERO, mientras que en el intestino grueso disminuye la actividad de la NOS (Sobczak et al., 2014).

El estrés es un factor importante que puede afectar a la EII, ya que aumenta el nivel de citocinas proinflamatorias, altera la permeabilidad intestinal y la microbiota intestinal y activa MΦ a través de eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal.

1.3. Clasificación

En estos momentos se reconocen varias entidades que se engloban dentro de la EII: colitis ulcerosa (CU), enfermedad de Crohn (EC), colitis inclasificada (CI), colitis microscópica (CM) y reservoritis.

La CU afecta sólo al colon, es una enfermedad predominantemente mucosa, su síntoma fundamental es la rectorragia, y puede clasificarse en dependencia de su extensión (proctitis, colitis izquierda, y colitis extensa) y de su gravedad: silente, leve, moderada, o grave.

La EC puede afectar a cualquier tramo del intestino, aunque su localización más frecuente es el íleon. En este caso se trata de una enfermedad transmural y sus síntomas fundamentales son la diarrea y/o el dolor abdominal. Su clasificación debe realizarse en orden a su localización (ileocólica, ileal, cólica, perianal, o de otras localizaciones), a su patrón clínico (inflamatorio, estenosante o fistulizante), y a su gravedad (leve, moderada, grave). La clasificación de Montreal se ha generalizado y aceptado en los consensos internacionales (**Tabla I. 1**).

La CI es una entidad inflamatoria del colon que no puede llegar a clasificarse claramente como CU o EC. Representa alrededor del 10% de los casos de afección inflamatoria crónica idiopática.

La CM engloba un grupo de trastornos histopatológicamente diferentes, y probablemente muy comunes (colitis linfocítica, colitis colágena), pero que afectan a la mucosa, causando diarrea crónica.

La reservoritis es una entidad mucosa, inflamatoria, que afecta aproximadamente al 30-50% de los reservorios ileales que se crean artificialmente para mantener la función esfinteriana después de una colectomía total con anastomosis ileoanal para el tratamiento de la EII, especialmente de la CU y con menor frecuencia de la EC y la CI (Gomollón, Sans, 2012).

Edad al diagnóstico (A)
A1 16 años o menos A2 17-40 años A3 >40
Localización (L)
L1 Íleon terminal L2 Colon L3 Ileocolónica L4 Tracto digestivo superior
Patrón clínico (B)
B1 No estenosante, no fistulizante, o inflamatorio B2 Estenosante B3 Fistulizante
Existencia de enfermedad perianal
P Perianal (se añade a cualquiera de las anteriores si hay enfermedad perianal)

Tabla 1. 1 Clasificación de Montreal para la Enfermedad de Crohn

2. Etiopatogenia de la EII

En la EII se observa una alteración de la barrera epitelial, así como alteraciones en la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa. Se produce una penetración del contenido luminal en los tejidos subyacentes, que puede ser facilitada por factores ambientales o alteraciones de la barrera mucosa, así como una alteración de la depuración de todo el material extraño de la pared intestinal, probablemente debido a defectos en la secreción de citocinas proinflamatorias por parte de los MΦ. Todo ello desencadena la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa, produciendo una respuesta inflamatoria crónica y causando las lesiones características de la EII.

2.1. DISRUPCIÓN DE LA BARRERA EPITELIAL

La estrecha barrera que separa la microbiota intestinal comensal de los tejidos internos del individuo está biológicamente preparada para evitar respuestas inespecíficas contra estos microorganismos. Sin embargo, ante un daño en esta barrera, existen mecanismos de defensa contra posibles microorganismos patógenos que pueden dañar al hospedador.

2.1.1. Microbiota intestinal

La compleja comunidad microbiana que se encuentra en el tracto intestinal está compuesta principalmente por bacterias, pero también incluye algunos eucariotas, virus y arqueas. La colonización de nuestro sistema digestivo comienza inmediatamente tras el parto. La luz intestinal, hasta entonces completamente estéril, llega a albergar hasta mil especies diferentes y aproximadamente 10^{14} organismos bacterianos, con un peso total de 1 - 2 kg. El estómago, el duodeno y el yeyuno muestran una tasa de colonización relativamente baja, ya que, en estas regiones, muchos microorganismos son eliminados por los ácidos gástricos y biliares. A una mayor distancia del estómago, el pH es menos ácido, aumentando el número de bacterias. En el íleon, por ejemplo, se encuentran grandes cantidades de bacterias aeróbicas y anaeróbicas, como *Enterobacter* y *Lactobacilli*. La región más densamente poblada del tracto gastrointestinal es el colon, con un número de hasta 10^{12} bacterias por gramo de contenido intestinal, con predominio de grupos anaeróbicos como *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Fusobacteria*, *Clostridia* y *Peptostreptococci*. La mayoría de las bacterias intestinales pertenecen a los filos *Bacteriodesetes* o *Firmicutes*, pero la composición de la microbiota varía localmente y está modulada por las defensas inmunitarias del individuo, aspectos ambientales como el estilo de vida y la dieta y por la propia genética del huésped.

La microbiota intestinal mantiene una relación mutualista con el huésped. Las bacterias intestinales disfrutan de un hábitat idealmente templado y un suministro constante de nutrientes, mientras que el organismo humano también recibe beneficios valiosos, por ejemplo, la descomposición de componentes nutricionales indigestibles o la síntesis de ciertas vitaminas. Ciertos microorganismos tienen la capacidad de afectar a la proliferación y regeneración del epitelio intestinal. Además, se ha demostrado que la microbiota es importante en el desarrollo del sistema inmunitario intestinal y en la protección del hospedador contra la colonización por gérmenes patógenos (Stedman, Nigro & Sansonetti, 2016). La microbiota comensal, ya sea de manera incidental o específica, juega un papel importante o incluso central en la aparición de diversas enfermedades, como la EII y el cáncer de colon. La coexistencia no problemática de las bacterias intestinales y su hospedador depende de la integridad de la barrera epitelial (Weingarden, Vaughn, 2017).

2.1.2. La barrera epitelial

El epitelio intestinal está formado por una monocapa de células organizadas en criptas y vellosidades que forman la mayor superficie de todo el cuerpo humano, entre 300 y 400 m². Tiene una gran capacidad de renovación debido a la presencia de células madre epiteliales intestinales que se localizan en la base de las criptas, capaces de generar todos los tipos celulares que conforman esta barrera epitelial.

Este epitelio está compuesto por varios tipos de células diferentes, de las cuales, entre el 90% y el 95%, son enterocitos. Tres de los tipos celulares restantes son células secretoras e incluyen células caliciformes o células productoras de moco, células enteroendocrinas productoras de hormonas y células de Paneth, que normalmente están restringidas al intestino delgado y están especializadas en la síntesis de péptidos antimicrobianos (α -defensinas, β -defensinas y catelicidinas). En la EC se observa un defecto en la expresión de estos péptidos antimicrobianos (Coskun, 2014). Las células M (o células microplegadas), forman parte del epitelio asociado a las placas de Peyer y son las responsables de transportar antígenos lumbinales a las células inmunitarias subyacentes.

El epitelio intestinal forma una barrera selectiva que proporciona una protección eficaz contra toxinas, antígenos y microorganismos lumbinales al mismo tiempo que permite la absorción de nutrientes, electrolitos y agua. Las células que forman este epitelio están unidas entre sí mediante uniones estrechas y, por lo tanto, forman un escudo físico efectivo contra el contenido luminal potencialmente dañino. Además, dentro del tejido epitelial, las células caliciformes secretan componentes formadores de moco, el cual crea una película protectora que cubre el epitelio del tracto intestinal, el moco, que junto con los péptidos antimicrobianos generados por las células de Paneth, forma parte del sistema de defensa multicapa de la barrera epitelial. Además, el epitelio interactúa con las células linfoides y presentadoras de antígenos y puede desempeñar un papel activo en la promoción de reacciones inmunitarias adaptativas. Se han observado alteraciones en las proteínas que forman las uniones estrechas intestinales en pacientes con EII. La permeabilidad regulada por uniones estrechas también se ve incrementada por las citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa

(TNF- α) y el interferón- γ (IFN- γ), que tanto en EC como en CU pueden llegar a producir daño epitelial y ulceraciones (Coskun, 2014).

Varios tipos celulares, incluidas las células epiteliales, los monocitos y las células dendríticas (CD), tienen detectores microbianos innatos, llamados receptores de reconocimiento de patrones (PRR): TLR (receptores tipo Toll), receptores tipo NOD (NLR), receptores de repeticiones ricas en leucina (LRR-Rs), receptores de lectina tipo C (CRLs) y receptores similares al gen 1 inducible por ácido retinoico (RLRs). Estos receptores son cruciales para monitorizar los microbios intestinales y, en caso de necesidad, pueden inducir estrategias de defensa apropiadas. Los PRRs reconocen diferentes patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP), como lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano, muramil dipeptido (MDP), ácidos lipoteicoicos y ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano. La activación de estos receptores induce mecanismos de defensa que estimulan la producción de citocinas y quimiocinas que desencadenan la respuesta inmunitaria y la producción de péptidos antimicrobianos y moco. Entre los PRRs, el receptor NOD2, que reconoce el MDP, es probablemente el gen más conocido que se asocia con la EC (Pastorelli et al., 2013).

2.2. RESPUESTA INFLAMATORIA

El debilitamiento de los mecanismos de defensa provoca un incremento de la permeabilidad intestinal, aumentando la probabilidad de interacción entre el sistema inmunitario y la microbiota intestinal. La persistencia de este fenómeno en el tiempo produce una pérdida de tolerancia a esta microbiota, induciendo la activación y perpetuación de la respuesta inmunitaria, lo que lleva a una inflamación intestinal crónica, que provoca la aparición de complicaciones intestinales asociadas con pacientes con EII, como la fibrosis, estenosis, fístula y cáncer (Neurath, 2014).

2.2.1. Respuesta inmunitaria innata

La respuesta inmunitaria innata está principalmente mediada por dos tipos celulares, los M Φ intestinales y las CD. Estas células se encuentran asociadas al tejido linfoide del intestino, que se localiza en la lámina propia (LP), estando idealmente situadas en la interfaz del huésped y el entorno luminal entérico, pudiendo así generar

respuestas rápidas contra microorganismos y otros estímulos potenciales. Estas células expresan PRRs a través de los cuales reconocen las bacterias patógenas. Los mecanismos por los cuales el huésped distingue las bacterias comensales de las patógenas no están bien definidos y representan una brecha fundamental en la comprensión de la función inmunitaria en homeostasis y en la EII. El reconocimiento de PAMPs por PRRs en MΦ intestinales y CD conduce a la eliminación eficiente de estímulos potencialmente dañinos sin generar una respuesta inmunitaria específica. Esta característica es exclusiva de los MΦ y CD residentes del tejido intestinal. Para ello, las CD α_E integrina (CD103) positivas, en presencia del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) transportan los antígenos vía tejido linfoide al tejido linfoide secundario, donde células T primarias generan una respuesta tolerogénica frente a ese antígeno. La captación de antígenos por parte de las CD puede darse directamente, cuando estos atraviesan las uniones estrechas del epitelio, o indirectamente, a través de las células M y caliciformes. Cuando este mecanismo falla se produce una reacción inflamatoria que, en caso de cronificarse, puede llevar al desarrollo de EII. Las CD presentes en la LP tienen una capacidad de respuesta limitada en estado basal, pues presentan una baja expresión de PRRs y moléculas coestimuladoras, mientras que expresan grandes cantidades de IL10. No obstante, en pacientes de EII la expresión de PRRs por parte de las CD se ve incrementada, así como la de su marcador de activación CD40 (Kmiec, Cyman & Slebioda, 2017, Steinbach, Plevy, 2014).

Los MΦ residentes de la LP demuestran atributos distintos de las poblaciones de monocitos periféricos. Mientras que los MΦ de la LP mantienen funciones efectoras microbidas, no producen mediadores inflamatorios al encontrarse con estímulos microbianos. Además, estos MΦ promueven la transición de respuestas inflamatorias protectoras a respuestas antiinflamatorias, por lo que son esenciales para mantener la homeostasis intestinal. A diferencia de las CD, los MΦ no migran al tejido linfoide; sin embargo, pueden regular la respuesta adaptativa debido a la presentación de antígenos a las células T *in situ* en la LP. Estos MΦ residentes se caracterizan por tener una baja expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40 además de una baja expresión de PRRs y, al igual que las CD, tienen una alta expresión de IL10.

En condiciones inflamatorias, los monocitos son reclutados desde la sangre. Una vez en el tejido, estos monocitos se diferencian a MΦ y expresan altos niveles de TLRs, receptores coestimuladores e inflamatorios y producen grandes cantidades de citocinas proinflamatorias. Los MΦ inflamatorios en el intestino murino derivan de los monocitos Ly6C⁺; CCR2 es esencial para el reclutamiento de estos monocitos Ly6C⁺ en los sitios de inflamación y, en un contexto inflamatorio, estos monocitos aumentan la expresión de TLR2 y NOD2, lo que sugiere un aumento de la respuesta contra la microbiota y productos bacterianos.

La distinción entre CD y MΦ puede ser complicada, aunque hay ciertos marcadores que pueden ser usados con este fin. Las CD intestinales murinas pueden identificarse como CD11c^{alto} MHC-II⁺ CXCR1⁻ F4/80⁻ CD64⁻, habiendo varias subpoblaciones que se caracterizan por una expresión diferencial de CD11b, CD103 y CD8α, mientras que los MΦ se identifican como F4/80⁺ CD64⁺ CD68⁺ CXCR1⁺. En humanos, las CD pueden ser distinguidas de los MΦ en base a la expresión de CD64, que únicamente se expresa en macrófagos (Mann, Li, 2014, Bernardo et al., 2018).

2.2.2. Polarización macrofágica

Los MΦ son células plásticas, ya que cumplen una gran variedad de funciones y, por tanto, su fenotipo varía enormemente dependiendo del ambiente en el que se encuentren. Son una población muy heterogénea de células que demuestran un continuo de estados de activación. El amplio espectro de fenotipos macrofágicos a menudo se simplifica en dos grupos funcionales: MΦ inflamatorios o clásicamente activados y MΦ regeneradores de tejido o alternativamente activados, a los que habría que añadir un tercer subconjunto de MΦ productores de altos niveles de IL10 que se conoce como MΦ reguladores. El proceso de diferenciación de un MΦ a uno u otro subtipo se conoce como polarización macrofágica.

La polarización macrofágica hacia el fenotipo proinflamatorio depende de la presencia de IFN-γ producido por las células NK y T ayudantes (Th) 1, TNF-α producido por los granulocitos u otras células presentadoras de antígeno y la activación de los PRRs por los PAMPs. Esta polarización depende de los activadores transcripcionales transductor de señal y activador de la transcripción 1 (STAT1) y factor de activación del

interferón 5 (IRF5). Los MΦ proinflamatorios son un subtipo de MΦ especializado en la respuesta inflamatoria aguda. Estos MΦ producen citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL1, IL6, IL12 e IL23), ERO y especies reactivas de nitrógeno con el fin de combatir infecciones bacterianas. La producción de estos mediadores promueve la diferenciación y activación de las células Th1 y Th17 y la respuesta Th1 ayuda a su vez a los MΦ a mejorar su capacidad para eliminar patógenos intracelulares. Si bien los MΦ proinflamatorios son esenciales para la erradicación de las infecciones intracelulares, también producen citocinas proinflamatorias implicadas en la patogénesis de la EII (Juhas et al., 2015).

Los MΦ se polarizan al fenotipo regenerador por la IL4 o IL13 producida por los granulocitos o por las células Th2 en respuesta a la lesión tisular y activación por algunos hongos y parásitos, así como por el inicio de la señalización de SOCS2. La exposición de los MΦ a IL10 también los predispone a la polarización hacia el fenotipo regenerador, ya que incrementa la expresión de IL4R, haciéndolos más sensibles a IL4 e IL13 (Murray, 2017). Estos MΦ producen metaloproteasas de matriz (MMPs), factores de crecimiento y fagocitan restos tisulares sin producir citocinas proinflamatorias. Las respuestas Th2 están dirigidas a inducir la curación de heridas y eliminar parásitos. Los MΦ regeneradores también son eficientes en el reclutamiento de células T reguladoras Foxp3+ (Treg), que regularían aún más las respuestas inmunitarias locales. La actividad de MΦ regeneradores no regulados puede promover el desarrollo de lesiones fibróticas a través de la secreción de TGF β e incrementar respuestas autoinmunitarias. La polarización hacia el fenotipo regenerador requiere del activador transcripcional STAT6, así como de los factores de transcripción que controlan la expresión genética específica de este fenotipo: IRF4, JMJD3, receptor del activador del proliferador de peroxisoma (PPAR- δ y PPAR- γ). Pueden distinguirse tres subpoblaciones de células entre los MΦ alternativamente activados. IL4 y/o IL13 inducen el desarrollo de MΦ regeneradores. Los complejos inmunoestimulantes de los receptores de TLR conducen al desarrollo de MΦ inmunoreguladores. Sin embargo, cuando se exponen a un estímulo antiinflamatorio como los glucocorticoides, IL10 o TGF β , se diferencian en la subpoblación de MΦ antiinflamatorios (Juhas et al., 2015).

La polarización hacia MΦ reguladores se da en respuesta a una amplia gama de señales, que incluyen complejos inmunes de IgG, IL10, prostaglandinas y células apoptóticas. Los MΦ reguladores difieren de los MΦ alternativamente activados en que no producen componentes de la matriz extracelular (MEC), pero expresan altos niveles de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) necesarias para la activación de las células T. Al igual que los MΦ alternativamente activados, los MΦ reguladores producen altas cantidades de la citocina antiinflamatoria IL10 y pueden hacer que el huésped sea más susceptible a ciertas infecciones (Steinbach, Plevy, 2014).

Los distintos fenotipos macrofágicos tienen un papel durante la reparación de tejidos tras un daño. Los MΦ proinflamatorios se observan durante la respuesta aguda al trauma y liberan altos niveles de ERO. A través del aumento de la fagocitosis y la liberación de citocinas proinflamatorias, estos MΦ facilitan la inmunidad innata para eliminar los microorganismos extraños y los restos de tejido en el sitio de la lesión. En una segunda fase de regeneración tisular y remisión de la inflamación aparecen los MΦ regeneradores. Los MΦ regeneradores exhiben propiedades de reparación tisular, muestran una producción atenuada de citocinas proinflamatorias y tienen menor producción de ERO. También secretan citocinas inmunosupresoras (por ejemplo, IL10), quimiocinas que atraen leucocitos antiinflamatorios, aumentan los receptores fagocíticos y aumentan la regulación de los componentes de la MEC y factores de crecimiento. Estos mediadores permiten que los MΦ regeneradores sintonicen las respuestas inflamatorias, eliminen residuos y promuevan la remodelación y reparación de tejidos. Una vez el tejido ha sido reparado, algunos de los MΦ infiltrados adquieren características de MΦ residentes, otros abandonan el tejido y la mayoría de ellos mueren por apoptosis. En conjunto, esta respuesta secuencial de MΦ proinflamatorios-regeneradores resulta en una regeneración exitosa del daño tisular (Gensel, Zhang, 2015).

La polarización de los MΦ puede ocurrir en cualquier punto del proceso inflamatorio. Por ejemplo, la presencia coincidente de IL4 e IFN-γ podría inclinar la polarización hacia macrófagos reparadores o proinflamatorios, respectivamente, dependiendo de la cantidad de citocinas, el tiempo de exposición y la competencia por las mismas. Es importante enfatizar la dependencia del tiempo para resolver la

inflamación. En algunos casos, el reclutamiento, la reparación y la resolución son rápidos (de minutos a unos pocos días) para daños menores, mientras que cuando se produce una respuesta mayoritaria Th2, se induce una polarización mayoritaria hacia MΦ alternativamente activados, dificultando la eliminación del tejido dañado y posibles agentes patógenos y cronificando el estado inflamatorio (Murray, 2017).

2.2.3. Respuesta inmunitaria adaptativa

Los linfocitos son las principales células responsables de la respuesta inmunitaria adaptativa. Como se describió anteriormente, en condiciones normales en el intestino, las células presentadoras de antígenos (CD y MΦ) generan una respuesta tolerogénica a través de la activación de linfocitos Th. Estos linfocitos activan a su vez las células Treg, que migran al intestino donde impiden que se produzca una respuesta específica contra los antígenos muestreados.

En condiciones de daño tisular e inflamación, esto cambia drásticamente. En relación con la inmunidad de la EII, los mediadores clave de la estimulación intestinal son la integrina $\alpha 4\beta 7$ expresada por los linfocitos que colonizan el tejido linfoide gastrointestinal, y la molécula de adhesión MAdCAM-1 (del inglés *mucosal addressin-cell adhesion molecule 1*) presente en el endotelio de las vénulas intestinales. Uno de los pasos principales en el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa consiste en la activación de los linfocitos Th (Th1, Th2, Th17 y Th22) y la supresión de la actividad de las células Treg. Esto está coordinado por la migración de las CD a las áreas linfoides periféricas para activar los linfocitos T *naive*. Tras su activación, estas células proliferan y se convierten en células T de memoria y efectoras que entran en la circulación para migrar hacia el sitio inicial de unión del antígeno a las CD. Esta migración está mediada por quimiocinas secretadas por las CD intestinales. Tradicionalmente, se pensaba que la EC era una enfermedad mediada por Th1, mientras que la activación de las células Th2 se asociaba más comúnmente con la CU, sin embargo, más recientemente se ha reconocido una superposición significativa entre las dos vías, junto con el papel contributivo de las células Th9, Th17, Th22, y células Treg.

Se cree que las células Th1 se activan predominantemente por la presentación de antígenos de especies microbianas, incluidas bacterias, virus y hongos, que inducen

la liberación de IFN- γ e IL12, que activa STAT1, lo que conduce además a la activación del factor de transcripción T- β . Las citocinas características secretadas por las células Th1 activadas son, IFN- γ , IL12 y TNF- α . La activación de las células Th2 es inducida predominantemente por la secreción de IL4, que conduce a la activación de STAT6, y la activación adicional del factor de transcripción GATA-3. Las citocinas características liberadas por activación de las células Th2 son IL4, IL5, IL13, IL21 e IL25. Se cree que la inducción de la vía Th17 ocurre en ausencia de IL4 e IL12, y la presencia de IL6, IL23 y TGF β que, mediada por la activación de STAT3, conduce a la secreción de IL17 e IL22. Th22 requiere la activación mediada por IL6 y TNF- α de la vía STAT3, lo que conduce a la secreción de IL22, IL13, TNF- α , factor de crecimiento de fibroblastos (FCF) y quimiocinas. El papel de las células Treg es controlar la inflamación crónica al suprimir la respuesta inmunitaria al disminuir la expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y promover la tolerancia a los estimulantes inflamatorios. La expresión del factor de transcripción Fox3p es crítica para el desarrollo y la función de las células Treg, que son inducidas por altos niveles de TGF β . En la EII se observa una ausencia de Treg, que contribuye al desarrollo de una respuesta inmunitaria hacia las bacterias comensales. Por lo tanto, debido a una pérdida de esa tolerancia, la inflamación se perpetúa hasta que se vuelve crónica (Holleran et al., 2017).

Existe una población de linfocitos T que está en contacto directo con las células epiteliales intestinales. Se conocen como linfocitos intraepiteliales y tienen una función esencial en el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Estas células, en respuesta a una infección, secretan IFN- γ y TNF para combatir los microorganismos patógenos y desencadenar la respuesta inflamatoria. A su vez, tras un daño en la barrera intestinal, generan factores de crecimiento necesarios para la reparación del tejido dañado (Olivares-Villagomez, Van Kaer, 2018).

Los linfocitos B también tienen un papel importante en la respuesta inmunitaria adaptativa y dependiendo de las señales que están presentes en la mucosa, son capaces de expresar citocinas proinflamatorias o antiinflamatorias. Existe un subconjunto específico de células B que regula las respuestas autorreactivas a través de la producción de IL10, los linfocitos B reguladores. Estas células también se han visto implicadas en la patogénesis de la EII, observándose que la frecuencia de células B CD19^{alto} CD1d^{alto}

productoras de IL10 se encuentra reducida en pacientes con EC, y que este subconjunto de células podría reducir la inflamación intestinal en colitis de una manera independiente de Treg. Las células plasmáticas CD138+ también juegan un papel en esta supresión de la inflamación a través de la producción de IL35 (Sun et al., 2015). Estas células plasmáticas, generan y liberan anticuerpos (IgA e IgM) como defensa. Se ha observado una producción de IgA reducida en pacientes con EII, mientras que la producción de IgG se encuentra incrementada (Gerner, Moschen & Tilg, 2013).

2.3. Defectos en la regeneración mucosa

En condiciones normales, tras un daño en la barrera epitelial, las células epiteliales intestinales que rodean la zona dañada pierden su polaridad y migran hacia la zona dañada. Este proceso, conocido como restitución epitelial, comienza apenas unos minutos tras el daño tisular y es un paso esencial para la regeneración mucosa. Este proceso es independiente de la proliferación epitelial y está regulado por citocinas como el TGF α , el factor de crecimiento epitelial (EGF), IL1 β e IFN- γ , que incrementan la producción de TGF β en las células epiteliales. Los cambios estructurales del citoesqueleto de actina necesarios para que se produzca esta migración están modulados por la quimiocinas CXCR4 y CXCL12. Además, CCL20 y la β -defensina 2 favorecen la restitución epitelial induciendo migración sin inducir proliferación (Neurath, 2014).

Todos los tipos de células epiteliales surgen de células madre adultas LGR5+ que se encuentran en el fondo de las criptas intestinales y proliferan constantemente. De este modo, mantienen su reserva mientras generan células precursoras, que continúan dividiéndose antes de diferenciarse en los diferentes linajes celulares. Las células en maduración migran hacia la parte luminal de la cripta y están sujetas a un control del proceso de diferenciación dirigido por múltiples vías de señalización (Wnt, Notch, BMP y EGF). Solo los precursores de células de Paneth permanecen en la base de la cripta para madurar. Durante el proceso de diferenciación, primero se determina si una célula se compromete con el linaje secretor o el linaje absortivo antes de que se produzca la maduración en los diferentes tipos de células. En última instancia, las células que mueren son repuestas continuamente por células recién generadas. La proliferación, diferenciación, migración celular y apoptosis están sujetas a una homeostasis

estrechamente regulada. Esta renovación continua debe regularse para evitar un crecimiento descontrolado, que puede causar hiperplasia intestinal, un proceso inflamatorio o incluso cáncer. Varios estímulos, como los factores de crecimiento y las proteínas solubles, son capaces de inducir la proliferación epitelial y la diferenciación de las células epiteliales intestinales.

Tanto la ruta Wnt como la ruta Notch son cruciales para mantener la zona proliferativa en la cripta. Ambas vías de señalización están altamente controladas en el mundo animal y regulan la determinación de células precursoras, no solo en el intestino.

La ruta Wnt dependiente de β -catenina, que es esencial para la proliferación de células madre, por ejemplo, también es indispensable para la maduración y el funcionamiento de las células de Paneth por medio de la activación de su gen diana Sox9 (Qi, Chen, 2015). En consecuencia, la célula de Paneth es el principal tipo celular que requiere de ligandos Wnt para su maduración en el epitelio intestinal. Además, la neurogenina-3 es importante para el desarrollo del linaje enteroendocrino (Wang et al., 2006); sin embargo, muchos otros factores controlan la especificación detallada de los tipos de células productoras de hormonas individuales. Con respecto a la maduración de las células caliciformes productoras de moco, el factor de transcripción Kruppel-like (Klf) 4 tiene un papel importante (Yu et al., 2012).

El proceso de diferenciación tiene lugar tanto durante el desarrollo embrionario como en el organismo adulto y un bloqueo de las vías de señalización subyacentes dentro del epitelio intestinal conlleva graves cambios perjudiciales. Una inhibición de la cascada de señalización de Wnt, por ejemplo, resulta en una pérdida de la zona proliferativa, signos de inflamación y degeneración general de la arquitectura epitelial intestinal. El bloqueo de la vía Notch tiene consecuencias similares de gran alcance para la capacidad proliferativa de las criptas intestinales. La desregulación de cualquiera de las redes de señalización puede causar defectos dentro de la proliferación epitelial y, por lo tanto, promover el debilitamiento de la barrera intestinal y posteriormente disminuir el desarrollo de trastornos intestinales.

En la EII, el ambiente de la barrera epitelial cambia dramáticamente entre la condición normal e inflamada. En condiciones normales, los antígenos luminales están

separados de la submucosa por la barrera epitelial, mientras que, en la mucosa inflamada, la protección de esta barrera se pierde y en consecuencia permite el acceso libre de antígenos lumbinales a la submucosa hasta que se completa la restitución. Estos antígenos lumbinales pueden por tanto activar la respuesta inflamatoria por parte de las diferentes células inmunitarias. Las células epiteliales que permanecen en el área inflamada están por tanto expuestas a antígenos lumbinales y citocinas proinflamatorias, pudiendo alterar los sistemas de regeneración mucosa que se dan en homeostasis (Okamoto, Watanabe, 2016).

3. Fibrosis en la EII

La fibrosis intestinal es una complicación frecuente de la EII que se vuelve clínicamente evidente en más del 30% de los pacientes con EC y en aproximadamente el 5% con CU. La fibrosis se asocia con inflamación local crónica y se caracteriza por un depósito excesivo de proteínas en la MEC. El equilibrio existente entre la producción y la degradación de éstas proteínas puede verse afectado por una interacción compleja y dinámica entre mediadores profibróticos y antifibróticos. A pesar de los importantes avances terapéuticos de la última década en el tratamiento de la inflamación activa, la incidencia de las estenosis intestinales en EC no se ha modificado, por lo que parece que la inflamación desempeña un papel menor en su progresión, ya que los tratamientos antiinflamatorios en la EII no previenen la fibrosis una vez que ha comenzado. Por lo tanto, los procesos que regulan la fibrosis parecen ser distintos de los que regulan la inflamación (Latella et al., 2015).

3.1. Mediadores celulares de la fibrosis

En condiciones normales, tras el daño epitelial y endotelial, se liberan factores quimiotácticos que promueven el reclutamiento y la activación de células de la inmunidad innata y adaptativa, así como de células mesenquimales precursoras de los miofibroblastos activados que secretan proteínas de la MEC y factores profibróticos. Tras la reparación del tejido dañado, el exceso de MEC se degrada por las MMPs y los miofibroblastos mueren por apoptosis o vuelven a un estado no activado. La cronicidad y recurrencia de las lesiones epiteliales mantiene activo el sistema inmunitario innato y adaptativo, que promueve fibrogénesis a través de la diferenciación, reclutamiento, proliferación y activación de progenitores de miofibroblastos productores de MEC.

La fibrosis intestinal se caracteriza por un depósito anormal de MEC producida por los miofibroblastos activados, que es en última instancia responsable del aumento de la rigidez tisular y la disfunción progresiva de los órganos (Lawrance et al., 2017).

3.1.1. Células del sistema inmunitario innato y adaptativo

Las células del sistema inmunitario generan una gran cantidad de factores proinflamatorios y profibróticos, además de poder provocar la activación y transdiferenciación de los miofibroblastos.

Tanto los MΦ como las CD, regulan la activación del miofibroblasto y de sus progenitores mediante efectos directos en la MEC. El reclutamiento de distintos subconjuntos funcionales de MΦ, y sus concentraciones relativas durante la lesión determinan si la respuesta inflamatoria conduce a la reparación del tejido o a la fibrosis. Los MΦ proinflamatorios activan los miofibroblastos y la fibrosis por mecanismos dependientes e independientes de las citocinas, y las ERO. Causan lesiones tisulares adicionales y promueven la resistencia de los miofibroblastos a la apoptosis. La producción de TNF-α participa en la activación de los miofibroblastos como parte de la respuesta normal de cicatrización de heridas, pero también se vincula a la inflamación persistente con la fibrosis (Valatas et al., 2017). Los MΦ reparadores producen factores antiinflamatorios y profibróticos cruciales que incluyen IL4, IL13, IL10, TGFβ1, factor de crecimiento del tejido conectivo (FCTC), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), FCF y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). Los MΦ reguladores (Mreg) son antifibróticos y actúan, en parte, a través de la inhibición de STAT1 y NF-κB. Estos MΦ inactivan los miofibroblastos e inhiben los MΦ de tipo proinflamatorio y reparador a través de la producción local de IL10 y/o Arginasa-1. Los MΦ también pueden cambiar el fenotipo y función a medida que progresa la reparación del tejido o fibrosis, aunque los factores precisos que regulan estas transiciones *in vivo* no están bien definidos.

Los neutrófilos son las primeras células en llegar al tejido tras un daño y su función es eliminar restos de tejido y matar a los microorganismos invasores. Si los neutrófilos inflamatorios no se eliminan, pueden exacerbar el daño tisular y promover la activación de miofibroblastos a través de la liberación de citocinas profibróticas,

quimiocinas y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Los mastocitos y los eosinófilos promueven la fibrosis al reclutar leucocitos inflamatorios y al producir mediadores profibróticos como el TGF β 1 y la IL13. Los basófilos tienen un papel menos claro en el desarrollo de la fibrosis, aunque pueden ser una fuente de citocinas (Lawrance et al., 2017).

Las células adaptativas incluyen subconjuntos de células Th (Th1, Th2, Th17), Tregs y células B. La respuesta inmunitaria de tipo Th17 es proinflamatoria y profibrótica. En fibroblastos obtenidos de pacientes de EC con un fenotipo B2, se encuentran niveles elevados de IL17A, MMP3, MMP12 y TIMP1. IL7 puede estar regulando esta fibrosis a través de la activación de TGF β y el FCTC (Valatas et al., 2017). La inmunidad de tipo Th2, definida por la producción de IL4, 5 y 13, también es potencialmente fibrogénica, siendo la IL13 el mediador profibrogénico dominante, ya que estimula la producción de colágeno en los miofibroblastos. Por el contrario, la respuesta inmunitaria de tipo Th1 caracterizada por la expresión de IFN- γ puede tener actividad antifibrótica. El papel de las Treg en la fibrogénesis está menos claro, aunque podría suprimir la fibrosis inducida por Th17 y Th2 (Lawrance et al., 2017).

3.1.2. Miofibroblastos y sus precursores mesenquimales

La producción de MEC depende del estado de activación de los miofibroblastos, cuya activación y proliferación por mediadores inflamatorios y profibróticos es un evento central en el proceso de curación normal de heridas después de una lesión aguda. Tras la resolución de una inflamación aguda, el proceso de curación se termina gradualmente y el tejido conectivo adquiere su arquitectura inicial. En el caso de la EII, la inflamación continua y persistente conduce a una activación y proliferación sostenidas de los miofibroblastos productores de MEC (Valatas et al., 2017).

Los miofibroblastos se originan de una variedad de fuentes, incluyendo las células mesenquimales residentes, como los fibroblastos, los miofibroblastos subepiteliales y las células del músculo liso. Además, también pueden proceder de la desdiferenciación de las células epiteliales por la transición epitelial a mesenquimal (TEM) y de células endoteliales a través de la transición endotelial a mesenquimal (endoMT), de células estrelladas, pericitos y células madre de la médula ósea. No está

clara la contribución relativa que cada fuente celular aporta a la población final de miofibroblastos activados en el tejido fibrótico ni si su contribución final al proceso fibrótico depende de su origen.

Los fibroblastos (Vimentina+, Actina de musculo liso- (α SMA), Desmina-) son el principal componente celular del tejido mesenquimal intestinal. La diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos productores de MEC está controlada por las acciones combinadas de IL1 β , TGF β 1 y por la tensión mecánica del tejido. El aumento de la rigidez tisular provoca una tensión mecánica que exacerba la lesión tisular y promueve la expresión local de α SMA por los fibroblastos. El estrés mecánico también induce TEM a través de los mecanismos impulsados por TGF β 1, Wnt- β -catenina y ácido hialurónico. Los fibroblastos intestinales son, por lo tanto, las principales células efectoras de la fibrosis gastrointestinal y la reparación de tejidos.

Los miofibroblastos (vimentina+, α SMA+, desmina-) son células altamente contráctiles que exhiben un fenotipo "híbrido" entre fibroblastos y células de músculo liso y que, cuando se activan, sintetizan altos niveles de MEC. Son células fundamentales para la cicatrización de heridas. En el intestino hay dos tipos de miofibroblastos, los miofibroblastos subepiteliales intestinales (SEMF), que se localizan principalmente en la base de la cripta intestinal en la LP y las células intersticiales de Cajal (ICC), ubicadas en la submucosa y la musculatura propia en asociación con la capa de músculo liso. Los mediadores que promueven la proliferación de miofibroblastos y la producción de MEC son numerosos, incluidos PDGF, EGF, IGF-1 y 2, FGF, IL1, IL13, factor de células madre, endotelinas (ET-1, -2, -3), angiotensina II, TGF α , TGF β , FGF-b y PPAR- γ . Son estos miofibroblastos activados los que resultan fundamentales para la fibrosis.

Las señales que pueden desencadenar la conversión de otros tipos celulares en miofibroblastos activados son diversas, como señales paracrinas, factores autocrinos, PAMPs y productos derivados de células lesionadas, los llamados patrones moleculares asociados al daño (DAMP), que incluyen ADN, ácido ribonucleico (ARN), ATP, HMGB, microvesículas y fragmentos de moléculas de MEC. Durante la TEM y la endoMT, las células epiteliales/endoteliales asumen una morfología en forma de huso, pierden sus marcadores celulares clásicos y ganan marcadores de fibroblastos o miofibroblastos.

Esta transición está inducida por citocinas como IGF-1 y 2, EGF, FGF-2, IL1 β y TNF- α así como por componentes de la MEC, como la fibronectina y la fibrina. Otras señales como las ERO también inducen la TEM, mientras que algunas otras como el factor de crecimiento de los hepatocitos (HGF) o la proteína morfogenética ósea-7 (BMP-7) antagonizan esta transformación celular (Lawrance et al., 2017). Se ha demostrado la presencia de moléculas asociadas a la TEM en lesiones fibróticas de pacientes con EC, como el factor de transcripción SLUG y la proteína de activación de fibroblastos (FAP), así como una mayor localización nuclear de la β -catenina, dejando de estar esa proteína anclada a la membrana (Scharl et al., 2015).

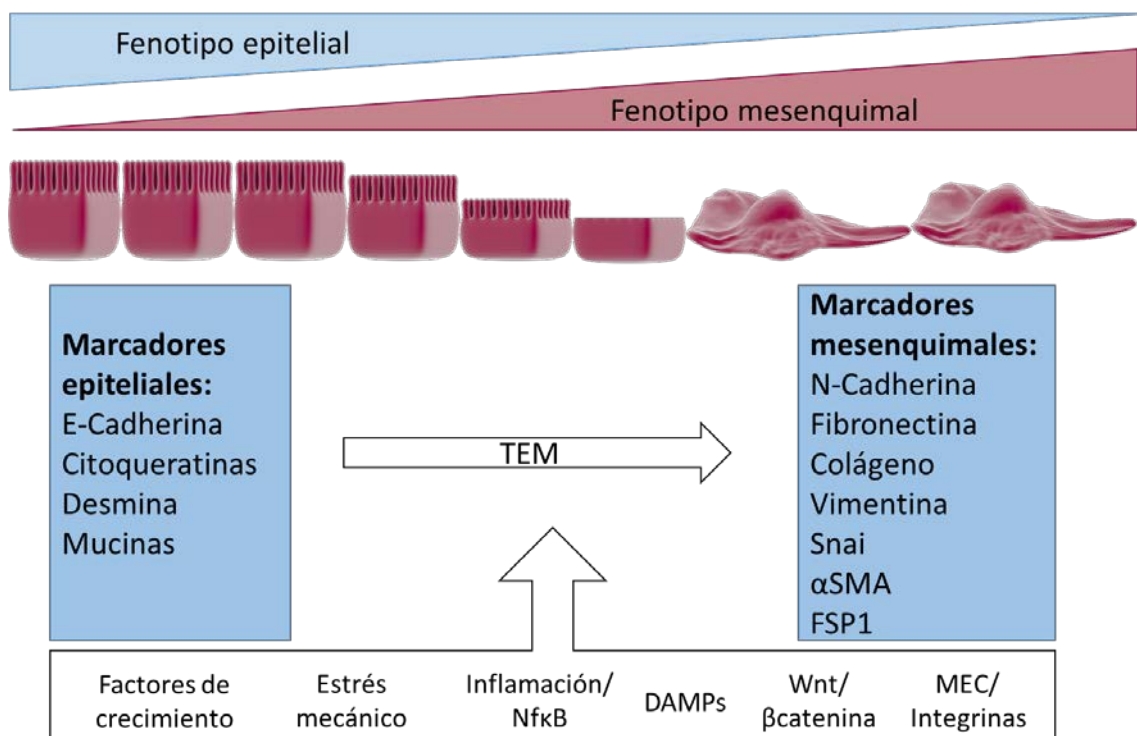


Figura 1. 1 Esquema de la transición epitelial a mesenquimal (TEM)

3.1.3. Proliferación celular, apoptosis y autofagia

Existe un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis para mantener la homeostasis fisiológica en el intestino. Durante un proceso fibrótico, sin embargo, la tasa de proliferación celular de los fibroblastos aumenta en relación con la apoptosis, resultando en un incremento del número final de células productoras de MEC.

Los principales reguladores de la apoptosis incluyen las caspasas, Bcl-2, Bax, p53 y la quinasa de adhesión focal (FAK). Bcl-2 es el prototipo de proteína anti-apoptótica ya

que bloquea el reclutamiento y la activación de proteínas pro-apoptóticas en la mitocondria, como Bax. Los inhibidores de metaloproteasas de tejido (TIMPs) son importantes en la fibrosis, ya que inhiben la degradación de la matriz. Sin embargo, algunos TIMP individuales pueden regular la división celular y la apoptosis independientemente de esta actividad, como TIMP1. HGF reduce la fibrosis al aumentar la apoptosis, actuando como un potente inductor de las MMPs. Estas a su vez, inducen apoptosis en los miofibroblastos a través de la degradación de la fibronectina (Lawrance et al., 2017).

Otro proceso importante tanto en la secreción, como en la degradación de la MEC es la autofagia, un proceso degradativo de proteínas que implica la formación de un autofagolisosoma. Se han identificado polimorfismos en los genes relacionados con la autofagia, como NOD2, ATG16L1 e IRGM entre otros, en pacientes con EII (Iida, Onodera & Nakase, 2017). TGF β deteriora los procesos autofágicos. Los pacientes con EC con mutaciones ATG16L1 también tienen un mayor riesgo de fibroestenosis del intestino delgado, mientras que la rapamicina, un potente inductor de autofagia, mejora los resultados en pacientes con enfermedad fibrótica grave (Lawrance et al., 2017, Salem et al., 2015). Por otra parte, en experimentos en ratón se ha demostrado que la estimulación de la autofagia por distintas vías previene la inflamación intestinal (Macias-Ceja et al., 2017).

3.2. Mediadores moleculares de la fibrosis

El conjunto de señales paracrinas derivadas de células inmunitarias y no inmunitarias, mediadores pro y antifibróticos y factores autocrinos secretados por los propios miofibroblastos pueden modular la producción y degradación de la MEC de la pared intestinal, contribuyendo activamente a la generación de fibrosis cuando estas rutas se ven alteradas.

3.2.1. Factores de crecimiento

Dentro de los factores de crecimiento, TGF β es la molécula fibrogénica prototípica. Es producido principalmente por M Φ y fibroblastos y regula al alza la producción de proteínas de la MEC y la expresión de TIMP en el tejido, además de ser el inductor más potente de α -SMA, promoviendo TEM y endoMT.

El TGF β es sintetizado como un precursor que debe madurar en el aparato de Golgi. Durante su síntesis y maduración se encuentra unido a un complejo proteico que lo mantiene inactivo, a la vez que permite su asociación a la MEC. La liberación y activación del TGF β está mediada por proteasas, como plasmina, MMP2, MMP9, integrinas o trombospondina o a través de la acción de ácidos suaves. La ruta canónica de transducción de señal intracelular de TGF β está mediada por proteínas Smad, ya que la activación del receptor de TGF β induce la fosforilación de Smad2 y Smad3, lo que permite su unión con Smad4. El complejo Smad2/3-Smad4 se traslada al núcleo, donde regula los genes diana del TGF β . Smad7, por el contrario, inhibe la señalización de TGF β mediante la prevención de la fosforilación de Smad2/3. TGF β también modula, de manera independiente de Smad, otras vías de transducción de señales, incluidas las quinasas activadas por mitógenos ERK, cJUN y p38. Existen tres isoformas de TGF β , dos de las cuales, TGF β 1 y 2 estimulan la síntesis de colágeno y regulan al alza las TIMP, mientras que TGF β 3 tiene el efecto contrario. Las activinas también son miembros de la familia TGF β que actúan a través de Smad y MAP quinasas y, al igual que TGF β se producen durante la inflamación, reparación y fibrosis tisular. Por su parte, FCTC es un mediador descendente de la señalización TGF β vía Smad, que estimula la proliferación celular y la síntesis de MEC, además de TNF- α y las ERO.

Además del TGF β y moléculas relacionadas con el mismo, otros factores de crecimiento también se han relacionado con la fibrosis intestinal, siendo capaces de activar e incrementar la proliferación y migración de miofibroblastos, e inducir la expresión de α SMA y promover la deposición de MEC, como PDGF, IGF-1, IGF-II, FGF y EGF. Por otra parte, HGF y BMP-7 son inhibidores naturales de la ruta TGF β /Smad, por lo que tendrían un papel antifibrótico (Pohlers et al., 2009, Latella et al., 2015, Lawrance et al., 2017).

3.2.2. Citocinas

Se han identificado varias citocinas que afectan a la aparición y establecimiento de la fibrosis, entre ellas varias interleucinas (**Tabla I. 2**) (Lawrance et al., 2017).

Citocina	Efecto relacionado con la fibrosis intestinal
IL1	Induce la activación de fibroblastos, la TEM y la secreción de quimiocinas y MMPs
IL5	Facilita la producción de IL13 y TGFβ
IL6	Estimula la producción de TGF-β y la proliferación de fibroblastos. Es necesaria para el desarrollo de las células Th17
IL7	Inhibe la señalización de TGFβ por medio de la inducción de Smad7
IL10	Suprime la deposición de colágeno
IL13	Induce la liberación de TGFβ por monocitos y MΦ y promueve la activación de miofibroblastos y la producción de MEC
IL17	Promueve la producción de quimiocinas que reclutan y activan granulocitos. Es un potente activador de las células mesenquimales
IL17A	Aumenta la síntesis y la secreción de colágeno e induce la TEM de manera dependiente de TGFβ1
IL21	Mejora el desarrollo, la supervivencia y la migración de las células Th2, estimula la expresión de los receptores de IL4 e IL13 en MΦ, induce su activación, estimula la secreción de enzimas que degradan la MEC en fibroblastos y la secreción de quimioatrayentes de células T por las células epiteliales. Es necesario para el desarrollo de las células Th17
IL23	Induce la producción de IL17 y TNF-α
IL33	Induce patología de la mucosa <i>in vivo</i> y puede conducir al desarrollo de fibrosis y angiogénesis
TNF-α	Induce la expresión de TIMP1 y reduce la actividad de MMP2 y la degradación del colágeno
IGF-1	Junto con el TNF-α , estimula la proliferación de miofibroblastos intestinales y la producción de colágeno
IFN-γ	Antagoniza la fosforilación inducida por TGFβ de Smad3 a través de una vía dependiente Jak1, STAT1 y Smad7, inhibiendo la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno en miofibroblastos activados. También afecta la migración celular regulando la expresión de fibronectina
IL12	Induce la expresión de IFN-γ en células Th1 y células NK

Tabla I. 2 Efecto de distintas citocinas sobre la generación de fibrosis intestinal.

3.2.3. Quimiocinas

Las quimiocinas son quimioatrayentes de leucocitos que cooperan con citocinas profibróticas en la fibrogénesis mediante el reclutamiento de miofibroblastos, MΦ y

otras células efectoras clave en los sitios de lesión tisular. Aunque una gran cantidad de vías de señalización de quimiocinas están involucradas en la fibrogénesis, las familias de receptores de quimiocinas CC- y CXC- tienen importantes funciones reguladoras. Específicamente, CCL2 (proteína quimiotáctica de monocitos-1 [MCP1]), CCL3 (proteína inflamatoria de MΦ -1 [MIP1]), CCL4 (MIP-1β) y CCL20 (MIP-3α) son mediadores pro-fibróticos y se elevan en la EII (Lawrance et al., 2017).

3.2.4. Especies reactivas de oxígeno

El estrés oxidativo es frecuente en los pacientes de EII. Las ERO regulan varios factores de transcripción mediante la activación de las proteínas quinasas, la inactivación de las fosfatasa o reacciones redox directas con factores de transcripción. Los factores de transcripción regulados por ERO incluyen Nrf2, NF-κB, proteína tumoral p53, factores inducibles por hipoxia, proteína activadora 1 (AP1), FOXO, STAT, β-catenina, endonucleasa apurínica/apirimidinica 1 (APE1) / factor efector redox 1 (Ref-1), y proteínas Smad, todas ellas, directa o indirectamente, involucradas en la fibrosis (Latella, 2018).

3.2.5. Integrinas

Las integrinas regulan las interacciones entre las células y la MEC. En condiciones normales, la integrina αvβ6 no se expresa, pero durante una inflamación crónica se regula al alza y colocaliza con TGFβ. Los inhibidores de αvβ6 reducen significativamente los niveles tisulares de los transcritos pro-fibrogénicos, incluyendo procolágeno α1, αSMA, TGFβ1, TGFβ2, FCTC y TIMP1. (Latella et al., 2015).

3.2.6. Sistema renina angiotensina (SRA)

El SRA regula el crecimiento celular, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis, la generación de ERO, la expresión de citocinas, la activación de células endoteliales, la inflamación, la producción de MEC y la fibrosis. La angiotensina II, el principal efector de SRA, participa en la fibrosis a través de la regulación de los procesos inflamatorios/fibróticos. La angiotensina II se incrementa en el intestino de pacientes con EC. La fibrosis intestinal es significativamente mejorada, o incluso revertida, por los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y los antagonistas del receptor

AT1, hallazgos que se correlacionan estrechamente con la expresión reducida de TGF β 1 y FCTC (Latella et al., 2015).

3.2.7. Ruta WNT

La vía de señalización de WNT es una vía conservada que determina procesos esenciales, como la migración celular, la polaridad celular, la motilidad, la proliferación y la organogénesis durante el desarrollo embrionario. En adultos, estas proteínas están implicadas en la homeostasis de los tejidos, ya que controlan la proliferación, activación y regeneración de las células madre. Esta ruta es activada por los ligandos WNT, un grupo de glicoproteínas que, una vez secretadas, son capaces de unirse a la familia de receptores Frizzled. En los seres humanos, se han descrito 19 miembros de los ligandos de la familia WNT y 10 receptores Frizzled (Clevers, 2006).

3.2.7.1. Proteínas WNT

Las proteínas WNT se descubrieron inicialmente como proteínas esenciales para la segmentación y la polaridad durante el desarrollo del huevo y el embrión en *Drosophila* (Nusslein-Volhard, Wieschaus, 1980). Los genes WNT están altamente conservados desde *Drosophila* hasta mamíferos y la producción de proteínas WNT requiere varias modificaciones postraduccionales para la secreción y función de la proteína, como la glicosilación y la palmitoilación, reacciones mediadas por la proteína porcupina en el retículo endoplásmico (Kurayoshi et al., 2007). Debido a estas modificaciones, las proteínas WNT son altamente lipofílicas, ejerciendo su función dentro de un corto alcance tras la secreción al espacio extracelular, aunque se han sugerido algunos mecanismos para su señalización de largo alcance, como la asociación con otras lipoproteínas, la formación de complejos de proteínas multiméricas o el transporte por vesículas extracelulares (Bartscherer, Boutros, 2008, Gross et al., 2012). Los ligandos WNT se clasifican tradicionalmente como ligandos WNT "canónicos" (WNT 1, 2, 3, 8a, 8b, 9b, 10a y 10b) o "no canónicos" (WNT4, 5a, 5b, 6, 7a, 7b, y 11) en función de si sus señales intracelulares están mediadas a través de β -catenina, un cofactor transcripcional que se une a los factores de transcripción TCF/LEF (factor de células T/ factor activador de linfocitos).

3.2.7.2. Receptores WNT

Una vez que las proteínas WNT se liberan al espacio extracelular, ejercen su función celular a través de la unión a los receptores transmembrana. Los receptores frizzled (FZD) son los principales receptores de WNT, tanto en la señalización β -catenina dependiente como en la β -catenina independiente. En la primera, los receptores FZD interactúan con los LRP (proteína relacionada con el receptor de LDL) LRP5/6 para transducir la señal extracelular a intracelular. La señalización independiente de β -catenina no requiere proteínas LRP e incluye, entre otras, la vía de señalización de la polaridad celular plana (PCP) y la ruta WNT dependiente de calcio. Esta ruta incluye receptores de FZD y otros como el receptor huérfano similar a tirosina quinasa (ROR) y el receptor relacionado con el receptor tirosina quinasa (RYK) (Burgy, Konigshoff, 2018).

3.2.7.3. Ruta WNT/ β -Catenina

La señalización de WNT/ β -catenina es una vía bien conocida con una participación importante en la homeostasis de los órganos. En esta ruta, la β -catenina se traslada del citoplasma al núcleo donde actúa como un coactivador transcripcional.

En ausencia de ligandos WNT, β -catenina, el efector y principal componente de esta vía, se encuentra formando parte de las uniones adherentes, uniéndose a E-cadherina y α -catenina y modulando el citoesqueleto de actina. La β -catenina se degrada continuamente en el citoplasma a través de su ubiquitinación y destrucción proteolítica en el proteasoma. El complejo de proteínas responsable de esta regulación es el complejo de destrucción de β -catenina, o degradasoma, cuyos componentes principales son Axina, Adenomatosis polyposis coli (APC), y la serina-treonina quinasa glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) y caseína quinasa 1 α (CK1 α). Este complejo media la fosforilación N-terminal de la β -catenina, que permite su reconocimiento y ubiquitinación por parte de la ubiquitina ligasa β Trpc, permitiendo que el proteasoma la reconozca y se degrade (Aberle et al., 1997). En el núcleo, TCF/LEF está unido a los genes diana de WNT y a los correceptores transcripcionales TLE/Groucho (del inglés “transducin-like enhancer of split”) formando el complejo proteico que activa la señalización WNT. En ausencia de β -catenina nuclear, Groucho /TLE compacta la cromatina, reprimiendo la transcripción de los genes diana WNT (**Figura I. 2**).

Cuando los ligandos WNT canónicos están presentes, se unen a su receptor Frizzled y su co-receptor LRP5/6, produciendo un cambio conformacional que desencadena la polimerización de la proteína de unión a Frizzled Disheveled (DVL), lo que aumenta su afinidad por la Axina, anclando el conjunto Axina-degradasoma a la membrana plasmática y fosforilando el extremo citoplasmático de LRP5/6 e inhibiendo la fosforilación de β -catenina. La β -catenina no fosforilada se puede acumular entonces en el citoplasma y translocarse al núcleo, donde se activa el complejo proteico que activa la señalización WNT. Los mecanismos de translocación al núcleo de la β -catenina aún no han sido bien identificados. En el núcleo, β -catenina se une a los factores de transcripción TCF/LEF causando la ubiquitinación de los corepresores TLE/groucho y desplazándolos, lo que permite el reclutamiento de coactivadores transcripcionales como p300/CBP o Bcl9/Pygo, induciendo la transcripción de los genes diana WNT (**Figura I. 2**) (Gammons, Bienz, 2017).

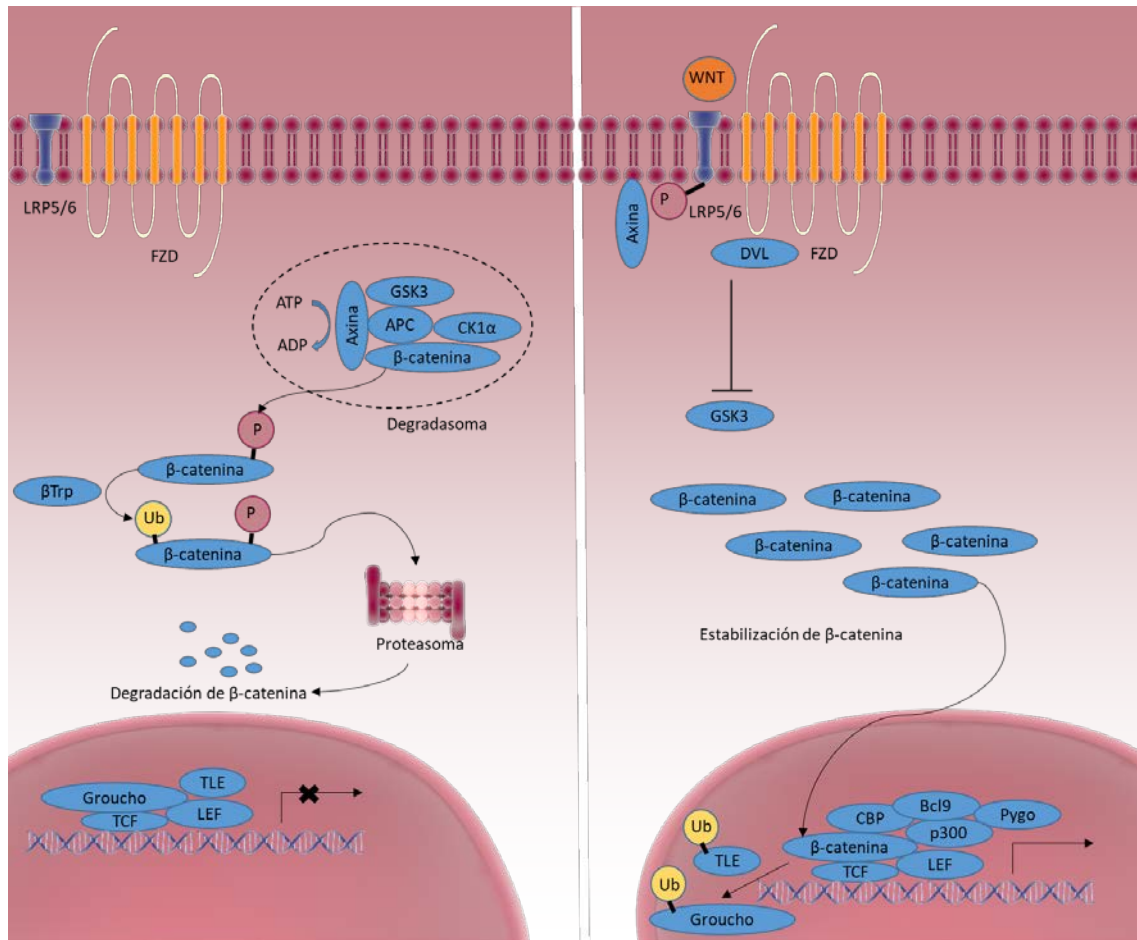


Figura 1. 2 Esquema de la ruta WNT dependiente de β -catenina.

La proteína β -catenina lleva a cabo dos funciones diferentes, una estructural, formando parte de las uniones adherentes en conjunción con la E-cadherina y otra en señalización como activador transcripcional en respuesta a factores WNT. Los dominios de unión con las proteínas con las que interactúa (APC, E-cadherina y TCF/LEF) están solapados, impidiendo la unión simultánea a varios de ellos.

La ruta WNT regula la expresión de genes de diversa índole, como genes de ciclo celular, como Ciclina D1 o cMyc (He et al., 1998, Tetsu, McCormick, 1999), genes de la propia ruta WNT, como Axina2, DKK1, o LEF, que actuarían como reguladores negativos (Yan et al., 2001, Niida et al., 2004, Hovanes et al., 2001), o genes involucrados en la TEM como MMPs, TWIST, SNAI1, SNAI2 (Brabletz et al., 1999, Wu, Crampton & Hughes, 2007, Howe et al., 2003, ten Berge et al., 2008), entre otros.

3.2.7.4. Rutas WNT independientes de β -Catenina

La ruta WNT no canónica (β -catenina independiente) se puede subdividir en dos ramas diferentes: la ruta PCP y la ruta WNT dependiente de calcio.

La ruta PCP se media a través de los receptores Frizzled, aunque es independiente del receptor LRP5/6. Cuando los ligandos WNT están presentes, la señal se transduce a DVL, que activa las proteínas de unión a GTP Rho y Rac y a sus efectores, la Rho-quinasa (ROCK) y JNK, causando cambios en el citoesqueleto para controlar la motilidad y la polarización durante la gastrulación.

La ruta WNT dependiente de calcio se activa a través de los receptores Fzd2 y 7 o del receptor Ror2 (receptor huérfano con actividad tirosina quinasa). El receptor Frizzled activa DVL a través de la activación de proteínas G que activan IP3, causando una liberación de Ca^{+2} intracelular, lo que a su vez activa a la Ca^{2+} calmodulina quinasa II (CaMKII) y a calcineurina (CaN) que regulan la migración y proliferación celular (Komiya, Habas, 2008).

3.2.7.5. Inhibidores de la ruta WNT

Dada su importancia, la ruta WNT está muy regulada. Se han descrito varios inhibidores endógenos, siendo los más importantes los de familia “Dickkopf” (DKK) y SFRP (del inglés “secreted frizzled-related protein”). La familia DKK es un grupo de cuatro proteínas solubles que inhiben la ruta mediante su unión a LRP5/6, impidiendo la formación del complejo WNT-Fz-LRP necesario para la activación de la vía WNT (Grumolato et al., 2010). Estas proteínas tienen un dominio C-terminal rico en cisteína responsable de su función inhibitoria. Las SFRP son glicoproteínas solubles que inhiben la ruta mediante su unión a los ligandos WNT, evitando así su unión a sus receptores. Del mismo modo actúan otros inhibidores, como las proteínas WIF (del inglés “WNT inhibitory factor”) y Soggy1. Todas estas proteínas desempeñan un papel importante al inhibir la vía canónica de WNT debido a un bucle de retroalimentación negativa, ya que son genes diana de la propia ruta (Clevers, 2006).

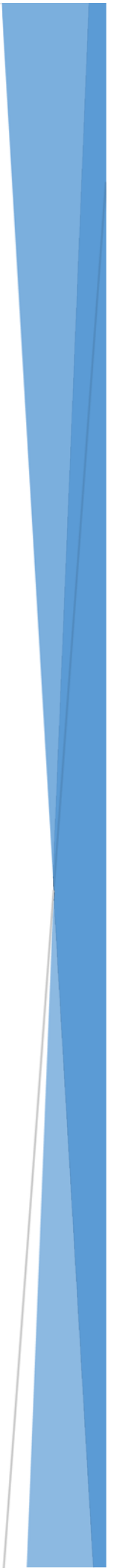
3.3. La fistula

Con frecuencia, la formación de estenosis y la fibrosis preceden a la formación de fístulas, una de las mayores complicaciones que aparecen en la EC, lo que indica que

ambos procesos pueden estar conectados o interrelacionados. Las fístulas consisten en conexiones entre dos cavidades corporales epitelizadas y pueden clasificarse como internas (enteroentérica, enterovesicales o rectovaginales) o externas (perianales, enterocutáneas o paraestomales) dependiendo de si comunican el área del tubo digestivo con enfermedad activa con un asa intestinal u órgano adyacente o si lo hacen desde el área del tubo digestivo con enfermedad activa hasta la piel. Las fístulas afectan a un 17-50% de los pacientes con EC durante el curso de su enfermedad, siendo la perianal el subtipo más común. El tratamiento farmacológico tiene un efecto muy limitado y se suele requerir del empleo de técnicas quirúrgicas para su eliminación (Sampietro, Casiraghi & Foschi, 2013).

La TEM tiene un papel crucial para la formación de las fístulas. Durante la formación de fístulas asociadas a EC, las células epiteliales migran al revestimiento de los tractos de la fístula, donde se convierten en células de transición. Esto se produce como respuesta compensatoria cuando la cicatrización de las lesiones intestinales es insuficiente. Además, la remodelación aberrante de la MEC, así como factores solubles como el TNF, IL13 y TGF β están involucrados, tanto en el inicio de la formación de la fístula como de la fibrosis. Sin embargo, hasta el momento se desconocen los mecanismos concretos que son necesarios para su aparición (Scharl, Bruckner & Rogler, 2016, Scharl, Rogler & Biedermann, 2017, Jiang, Shen & Ran, 2018).

II. OBJETIVOS



El objetivo general de esta tesis es analizar la relevancia de los macrófagos como fuente de ligandos Wnt en el desarrollo de fibrosis y fístulas en la EC.

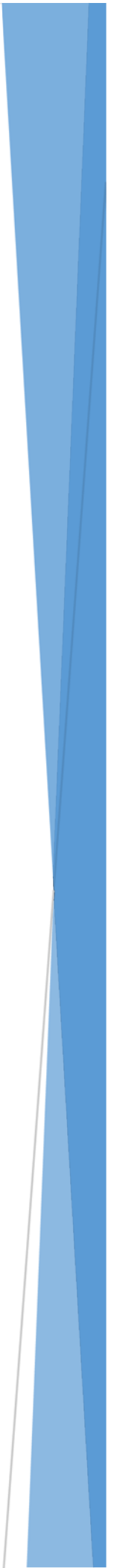
En particular, abordamos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar en un modelo murino de colitis y fibrosis intestinal:
 - a. Patrón de expresión macrofágico.
 - b. Expresión de ligandos Wnt.
 - c. El poder antifibrótico de los macrófagos dependientes de Stat6.

2. Evaluar en resecciones intestinales de pacientes con enfermedad de Crohn de fenotipo estenosante y penetrante:
 - a. Presencia de fibrosis y de transición epitelial-mesenquimal
 - b. Expresión de ligandos WNT, receptores FZD y activación de la ruta WNT.
 - c. Patrón de expresión macrofágico.

3. Determinar el efecto de la señalización del ligando WNT2B a través del receptor FZD4 en la transición epitelial-mesenquimal en células aisladas.

III.METODOLOGÍA



1. Experimentos con ratón

Ratones

Tanto los ratones tipo salvaje Balb/cj, como *Stat6*^{-/-} (C.129S2-Stat6tm1Gru/J) fueron proporcionados por el Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME) y se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos específicos, con libre acceso a agua y comida, a una temperatura de 21°C ± 1°C y en un régimen de luz/oscuridad (12h/12h). Los experimentos se realizaron con ratones de 7 y 8 semanas de edad y fueron distribuidos de manera aleatoria en los diferentes grupos experimentales. Todos los protocolos fueron aprobados por los comités institucionales de cuidado y uso de animales de la Universidad de Valencia (Valencia, España).

Inducción de la inflamación crónica de colon y fibrosis

Los ratones tipo salvaje y *Stat6*^{-/-} recibieron una administración semanal rectal de una solución de ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) (Sigma Aldrich, Madrid, España) o solución salina al 0,9% durante 6 semanas (**Figura III. 1**). La dosis semanal de TNBS se incrementó progresivamente (semanas 1 y 2: 0,5 mg de TNBS en 30% de etanol; semanas 3 y 4: 0,75 mg de TNBS en 45% de etanol; semanas 5 y 6: 1,0 mg de TNBS en 45% de etanol). La administración se realizó bajo anestesia ligera a través de un tubo de poliuretano de grado médico (diámetro, 1 mm) vía intrarrectal. El catéter se introdujo a 3 cm del recto y se administró un volumen total de 100 µl. Tras la administración, los ratones se mantuvieron boca abajo durante 1 minuto. Diariamente, los animales se pesaron, se controló la ingesta de alimentos y líquidos y se examinaron con el fin de detectar signos de colitis (pérdida de peso, diarrea, hemorragia rectal y prolapso), así como signos de inflamación sistémica (piloerección, letargo y exudados periorbitarios). Los animales se sacrificaron por dislocación cervical siete días después de la segunda, cuarta y sexta dosis (días 14, 28 y 42) y el colon fue extirpado. El tejido colónico fue congelado en nitrógeno líquido para la extracción de proteínas y ARN, o fijado en paraformaldehído al 4% e incluido en parafina para el análisis histológico, o se utilizó fresco para el aislamiento de MΦ de la LP.

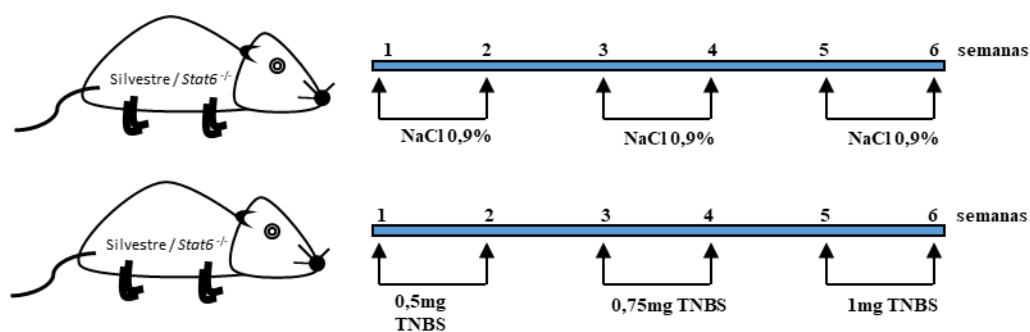


Figura III. 1 Inducción de la inflamación crónica de colon y fibrosis.

Aislamiento de macrófagos peritoneales murinos y polarización *in vitro*

Ratones tipo silvestre y *Stat6*^{-/-} fueron sacrificados por dislocación cervical, inmediatamente después se inyectó 10 ml de PBS (del inglés “*Phosphate Buffered Saline*”) a 4°C en la cavidad peritoneal. Mediante una incisión en la parte posterior de la cavidad abdominal, se extrajo el fluido y se centrifugó durante 5 min a 350 g a 4°C. El sedimento se resuspendió en RPMI-1640 (HiClone, GE Healthcare Life Science, South Logan, UT) suplementado con penicilina-estreptomicina al 2% y suero fetal bovino (SFB) al 10%. Las células resultantes fueron sembradas en placas de Petri a 37°C, 5% CO₂ y condiciones de humedad saturada. Pasadas 4 horas, las células no adheridas se eliminaron mediante lavado con PBS atemperado a 37°C y los MΦ adherentes se polarizaron hacia el fenotipo M(IL4) mediante el tratamiento con IL4 (20 ng/ml) durante 72h.

Transferencia de macrófagos M(IL4)

Los M(IL4) derivados de MΦ peritoneales se despegaron de la placa mediante una incubación de 30 minutos con TrypLE Express (Invitrogen) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (1 mM) en PBS de Dulbecco a 37°C. Posteriormente fueron lavados dos veces con medio de cultivo atemperado a 37°C. A los 2 días de cada administración de TNBS se inyectó, por vía intraperitoneal, 2,0 x 10⁶ MΦ con una aguja 19G.

Aislamiento de macrófagos de la mucosa colónica murina

El colon de los ratones Balbc y *Stat6*^{-/-} se obtuvo 7 día después de la segunda, cuarta y sexta administración de TNBS, se cortó longitudinalmente, y fue lavado con PBS. Posteriormente se cortó en trozos pequeños y se eliminaron las células epiteliales

mediante incubación en Hank's balanced salt solution (HBSS) con SFB al 10% y EDTA 2 mM (37°C, 30 minutos dos veces, bajo agitación). Las muestras fueron luego digeridas con colagenasa IV (1 mg/ml, Life Technology; 60 unidades/ml) y ADNasa I (0.04 mg/ml GE Healthcare) durante 30 min a 37°C y bajo agitación, se disociaron aún más utilizando GentleMACS (Miltenyi), y se filtraron a través de una malla de nylon de 100 µm. Las suspensiones celulares resultantes se incubaron con anticuerpos biotinilados contra F4/80 o CD16 (todos de BioLegend). Los correspondientes MΦ marcados se aislaron mediante la adición de microperlas anti-biotina (Miltenyi) y se usó una columna MS en el separador Mini MACS (ambos Miltenyi) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células F4/80+ se analizaron por citometría de flujo (ver más abajo), mientras que las células CD16 + se analizaron por RT-PCR, como se describe a continuación.

2. Experimentos con muestras intestinales humanas

Muestras de mucosa intestinal humana

Se obtuvieron resecciones quirúrgicas de colon de pacientes con EC sometidos a cirugía por complicaciones estenóticas o penetrantes y de pacientes con cáncer de colon (**Tabla III. 1**). Los análisis se realizaron en la mucosa dañada de los pacientes con EC y la porción de tejido no afectada de las resecciones de cáncer. Para el diagnóstico de EC se utilizaron los criterios de Lennard-Jones (clínicos, biológicos, endoscópicos e histológicos). Los pacientes con EC refractaria grave que habían perdido la respuesta al tratamiento de segunda línea y requirieron cirugía se clasificaron en pacientes con comportamiento estenosante (clasificación de Montreal: B2) o penetrante (clasificación de Montreal: B3) (**Tabla III. 1**). Los cirujanos digestivos seleccionaron las muestras de la estenosis en pacientes con EC B2 o del área que rodea el tracto de la fístula en pacientes con EC B3. El estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional del Hospital de Manises (Valencia). Se obtuvo de todos los pacientes el escrito de consentimiento informado.

	EC B2	EC B3	Cáncer de Colon
Número de pacientes	30	25	30
Edad			
Mediana	44	42	58
Intervalo	[15-82]	[18-77]	[40-82]
Género			
Hombre	12	10	16
Mujer	18	15	14
Localización			
Íleon terminal	14	11	10
Ciego	16	14	
Colon			20

Tabla III. 1 Características de los pacientes utilizados para el estudio.

Aislamiento de criptas intestinales y células mononucleares de la lámina propia (CMLP) de muestras quirúrgicas humanas

Las muestras quirúrgicas de pacientes con EC y cáncer se recogieron en PBS frío, se les quitó el músculo y la grasa y se cortaron en trozos pequeños. Las criptas intestinales se separaron mediante incubación en HBSS con EDTA 0,5 M y DTT 0,1 M (37°C, 30 min dos veces, bajo agitación) y el resto del tejido se digirió (1 mg/ml de colagenasa D, Roche Diagnostics; 0,02 mg/ml Liberase™, Sigma Aldrich, en RPMI 1640 (HiClone), 1 h, 37°C, bajo agitación, se filtró a través de una malla de nylon de 100 µm y se lavó a fondo. La suspensión celular resultante se analizó por citometría de flujo para detectar las CMLP, como se describirá a continuación.

Aislamiento de fibroblastos intestinales

La mucosa de las muestras quirúrgicas se cortó en trozos de 1 mm. Las células epiteliales se separaron en HBSS sin Ca²⁺ o Mg²⁺ con SFB al 0,5% y EDTA 2mM. El tejido restante se lavó con PBS y se digirió durante 30 minutos a 37 ° C con 1 mg/ml de colagenasa 1 (Sigma-Merck), 1 µl/ml de ADNasa I (Sigma-Merck) y 2 mg/ml de hialuronidasa (Sigma-Merck) en PBS. Las células aisladas se cultivaron en matraces de 25 cm² de cultivo celular (Cultek) con DMEM que contenía 20% de SFB, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina, 8 µg/ml de ciprofloxacina (Thermo Fisher Scientific), 50 µg/ml de gentamicina (Thermo Fisher Scientific) y 1 µg/ml de anfotericina B (Thermo Fisher Scientific). Las células no adheridas se eliminaron mediante cambios posteriores del medio. Los fibroblastos se usaron entre los pases 3 y 8.

Obtención de secretomas de resecciones intestinales

La mucosa de las muestras quirúrgicas de pacientes con EC B2, EC B3 o cáncer se cortó en trozos de 1mm y se cultivó en medio X-VIVO 15 suplementado con 1% de SFB inactivado, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y MCSF 20 ng/ml. Tras 16 horas de cultivo se recogió el medio para ser filtrado con un filtro de 0,22 µm y centrifugado. El secretoma se congeló a -80°C hasta su uso.

Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

Para evitar la coagulación de las muestras sanguíneas se utilizaron para su extracción tubos de citrato sódico. Las muestras se obtuvieron de donantes sanos e inmediatamente después de su extracción se obtuvieron las CMSP mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-1077. Para ello, la sangre se diluyó 1:1 en PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} y se depositó sobre un volumen similar de Ficoll a temperatura ambiente en un tubo de 50 mL. El tubo se centrifugó 40 minutos a 400 g desactivando el freno de la centrífuga. Mediante la centrifugación se obtiene un gradiente de densidad con el que se separan los distintos tipos celulares, formando las CMSP un halo blanquecino en la parte media del tubo. Se recogieron las CMSP con una pipeta Pasteur y se lavaron con PBS.

3. Cultivo celular y tratamientos

Se cultivaron células HT29 (American Type Culture Collection) en McCoy's Medium Modified (Sigma-Merck) suplementado con 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 2 mM L -glutamina. Las HT29 se trataron con TGFβ1 (10 ng/ml, Miltenyi), WNT2B (1500 ng/ml en 0,1% de albúmina de suero bovino (ASB), Abcam) o 0,1% de ASB durante 7 días y el medio se cambió cada 2 días. Alternativamente, las células HT29 se transfectaron con vectores dirigidos contra el ARNm del receptor FZD4 humano (miFZD4, secuencias de direccionamiento: 5'-CGGCATGTGTCTTTTCAGTCAA-3' y 5'-GTCACCTCTGTGGGAACCAATT-3', GenBank No. de Entrada NM_012193) (Invitrogen). Como reactivo de transfección se empleó Lipofectamine-2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se trataron con WNT2B (1500 ng/ml) o vehículo (0,1% ASB) durante 24 h. Las criptas intestinales humanas obtenidas, tanto de controles, como de pacientes con EC, y los fibroblastos intestinales se trataron

con la proteína WNT2B (1500 ng/ml) resuspendida en ABS al 0,1% o vehículo (0,1% ASB) durante 24 h. Las CMSP se cultivaron en presencia de los secretomas obtenidos previamente, diluidos 1:1 con medio de cultivo X-VIVO 15, durante 5 días.

4. Análisis histológico

Los tejidos fijados en paraformaldehído se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones de 5 μm . Se adquirieron con una lente de objetivo 20x en un microscopio Leica DMD108 (Leica). La coloración azul o roja, indicativa de la deposición de colágeno en el tricrómico de Masson y Sirius Red respectivamente, se cuantificó con el software Image J (intensidad media azul o roja por área de tejido). Las muestras fueron analizadas por un observador que desconocía el tratamiento y la fibrosis se definió por la presencia de una banda de colágeno engrosada.

Tinción tricrómica de Masson

Los cortes se desparafinaron e hidrataron mediante su inmersión en xileno, seguida de inmersión en concentraciones decrecientes de etanol y se colocaron en solución de Bouin precalentada a 56°C durante 15 minutos o a temperatura ambiente durante la noche. Después, se enfriaron y lavaron con agua corriente tras lo que se tiñeron con hematoxilina férrica de Weigert durante 30 segundos y con fucsina ácida-escarlata durante 4 minutos, aclarando los cortes con agua desionizada entre cada colorante. Posteriormente, los cortes se incubaron en una solución de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico durante 5 minutos, tras lo cual se tiñeron con una solución de azul de anilina durante 10 minutos. Los cortes se aclararon con agua desionizada y se trataron con ácido acético al 1% durante 2 minutos. Por último, se deshidrataron las muestras y se montaron para su observación en el microscopio y cuantificación mediante el software Image J.

Tinción Sirius red

Los cortes se incubaron a 55°C durante 30 minutos, tras lo cual se desparafinaron e hidrataron mediante su inmersión en xileno, seguida de inmersión en concentraciones decrecientes de etanol. Posteriormente se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad en una solución 0,01% fast green (Fast green FCF sigma F258) en ácido pícrico. A continuación, se lavaron 3 veces los cortes en agua destilada y se

incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en una solución 0.04% fast green (Fast green FCF sigma F258) + 0.1% Sirius red (Direct red 80 sigma 365548-5G) en ácido pícrico. Por último, se deshidrataron las muestras y se montaron para su observación en el microscopio y cuantificación mediante Image J.

Inmunohistoquímica

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en una cámara humidificada. Para bloquear los sitios de unión no específicos, las muestras se incubaron con suero sanguíneo de la especie en la que se generó el anticuerpo secundario diluido al 5% en salino tamponado con Tris- Polisorbato 20 (TBS-T) durante 1 a 3 h. Los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo primario (ver **Tabla III. 2**) diluido en la misma solución de bloqueo, durante toda la noche a 4 ° C. Al día siguiente, los portaobjetos se lavaron 3 veces durante 5 minutos en TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario, diluido en solución de bloqueo. Finalmente, antes de la detección cromogénica, los portaobjetos se lavaron con TBS-T, 3 veces durante 5 min.

Se empleó el sustrato cromogénico 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB Enhanced Liquid Substrate System, Sigma-Aldrich) para inmunodetectar los antígenos diana. El DAB es un sustrato precipitante que produce una intensa tinción marrón por acción de la peroxidasa (enzima presente en el anticuerpo secundario y complejos de avidina-biotina). El DAB se preparó siguiendo el protocolo del fabricante y luego se agregó a la muestra de 4-15 minutos (según los requisitos del anticuerpo primario empleado), verificando continuamente la aparición de la coloración marrón. La reacción se detuvo sumergiendo los portaobjetos en agua durante 2 minutos y lavando tres veces con PBS durante 10 minutos. La especificidad de la inmunotinción se verificó mediante la ausencia de tinción en secciones de tejido análogas en las que se excluyeron los anticuerpos primarios o secundarios.

	Western Blot	Microscopía confocal	Inmunohistoquímica
	Dilución del Anticuerpo		
WNT2B (Thermo Fisher Scientific)	1:500		
E-CADHERINA (Thermo Fisher Scientific)		1:100	
VIMENTINA (Abcam)		1:200	
WNT2B (Abcam)			Desenmascaramiento de Antígeno: Tampón Citrato de sodio pH9, 20 min, 1:200
STAT3 (Abcam)	1:1000		
STAT3-P (Abcam)	1:1000		
FZD4 (Sigma-Merck)			Desenmascaramiento de Antígeno: α -quimotripsina, 20 min, 1:200
β -CATENINA (Sigma-Merck)	1:2500		
β -ACTINA (Sigma-Merck)	1:10000		
NUCLEOLINA (Sigma-Merck)	1:2500		

Tabla III. 2 Anticuerpos primarios utilizados en las distintas técnicas.

5. Inmunofluorescencia

Se realizó la tinción inmunofluorescente para Vimentina y E-Cadherina (**Tabla III. 2**) en tejido humano intestinal congelado y células HT29. La mucosa colónica de pacientes con EII se congeló en nitrógeno líquido y se cortaron secciones de 4–8 μ m con el crio-microtomo. Las células HT29 fueron fijadas con paraformaldehído al 10% durante 5 minutos. Los portaobjetos se bloquearon con una solución PBS/ASB al 0,5% durante 20 minutos y se incubaron con anticuerpos primarios (**Tabla III. 2**) (diluidos en solución de bloqueo) durante 30 minutos a 37°C en un ambiente humidificado. Después de lavar con PBS, se realizó un etiquetado doble fluorescente con los anticuerpos secundarios, inmunoglobulina G obtenida en conejo contra cabra (IgG) acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC) e inmunoglobulina G obtenida en cabra contra ratón acoplada al fluorocromo Tex-Red. Se añadió Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) 1 mM para teñir los núcleos (30 min a 37°C). La especificidad de la inmunotinción se confirmó por la ausencia

de fluorescencia cuando se omitieron los anticuerpos primarios. Las muestras se analizaron con un microscopio confocal Olympus FLUOVIEW FV1000 u Olympus IX81 (Olympus, Hamburgo, Alemania).

6. Análisis de la expresión génica

Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó utilizando Tripure Isolation Reagent (Roche). Los tejidos se homogeneizaron con Ultraturrax en 750 μ l de Trizol, y los M Φ aislados se suspendieron en 750 μ l de Trizol. Posteriormente, se añadieron 200 μ l de cloroformo y se centrifugaron las muestras durante 15 min a 11000 g a 4°C. Se tomó la fase superior y se precipitó el ARN mediante la adición de 500 μ l de isopropanol, con el que se incubó un mínimo de 1 hora a -20°C, tras lo que se centrifugó durante 20 min a 11000 g a 4°C. Los precipitados de ARN se lavaron dos veces con etanol al 70% y se resuspendieron en agua Mili-Q. La concentración de ARN se cuantificó con Nanodrop™.

Síntesis de ADN complementario mediante transcripción reversa

El ADN complementario se sintetizó por transcripción inversa, empleando el kit de reactivos PrimeScript™ RT (Perfect Real Time) (Takara Biothecnology, Dalian, China). De acuerdo con el protocolo del fabricante, la reacción se realizó utilizando 1 μ g de ARN, 1X *PrimeScript Buffer*, 1 μ l *PrimeScript RT Enzyme Mix I*, 50 pmol *Random 6- mers* y 25 pmol *Oligo dT Primer* (20 μ l volumen final). La reacción se llevó a cabo en un GeneAmp® PCR System 2400 (PerkinElmer Inc, Waltham, MA, EE.UU.) en las siguientes condiciones: 37°C durante 15 min, 85°C durante 5 segundos y 4°C hasta el infinito.

PCR cuantitativa (PCRq)

La PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) en tiempo real se realizó con SYBR® *Premix Ex Taq™*, mezclando 1 μ l de ADN complementario, 5 μ l de SYBR® *Premix Ex Taq™*, 3 μ mol de cebadores (sentido y antisentido) y agua libre de ARNasa (10 μ l de volumen final) en un sistema de PCR en tiempo real Lightcycler® 96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), siguiendo el siguiente protocolo: 95°C durante 30 segundos; 95°C durante 5 segundos, 60°C durante 20 segundos (50 ciclos); 95°C durante 1 segundo; 65°C durante 15 segundos; 95°C durante 1 segundo y 40°C durante 30

segundos. Los cebadores específicos se diseñaron de acuerdo con las secuencias mostradas en las tablas mostradas más adelante.

Antes de su uso en PCRq, los cebadores se probaron mediante el análisis de la curva de fusión y la electroforesis estándar en un gel de agarosa al 2% que contenía Goldview™ DNA Safe Stain (UVAT Bio CB, Valencia, España) y disolución tampón formada por Tris, acetato y EDTA (TAE) 1x (Tris 20 mM, pH 7,8), EDTA 0,5 mM y acetato sódico 10 mM. La expresión génica relativa se expresó de la siguiente manera: cambio en la expresión = $2^{-\Delta(\Delta CT)}$ donde $\Delta CT = CT(\text{gen diana}) - CT(\text{gen constitutivo})$, y $\Delta(\Delta CT) = \Delta CT(\text{grupo experimental}) - \Delta CT(\text{grupo control})$. Se utilizó ACTB como el gen constitutivo. Los productos de la PCR se cargaron en un gel de agarosa y las bandas se detectaron mediante una cámara LAS-3000 (Fujifilm).

Gen murino	Sentido (5'-3')	Antisentido (3'-5')	Longitud (pb)
<i>CD16</i>	GAAGGGGAAACCATCACGCT	GCAAACAGGAGGCACATCAC	293
<i>C-myc</i>	CCTTTGGGCGTTGGAAACC	GTCGCAGATGAAATAGGGCTG	115
<i>Col1a1</i>	CAGGCTGGTGTGATGGGATT	CAGGCTGGTGTGATGGGATT	317
<i>Cdh1</i>	AACCCAAGCACGTATCAGGG	ACTGCTGGTCAGGATCGTTG	142
<i>Fsp1</i>	GCACTTCCTCTCTTTGGTCTG	AACTTCATTGTCCCTGTTGCTG	247
<i>Lgr5</i>	TTCCACAGCAACAACATCAGG	CGAGGCACCATTCAAAGTCAG	159
<i>Mmp2</i>	CTGCAGGGTGGTGGTCATAG	GAAGATGATAGGGCCCGTGG	150
<i>Acta2</i>	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA	102
<i>Vim</i>	GCTCCTACGATTCACAGCCA	CGTGTGGACGTGGTCACATA	190
<i>Stat3</i>	TTTCATCAGCAAGGAGCGGG	GGGGTAGAGGTAGACAAGTGGGA	265
<i>Tgfb1</i>	GCGGACTACTATGCTAAAGAGG	TCAAAAGACAGCCACTCAGG	296
<i>Timp1</i>	CAGATACCATGATGGCCCCC	TCTGGTAGTCCTCAGAGCCC	558
<i>Wnt2b</i>	CGAGGCACCATTCAAAGTCAG	AGCCACCCAGTCAAAGTCC	240
<i>Wnt6</i>	CTGGGGGTTGAGAATGTCAG	GGAACAGGCTTGAGTGACCG	165
<i>Wnt10a</i>	GACCTGAGTAGGAGCTGTGTG	GATGTCGTTGGGTGCTGAC	256
<i>Actb</i>	GCCAACCGTGAAAAGATGACC	GAGGCATACAGGGACAGCAC	95

Tabla III. 3 Oligonucleótidos cebadores murinos usados en PCRq.

Gen humano	Sentido (5'-3')	Antisentido (3'-5')	Longitud (pb)
<i>C-MYC</i>	TTCCCCTACCTCTCAACGAC	TTCTTCCTCATCTTCTTGTTCCTCC	163
<i>COLA1</i>	GGAGCAGACGGGAGTTTCTC	CCGTTCGTACGCAGGTGAT	252
<i>COL3A1</i>	CGCCCTCCTAATGGTCAAGG	TTCTGAGGACCAGTAGGGCA	161
<i>COL4A1</i>	CCGGATCACATTGACATGAAACC	TGGAAACCAGTCCATGCTCG	236
<i>CCND1</i>	ATGCCAACCTCCTCAACGACC	TCCTCCTCGCACTTCTGTTCC	172
<i>CDH1</i>	TGGAGGAATTGTTGCTTGC	CGCTCTCCTCCGAAGAAC	103
<i>DES</i>	AGGGGCTCTCAAGAACAATGG	GCAGCACACGATCCTTTCTC	133
<i>DKK1</i>	TGGAACTCCCCTGTGATTGC	AATAGGCAGTGCAGCACCTT	115
<i>FSP1</i>	TCTTGGTTTGATCCTGACTGCT	CCTGTTGCTGTCCAAGTTGC	223
<i>FZD1</i>	GAGCGGCGCCAAGAGAGGAG	CCGTGGTCCGGGACGGAGAT	371
<i>FZD2</i>	AGCTACAAGTTTCTGGGCGA	AAATGATAGGCCGCTCTGGG	211
<i>FZD3</i>	CTCTCTTTGGCCCTTGACTG	ACAAAGAAAAGGCCGGAAT	223
<i>FZD4</i>	CCTGGCCAGAGAGTCTGAAC	AGGCTCCTTTTACCAGAT	181
<i>FZD5</i>	TGTCTGCTCTTCTCGGCGGATC	GTGATTCCTGGCACACCGGGG	395
<i>FZD6</i>	GAGAGGTGAAAGCGGACGGA	GGGTGAACAAGCAGAGATGTGG	277
<i>FZD7</i>	CGCCTCTGTTCTGCTACCTCTT	GTCTTGGTGCCGTCGTGTT	103
<i>FZD8</i>	AGCAAGGCAACCCTGACACGCT	GATCTGGCCTGTCTTGACGCGG	353
<i>FZD9</i>	GTCAAGGTCAGGCAAGTGAG	TCCAGAGGAACGCAACAATAAA	207
<i>FZD10</i>	CGTATCGGGCTCTTCTCTGT	CAGGCAGTCCAGCGTTTTAG	153
<i>IL1B</i>	GCTCGCCAGTGAATGATGG	TCGTGCACATAAGCCTCGTT	330
<i>IL6</i>	CTCAATATTAGAGTCTCAACCCCA	GAGAAGGCAACTGGACCGAA	163
<i>IL8</i>	AGAGACAGCAGAGCACACAAG	AATTTGGGGTGGAAAGGTTTGG	223
<i>LGR5</i>	CAACCTCCTGTCGTCTTTTCC	AGGCATTCTCACACTCCA	173
<i>CDH2</i>	TGTTTACTATGAAGGCAGTGG	TCAGTCATCACCTCCACCAT	152
<i>STAT3</i>	TAGAGACCCACTCCTTGCC	GATGCTCAGTCCTCGTTG	206
<i>SNAI1</i>	AACTGCAAATACTGCAACAAGG	ATTCGGGAGAAGGTCCGAG	281
<i>SNAI2</i>	ACGCCTCAAAAAGCCAAAC	ACAGTGATGGGGCTGTATGC	139
<i>VIM</i>	ATGAAGGAGGAAATGGCTCGTC	GGGTATCAACCAGAGGGAGTGAA	196
<i>WNT1</i>	CGCCACCCGAGTACCTCCA	TTCATGCCGCCCCAGGCAAG	110
<i>WNT2</i>	CTCTCGTGGAATCTGGCTC	GGCTAATGGCACGCATCAC	189
<i>WNT2B</i>	ATGGCGTGAGTGGTTCCTGT	CGTCTGTTCTTTTATGTCTTGCT	282
<i>WNT3</i>	AATGTCACCTCCACGGCAGC	ACACTTCACCCCTTCCCAG	201
<i>WNT4</i>	CTCGTCTTCGCGTCTTCTCA	GGCCCTGAGTTTCTCGCAC	109
<i>WNT5A</i>	CTGCCCAACTCGGGAGTCCAGG	AGGAATCCGAGCGGAGCGACC	147
<i>WNT5B</i>	TCAAGAGAGCGAGAAGACTGG	TAATGACCACCAGGAGTTGGC	171
<i>WNT6</i>	TTCGGGGACGAGAAGTCCGAG	CGTGGCATTGCACTCGGT	145
<i>WNT9A</i>	TCCACAACAACCTCGTGGG	CACCTTGAGTGCCGTCTCATA	170
<i>WNT9B</i>	CCTGCTTGAGTGCCAGTTTC	TGTTTCTCTCTTGACCCC	296
<i>WNT10A</i>	GGTGCTCCTGTTCTTCTAC	ATTGGTGTGGCATTCTGTGG	231
<i>WNT10B</i>	GTCTCCCCACGGTTTAAGCA	CTTAGACCCGACTGCACAA	207
<i>ZEB1</i>	CCATATTGAGCTGTTGCCGC	CCCCAGGATTCTTGCCCTT	275
<i>ZEB2</i>	AGCCTCTGATAGGTCCAGT	GGTCAGCAGTTGGGCAAAG	253
<i>ACTB</i>	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	234

Tabla III. 4 Oligonucleótidos cebadores humanos usados en PCRq.

7. Análisis de la expresión proteica e Inmunoprecipitación

Extracción de proteínas

Las muestras de tejido se homogeneizaron en 900 µl de tampón de extracción (0,66 MTris-HCl pH 7.5, ácido egtácico (EGTA) 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM y el inhibidor de la proteasa Complete Mini™ utilizando un disociador MACS™ (MACS

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Después de agregar 10 μL de 10% de NP-40 Surfact-Amps™, las muestras homogeneizadas se sonicaron durante 5 min a 15°C y luego se centrifugaron a 16000 g durante 40 min a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes resultantes (extractos de proteínas totales) y se almacenaron a -80°C.

Cuantificación de los extractos proteicos mediante el método de Bradford

Se utilizó el método de Bradford para cuantificar el contenido proteico de los extractos. Este método se basa en la formación de un complejo entre el colorante azul brillante de Coomassie G-250 y las proteínas en solución. El colorante libre existe en cuatro formas iónicas. La forma azul más aniónica se une a proteínas y absorbe a 590 nm. La concentración de proteínas puede ser evaluada determinando la cantidad de colorante en su forma iónica azul y midiendo la absorbancia de la solución a 592 nm utilizando un espectrofotómetro.

Este ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó una curva de proteína estándar mediante diluciones en serie de ASB (0,03125-1 mg/mL) en el mismo tampón de extracción que las muestras para minimizar la absorbancia de fondo. Se utilizaron 20 μL de muestras diluidas 1:20 o diluciones estándar por pocillo en una placa de 96 pocillos colocada en hielo, e inmediatamente después, 200 μL de reactivo de Bradford diluido 1:10. Tanto las muestras como los puntos de curva estándar se analizaron por duplicado. A continuación, la placa se incubó protegida de la luz a 37°C durante 30 minutos con balanceo suave. Finalmente, se midió la absorbancia a 592 nm empleando un espectrofotómetro de microplacas Multiskan™ Ascent 354 (Thermo LabSystems, Thermo Fisher Scientific).

Western Blotting (WB)

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Se realizó SDS-PAGE utilizando el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE. UU.). Los gels de poliacrilamida se fabricaron utilizando una mezcla de solución de acrilamida / bis-acrilamida (37,5: 1) (Prtopel® ultrapuro suministrado por National Diagnostics, Hesse, Reino Unido). Los gels de resolución se prepararon con un porcentaje diferente de poliacrilamida (6-15%) en tris-HCl 0,375 M, pH 8,8 y dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,1%, mientras que los gels de

apilamiento siempre se prepararon con poliacrilamida al 3,75% en Tris-HCl 0,125 M a pH 6,8 y SDS al 0,1%. La reacción de polimerización se catalizó con persulfato amónico al 0,1% (SERVA, Heidelberg, Alemania) y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED, Sigma-Aldrich).

Antes de su carga en los geles, se prepararon los extractos proteicos mediante la adición de tampón de muestra Laemmli (Tris-HCl 0,5 mM pH 6,8, glicerol v/v al 25%, SDS al 10%, β -mercaptoetanol al 0,5% y azul de bromofenol al 0,5%) y se hirvieron a 100°C durante 5 minutos para lograr la desnaturalización de proteínas. Se cargaron extractos con cantidades totales de proteínas iguales. Para determinar el peso molecular de los polipéptidos, también se cargó un marcador de peso molecular (EZ-Run™ Pre-Stained Rec Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific). La electroforesis se realizó en una cubeta con tampón de separación (Tris 25 mM, pH 8,3, SDS al 0,1% y glicina 192 mM) a un voltaje constante de 120 V.

Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa

Las proteínas resueltas en SDS-PAGE se transfirieron del gel de poliacrilamida de resolución a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m (GE Healthcare Life Science), utilizando *Mini Trans-Blot® Cell* (Bio-Rad Laboratories). La transferencia se realizó a 4°C durante 1h a un amperaje constante de 0,4 A, en tampón de transferencia (Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM y 20% de metanol).

Tinción de proteínas con Ponceau y anticuerpos

Para verificar la eficiencia y la calidad de la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se empapó en una solución al 0,1% de Ponceau / 5% de ácido acético (Sigma-Aldrich) durante 1 minuto, que tiñe inespecíficamente las proteínas. La tinción de Ponceau se eliminó con solución salina tamponada con Tris-Tween (TBS-T, Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM y Tween-20 v/v al 0,1%) antes de incubar la membrana en una solución de bloqueo (5% de leche en polvo libre de grasa diluida en TBS-T) con agitación suave continua, durante 1 h, a temperatura ambiente. Una vez que se bloqueó la membrana, se incubó con el anticuerpo primario (**Tabla III. 2**) preparado en solución de bloqueo durante 3 h, a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C con agitación suave continua. Posteriormente, la membrana se lavó cuatro veces en TBS-T durante 10

minutos, a temperatura ambiente y con agitación vigorosa, y se procedió a la incubación con anticuerpo secundario *Goat anti-Rabbit IgG-HRP* (SouthernBiotech) en solución de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora, y se lavó nuevamente.

Detección quimioluminiscente

El inmunomarcaje se detectó mediante quimioluminiscencia, empleando el sustrato *Luminata™ Crescendo Western HRP substrate* (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), *Amersham™ ECL™ Start Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare Life Science) o *SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este método de detección se basa en una reacción de oxidación del luminol catalizada por la enzima peroxidasa de rábano picante, conjugada con el anticuerpo secundario, en presencia de peróxido de hidrógeno, y que da lugar a 3-aminofalato que emite luz a 425 nm.

La emisión quimioluminiscente se visualizó con un analizador de imagen luminiscente digital, Fujifilm LAS-3000 Imager. Los análisis densitométricos se realizaron utilizando el software Multi Gauge V3.0 (Fujifilm, Tokio, Japón). La expresión de la proteína se normalizó frente a la de la β -actina (empleada como control de carga).

Inmunoprecipitación

Para la inmunoprecipitación se diluyeron 300 μ g de proteína total en tampón de extracción y se incubaron durante la noche con anticuerpo monoclonal purificado por afinidad contra FZD4 en rotación a 4°C. Después de unirse a la proteína A-Sepharose CL-4B (GE Health-care, Reino Unido) durante 4 horas a 4°C bajo agitación suave, los inmunoprecipitados se lavaron tres veces con tampón de extracción. Para desnaturalizar la proteína y separarla de las perlas de proteína A, se añadió el tampón de carga 2X y se hirvió a 100°C. Los sobrenadantes fueron entonces analizados mediante Western Blotting.

8. Citometría de flujo

Las células F4/80+ de ratón se lavaron dos veces (HBSS, SFB al 2%, EDTA 5 mM y HEPES 20 mM), se marcaron (30 min, 4°C, en oscuridad) con anticuerpos conjugados con fluorocromos contra F4/80, CD86, CD16 y CD206 (**Tabla III. 5**), y se analizaron utilizando un citómetro FACScalibur™ (BD Biosciences). Las CMLP humanas se lavaron y se

marcaron con anticuerpos contra CD45, CD14, CD64, CD206, CD16 y CD86 conjugados con fluorocromos (**Tabla III. 5**). Se usó el kit *LIVE/DEAD™ Fixable Near-IR Dead Cell SRAIN* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) para excluir las células no viables. Las muestras se analizaron utilizando un citómetro LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences) utilizando el software DIVA (BD Biosciences), y se identificaron MΦ viables como células CD45+ CD14+ CD64+ vivas en función de las características de dispersión frontal y lateral.

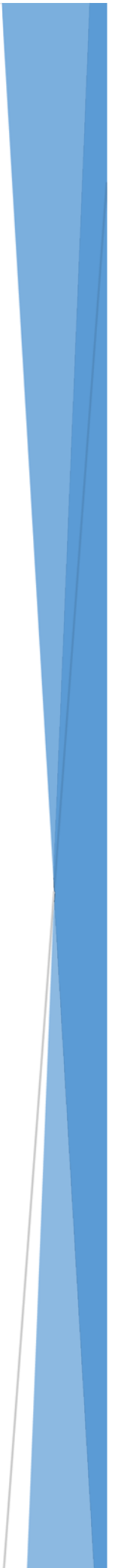
Diana-Fluorocromo conjugado	Reactividad	Proveedor
F4/80-FITC	Ratón	Miltenyi
CD86-PE	Ratón	BioLegend
CD16-PerCP	Ratón	R&D Systems
CD206-APC	Ratón	R&D Systems
CD45-FITC	Humano	BD Biosciences
CD14-Brillant Violet 510	Humano	BioLegend
CD64-PerCP-Vio700	Humano	Miltenyi
CD206-VioBlue	Humano	Miltenyi
CD16-PE	Humano	BioLegend
CD86-AlexaFluor®647	Humano	BioLegend

Tabla III. 5 Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

9. Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar de la media (s.e.m.) y se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA de una vía) con una corrección post hoc de Newman-Keuls para comparaciones múltiples, o mediante la prueba t de Student no pareada, según corresponda. Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Las curvas de supervivencia se compararon mediante la prueba de log-rank (Mantel-Cox). La correlación entre conjuntos de datos se analizó utilizando el coeficiente de correlación de Spearman. Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism® V6.01 (software GraphPad Prism® Inc., La Jolla, CA, USA).

IV. RESULTADOS



1. Establecimiento de un modelo murino crónico de colitis y fibrosis intestinal

1.1. La deficiencia de *Stat6* favorece la fibrosis en un modelo murino crónico de colitis

La administración semanal intrarrectal de TNBS a ratones Balb/cj y *Stat6*^{-/-} indujo un aumento de mortalidad comparada con la administración de vehículo, pero esta diferencia solo alcanzó significatividad estadística en el grupo de animales carentes de *Stat6* (**Figura IV. 1a**). El TNBS promovió una pérdida transitoria de peso corporal, 2-3 días después de cada enema, siendo la pérdida más pronunciada en los ratones *Stat6*^{-/-} (**Figura IV. 1b**).

Las secciones colónicas analizadas, siete días después de la última dosis de TNBS, mostraron una inflamación intensa y un aumento del grosor de la pared. La tinción tricrómica del tejido conectivo reveló que la administración crónica de TNBS a ratones silvestres no afectaba a la deposición de colágeno. Los ratones *Stat6*^{-/-} tratados con vehículo presentaron una mayor coloración azul (fibras de colágeno), que alcanzó significación estadística cuando los animales fueron tratados con TNBS (**Figura IV. 1c-d**). El aumento en la deposición de colágeno se observó principalmente en el espacio subepitelial, asemejándose a las características histológicas de la colitis colagenosa.

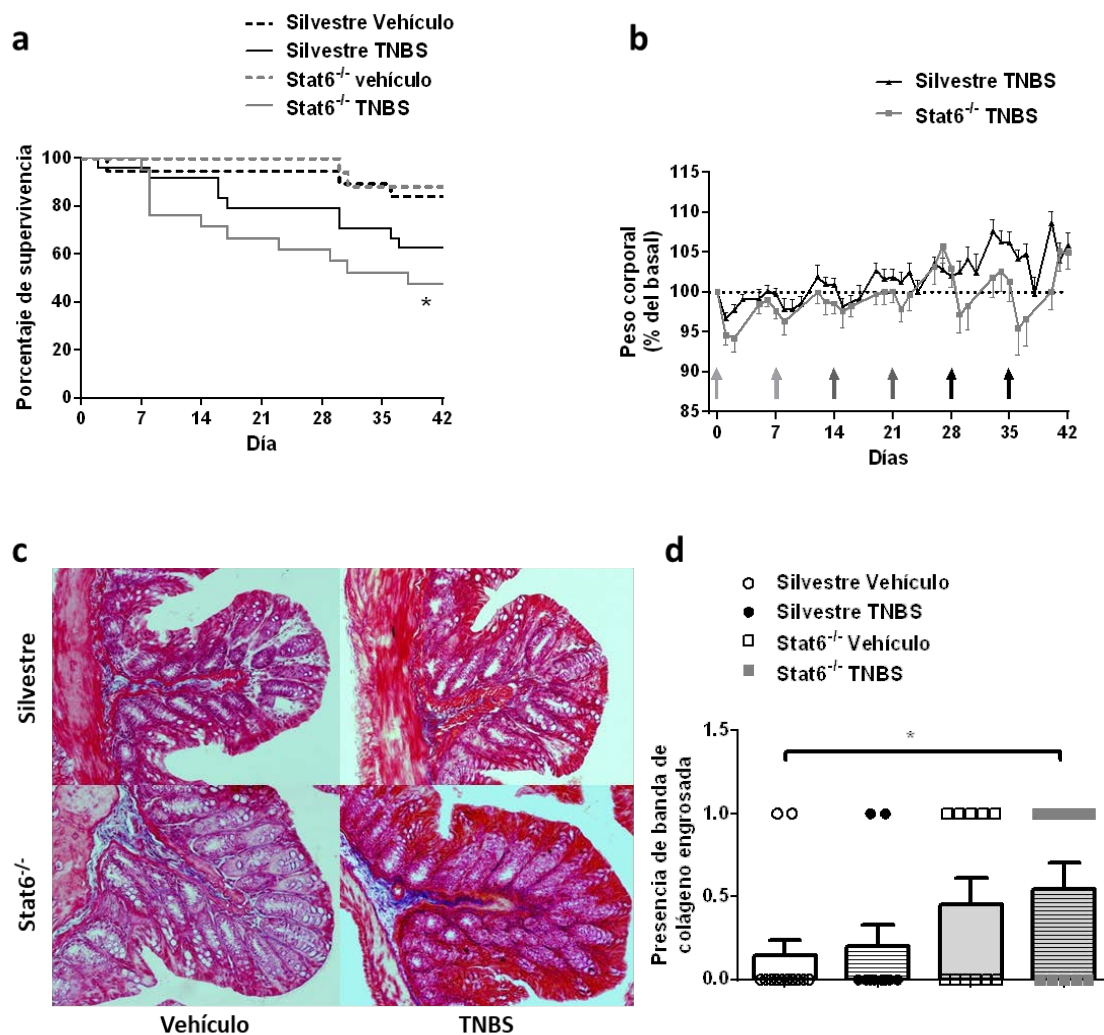


Figura IV. 1 La deficiencia de *Stat6* promueve la respuesta fibrótica intestinal en la colitis crónica inducida por el ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS). Los ratones de tipo silvestre y *Stat6*^{-/-} recibieron una administración intrarrectal semanal de TNBS o vehículo durante 6 semanas y fueron sacrificados 7 días después de la última dosis. Los gráficos muestran (a) el porcentaje de supervivencia, (b) el peso corporal como porcentaje del peso inicial, (c) las imágenes representativas correspondientes a la tinción tricrómica de Masson (aumento original 40X) y (d) fibrosis definida por la presencia de una banda de colágeno engrosada. Los puntos o barras en los gráficos representan la media ± s.e.m. de al menos 10 animales por grupo experimental. Las diferencias significativas entre los grupos se muestran mediante * $p < 0,05$ frente a silvestre-vehículo.

Con el fin de profundizar en el estudio del proceso fibrogénico, se analizó la expresión génica del principal componente de la capa de colágeno (*Col1a1*), de los enzimas involucrados en la destrucción y remodelación de tejidos, como *Mmp2* y *Timp1*, y de *Stat3*, un factor de transcripción importante para la regeneración mucosa y fibrosis. Además, para analizar los posibles cambios en las poblaciones celulares involucradas en la fibrosis, se evaluó la expresión de moléculas características de los fibroblastos (*Vimentina* y *Fsp1*), miofibroblastos o células del músculo liso (*α Sma*) y células epiteliales

(*E-cadherina*). La expresión de algunos de estos marcadores fue ligeramente elevada en los ratones *Stat6*^{-/-} y el TNBS provocó un aumento significativo en los niveles de ARNm para *Col1a1*, *Mmp2*, *Timp1*, *Vimentina* y α *Sma* en dichos ratones, pero no en los animales silvestres. Los niveles de ARNm de *E-cadherina* fueron similares en todos los grupos (Figura IV. 2).

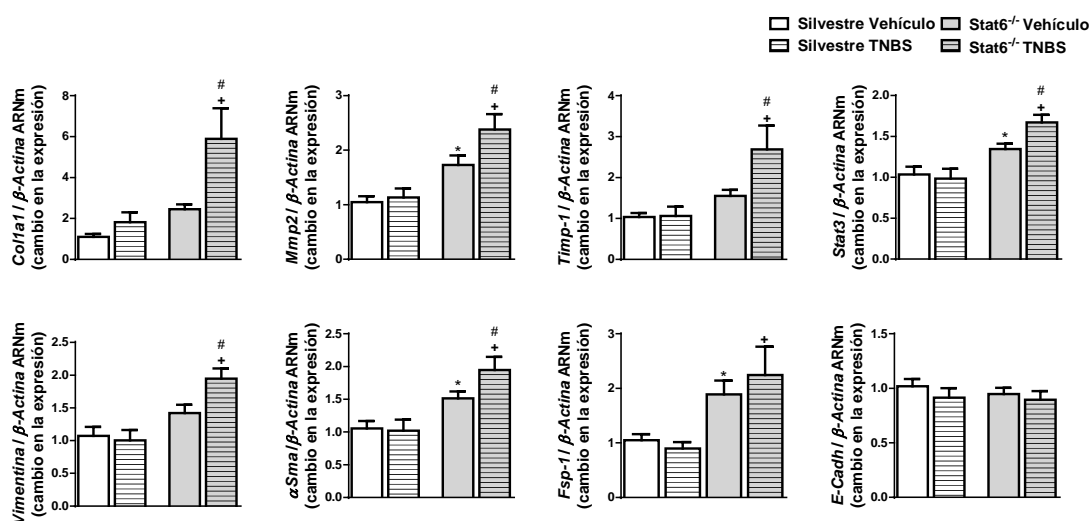


Figura IV. 2 La deficiencia de *Stat6* promueve la respuesta fibrótica intestinal en la colitis crónica inducida por TNBS. Los ratones de tipo silvestre y *Stat6*^{-/-} recibieron una administración intrarrectal semanal de TNBS o vehículo durante 6 semanas y fueron sacrificados 7 días después de la última dosis. Los gráficos muestran la expresión de ARNm colónico para colágeno (*Col1a1*), enzimas responsables de la destrucción y remodelación de tejidos *Mmp2* y *Timp1*, el factor de transcripción *Stat3* y los marcadores celulares *Vimentina*, *Fsp1*, α *Sma* y *E-cadherina*. Los datos de ARNm se expresan como valores relativos frente a la expresión del gen constitutivo *Actb* y se representan como cambio en la expresión frente al grupo silvestre-vehículo. Las barras en los gráficos representan la media \pm s.e.m. de al menos 10 animales por grupo experimental. Las diferencias significativas entre los grupos se muestran mediante * $p < 0,05$ frente a silvestre-vehículo, + $p < 0,05$ frente a silvestre-TNBS y # $p < 0,05$ frente a *Stat6*^{-/-} vehículo.

En general, los resultados sugieren que los ratones *Stat6*^{-/-} son más vulnerables a desarrollar fibrosis intestinal como resultado de la administración crónica de TNBS.

1.2. La deficiencia de *Stat6* disminuye la expresión de CD206 y aumenta la de CD16 en los macrófagos de la mucosa de ratones tratados con TNBS

Los M Φ de la mucosa murina, definidos como células F4/80+ se aislaron por medio del separador Mini MACS siete días después de la segunda, cuarta y sexta administración de TNBS o vehículo y se analizaron mediante citometría de flujo. Un 89,3 \pm 1.7% del total de la población era positiva para F4/80.

Dentro del grupo de células F4/80+, el porcentaje de células positivas para CD86 fue mayor en los ratones silvestres y *Stat6*^{-/-} tratados con TNBS que en los grupos

respectivos tratados con vehículo en el día 14. El porcentaje de células positivas para CD206 aumentó significativamente en los días 14 y 28 en ratones silvestres tratados con TNBS, mientras que se mantuvo en niveles basales en animales *Stat6*^{-/-} tratados con TNBS. En contraste, el porcentaje de MΦ positivos para CD16 fue significativamente mayor en los ratones *Stat6*^{-/-} que recibieron TNBS que en cualquier otro grupo experimental en cualquier momento analizado (**Figura IV. 3a**).

La expresión de CD16 mostró una correlación positiva y significativa con la de los indicadores de fibrosis que aumentaron específicamente con TNBS en ratones *Stat6*^{-/-} (*Vimentina*, *αSma* y *Mmp2*, **Figura IV. 3b**).

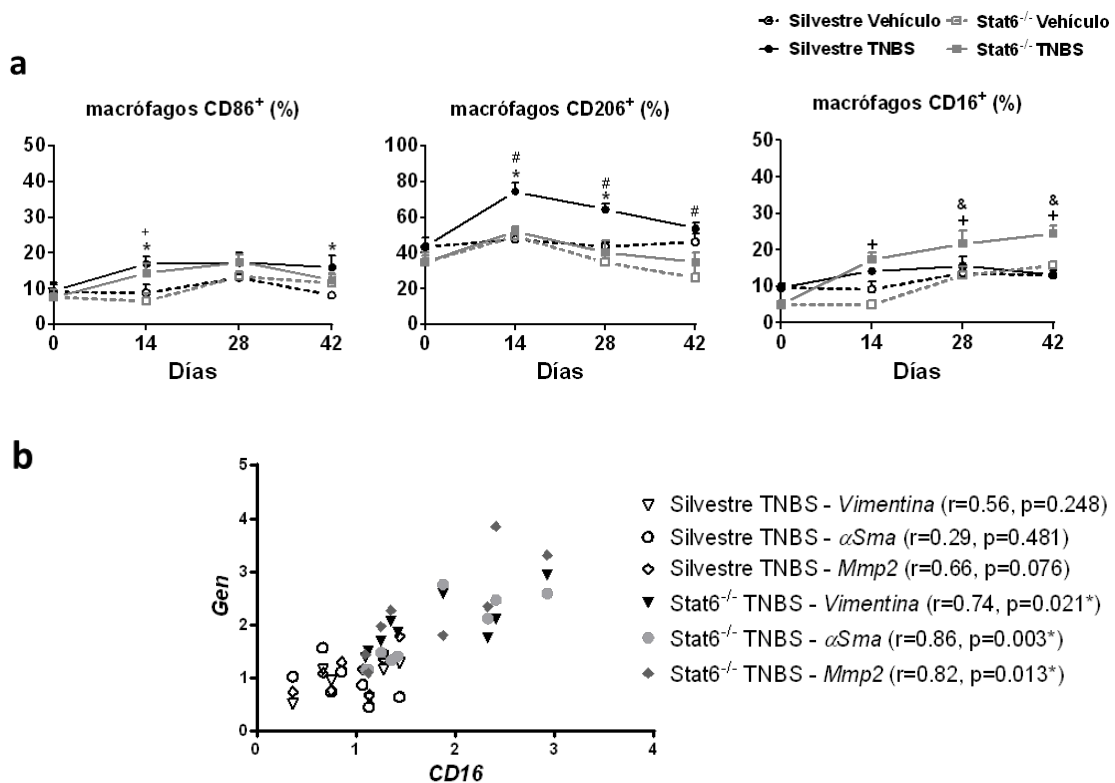


Figura IV. 3 Los macrófagos CD16⁺ se acumulan en la mucosa de los ratones deficientes en *Stat6* tratados con TNBS. (a) Los ratones de tipo silvestre y *Stat6*^{-/-} recibieron una administración intrarrectal semanal de TNBS o vehículo durante 6 semanas y fueron sacrificados siete días después de la segunda, cuarta y sexta dosis (días 14, 28 y 42). Los MΦ definidos como células F4/80⁺ se aislaron de la mucosa colónica y se caracterizaron además como células positivas para CD86, CD206 o CD16 mediante citometría de flujo. Los gráficos muestran el porcentaje de cada subpoblación de MΦ frente al número total de MΦ y cada punto representa la media ± s.e.m. de 5-9 animales. Las diferencias significativas entre los grupos se muestran mediante * p < 0,05 frente a silvestre-vehículo, + p < 0,05 frente a *Stat6*^{-/-} vehículo, # p < 0,05 frente a *Stat6*^{-/-} TNBS, y & p < 0,05 frente a silvestre-TNBS. (b) Expresión de ARNm colónico del marcador de MΦ CD16, expresada como valores relativos frente a la expresión del gen constitutivo Actb y representada como inducción frente al grupo silvestre-vehículo, y su relación con la de los marcadores fibróticos vimentina, *Mmp2* y *αSma* en ratones silvestres y *Stat6*^{-/-} tratados con TNBS. Los resultados de la aplicación del análisis de correlación de Spearman se consideraron significativos (*) con p < 0.05.

1.3. *Wnt6* está regulado al alza en la mucosa colónica y en células positivas para CD16 de ratones deficientes en *Stat6* tratados con TNBS

Con la intención de determinar la contribución de los macrófagos al desarrollo de la fibrosis, analizamos en primer lugar la expresión de mediadores involucrados en este proceso, como los ligandos *Wnt* y *Tgfβ* en el tejido colónico. Los resultados revelan niveles significativamente mayores de ARNm de *Tgfβ* en ratones *Stat6*^{-/-} tratados con vehículo y TNBS. De todos los ligandos Wnt analizados (*Wnt2b*, *Wnt6*, *Wnt7b*, *Wnt10a* y *Wnt10b*), solo se detectó una expresión consistente en los casos de *Wnt2b*, *Wnt6* y *Wnt10a*. La expresión de *Wnt2b* no mostró ninguna variación significativa entre los grupos, mientras que la de *Wnt6* y *Wnt10a* aumentó significativamente en los animales *Stat6*^{-/-} tratados con TNBS (**Figura IV. 4a**). Paralelamente, este último grupo mostró un aumento significativo en la expresión del gen diana de la ruta Wnt, *C-Myc* ($1,8 \pm 0,2$ veces la inducción en animales *Stat6*^{-/-} tratados con TNBS frente a $0,8 \pm 0,1$ veces la inducción en animales silvestres tratados con TNBS, $p < 0,05$) (**Figura IV. 4b**). A continuación, en un intento por discernir la participación de los MΦ en este patrón de expresión del ligando, realizamos un análisis de correlación y los resultados mostraron una relación significativa y positiva entre la expresión de *Wnt6* y la de *CD16* y *Stat3* en ratones *Stat6*^{-/-}, pero no en el grupo de ratones silvestres. Además, los niveles de ARNm de *Tgfβ* se correlacionaron positivamente con los de *CD16* en animales silvestres y *Stat6*^{-/-} (**Figura IV. 4c**).

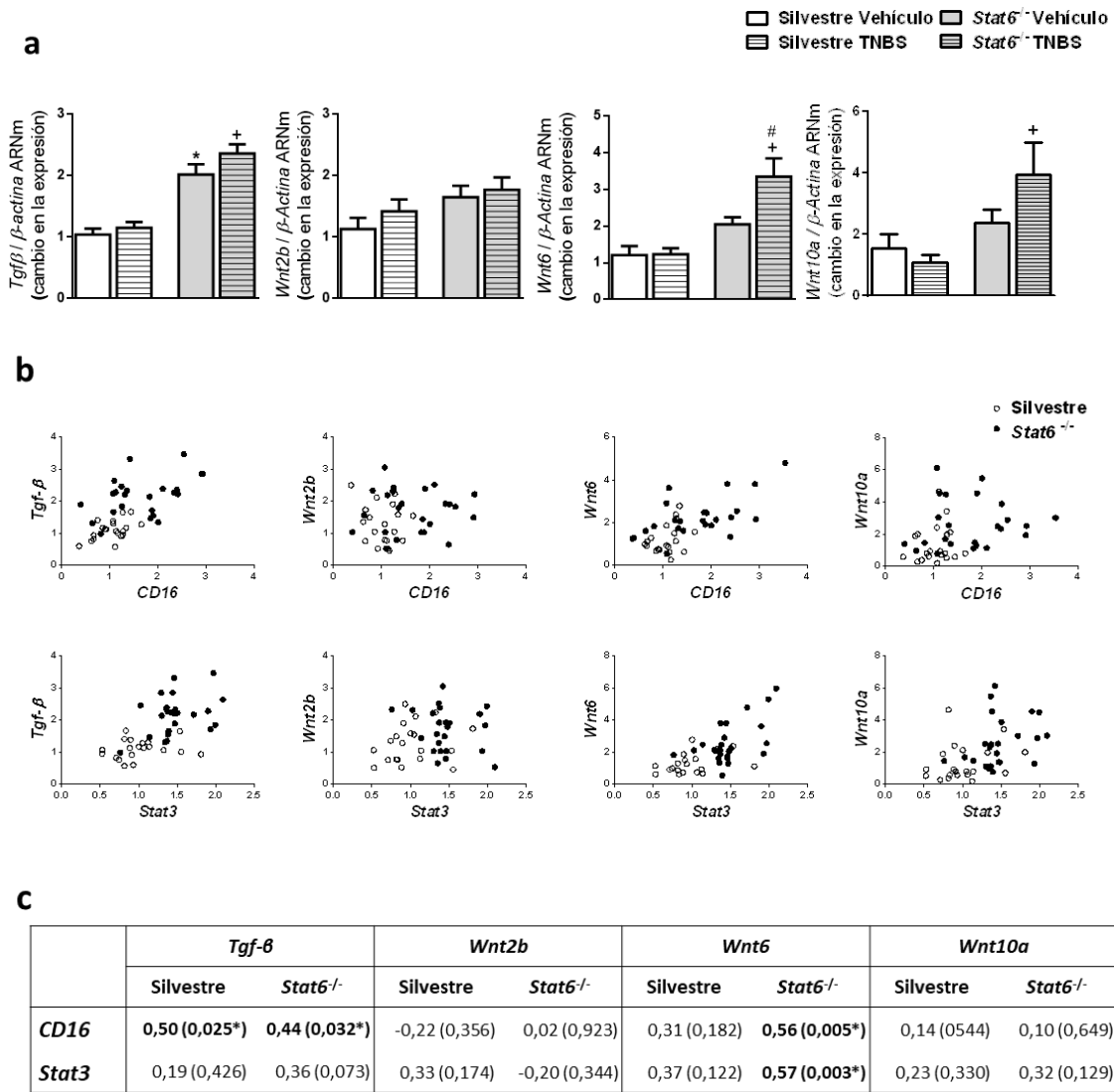


Figura IV. 4 Wnt6 está regulado al alza en la mucosa colónica de ratones deficientes en Stat6 tratados con TNBS. Los ratones de tipo silvestre y Stat6^{-/-} recibieron una administración intrarrectal semanal de TNBS o vehículo durante 6 semanas y fueron sacrificados 7 días después de la última dosis. Los gráficos muestran (a) la expresión del ARNm colónico del factor de crecimiento transformante β (TGFβ), Wnt2b, Wnt6 y Wnt10a, (b) la relación entre la expresión de estos mediadores y la del marcador de MΦ CD16 y el factor de transcripción Stat3 en ratones silvestres y Stat6^{-/-} tratados con TNBS o vehículo, (c) los resultados de aplicar el análisis de correlación de Spearman r (P) a estos conjuntos de datos. Los datos en los gráficos corresponden a los valores relativos frente a la expresión del gen constitutivo Actb y se calculan como el cambio en la expresión frente al grupo de silvestre-vehículo. Las barras representan la media ± s.e.m. de al menos 10 animales por grupo experimental. Las diferencias significativas entre los grupos se muestran mediante * p < 0.05 frente a silvestre vehículo, + p < 0.05 vs silvestre TNBS y # p < 0.05 vs Stat6^{-/-} vehículo, y las correlaciones se consideraron significativas (*) con p < 0.05.

La contribución de los MΦ a la expresión de ligandos Wnt en la mucosa se analizó adicionalmente mediante RT-PCR en MΦ aislados de la mucosa al final del período experimental de seis semanas según su positividad para CD16. Estos MΦ mostraron una expresión incrementada de Stat3 y Wnt6 cuando se aislaron de ratones deficientes en Stat6 tratados con TNBS, pero no cuando provenían de animales silvestres (Figura IV. 5).

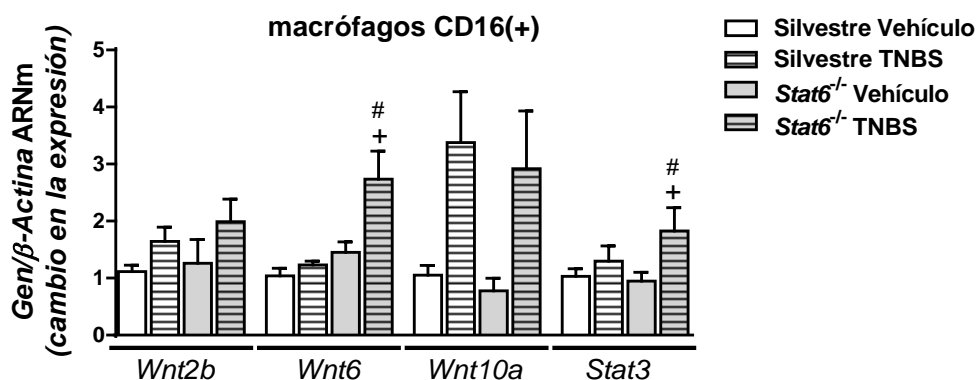


Figura IV. 5 *Wnt6* está regulado al alza en macrófagos positivos para CD16 de ratones deficientes en *Stat6* tratados con TNBS. Los ratones de tipo silvestre y *Stat6*^{-/-} recibieron una administración intrarrectal semanal de TNBS o vehículo durante 6 semanas y fueron sacrificados 7 días después de la última dosis. El gráfico muestra la expresión de ligandos *Wnt* y de *Stat3* en MΦ CD16 + aislados de la mucosa de ratones silvestres y *Stat6*^{-/-} tratados con TNBS o vehículo. Los datos en los gráficos corresponden a los valores relativos frente a la expresión del gen constitutivo Actb y se calculan como el cambio en la expresión frente al grupo de silvestre-vehículo. Las barras en los gráficos representan la media ± s.e.m. de al menos 5 animales por grupo experimental. Las diferencias significativas entre los grupos se muestran mediante + $p < 0.05$ vs silvestre TNBS y # $p < 0.05$ vs *Stat6*^{-/-} vehículo.

1.4. La administración de macrófagos silvestres tratados con IL4 a ratones deficientes en *Stat6* reduce la fibrosis

Se obtuvieron MΦ murinos peritoneales de ratones silvestres y *Stat6*^{-/-} y se polarizaron *in vitro* mediante incubación con IL4, lo que provocó un aumento en la expresión del ARNm de *Wnt2b* y *Wnt10a* en MΦ silvestres pero no en células deficientes en *Stat6*. No se observó ningún cambio significativo entre las dos poblaciones con respecto a la expresión de *Wnt6* (Figura IV. 6a).

Los MΦ-IL4 se administraron por vía intraperitoneal a ratones *Stat6*^{-/-}, 2 días después de cada dosis de TNBS para reproducir la respuesta observada en animales silvestres después de la administración de TNBS. Como se muestra en la Figura IV. 6b, la tasa de mortalidad se redujo en ratones que recibieron MΦ exógenos en comparación a lo observado en ratones deficientes en *Stat6* que recibieron solo TNBS, aunque la protección solo alcanzó significación estadística cuando los MΦ administrados eran de donantes silvestres. Además, los ratones que recibieron MΦ silvestres presentaron valores más altos de peso corporal durante todo el período experimental pero sin alcanzar significación estadística (Figura IV. 6c).

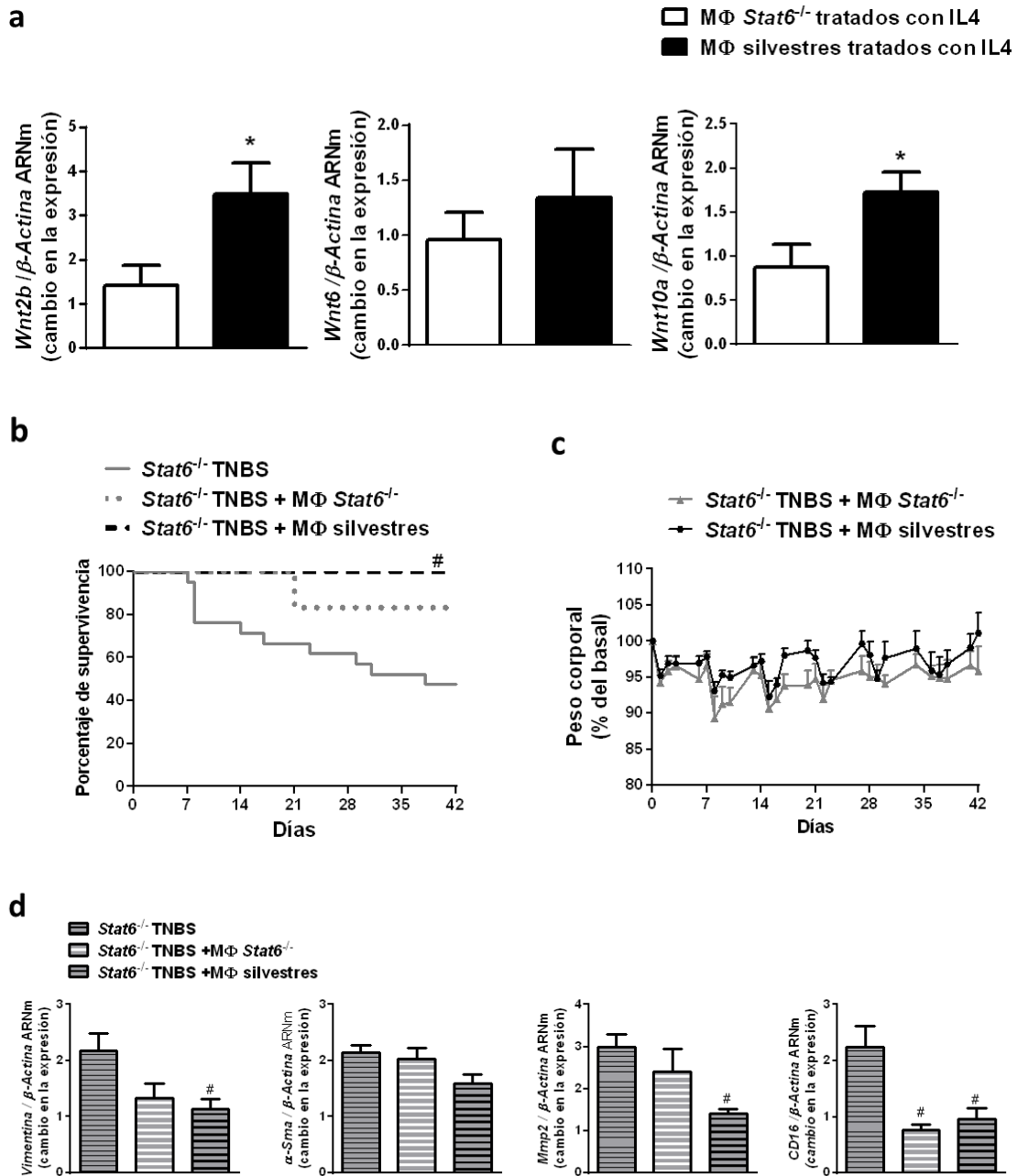


Figura IV. 6 La transferencia de macrófagos silvestres tratados con IL4 a ratones deficientes en *Stat6* reduce la fibrosis. Los MΦ peritoneales (MΦ) de ratones de tipo silvestre y de *Stat6*^{-/-} se trataron con interleucina 4 (IL4) y se analizaron para determinar la expresión de ligandos Wnt. Estas células se inyectaron semanalmente ($2 \cdot 10^6$ MΦ, i.p.) a ratones *Stat6*^{-/-} tratados con TNBS, 2 días después de cada administración de TNBS y los ratones se sacrificaron 5 días después de la sexta inyección de MΦ. Los gráficos muestran (a) la expresión de ARNm de Wnt2b, Wnt6 y Wnt10a en MΦ silvestres y *Stat6*^{-/-} tratados con IL4, expresados como valores relativos frente a la expresión del gen constitutivo *Actb* y representados como cambio en la expresión frente a MΦ *Stat6*^{-/-}, (b) porcentaje de supervivencia, (c) peso corporal como porcentaje del peso inicial y (d) expresión de ARNm colónico de Vimentina, α Sma, Mmp-2 y CD16. Datos de ARNm expresados como valores relativos frente a la expresión del gen constitutivo *Actb* y representados como cambio en la expresión frente a silvestre-vehículo. Los puntos o barras en los gráficos representan la media \pm s.e.m. de 5-6 datos. Las diferencias significativas entre los grupos se muestran mediante * $p < 0,05$ frente a los MΦ *Stat6*^{-/-} tratados con IL4, y # $p < 0,05$ frente al grupo *Stat6*^{-/-} TNBS.

Los ratones deficientes en *Stat6* tratados con MΦ silvestres polarizados con IL4 mostraron una expresión reducida de ARNm de los marcadores Vimentina, α Sma y

Mmp2, mientras que la expresión de *CD16* se redujo significativamente en los dos subgrupos de ratones receptores (**Figura IV. 6d**). En conjunto, estos resultados sugieren que la administración de MΦ tratados con IL4, que señalizan a través de Stat6, aceleran la reparación de la mucosa en ratones *Stat6*^{-/-} tratados con TNBS y previenen el desarrollo de fibrosis.

2. Caracterización del fenotipo macrofágico y de la ruta WNT en las complicaciones asociadas a la EC

2.1. La TEM está incrementada en muestras intestinales que rodean el tracto de la fístula en pacientes con EC

Las tinciones tricrómica de Masson y Sirirus Red revelaron la deposición de colágeno en muestras intestinales de la estenosis en pacientes con EC B2 y del intestino que rodea el tracto de la fístula de pacientes con EC B3 (**Figura IV. 7a**). La cuantificación del colágeno mediante el software Image J mostró niveles más altos en los pacientes con EC B3 que en los pacientes con EC B2 (**Figura IV. 7b**).

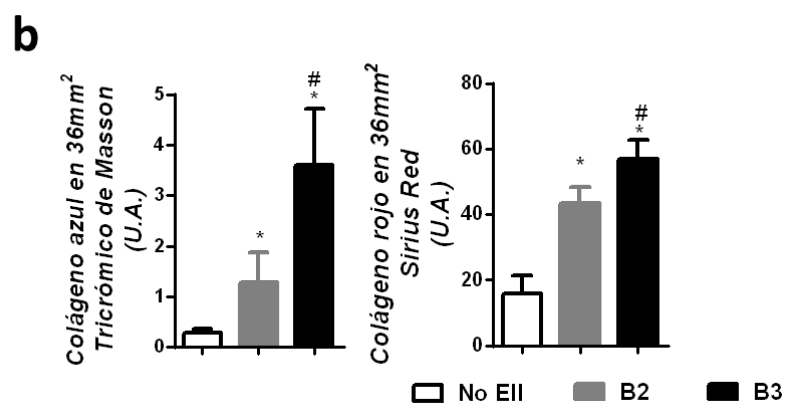
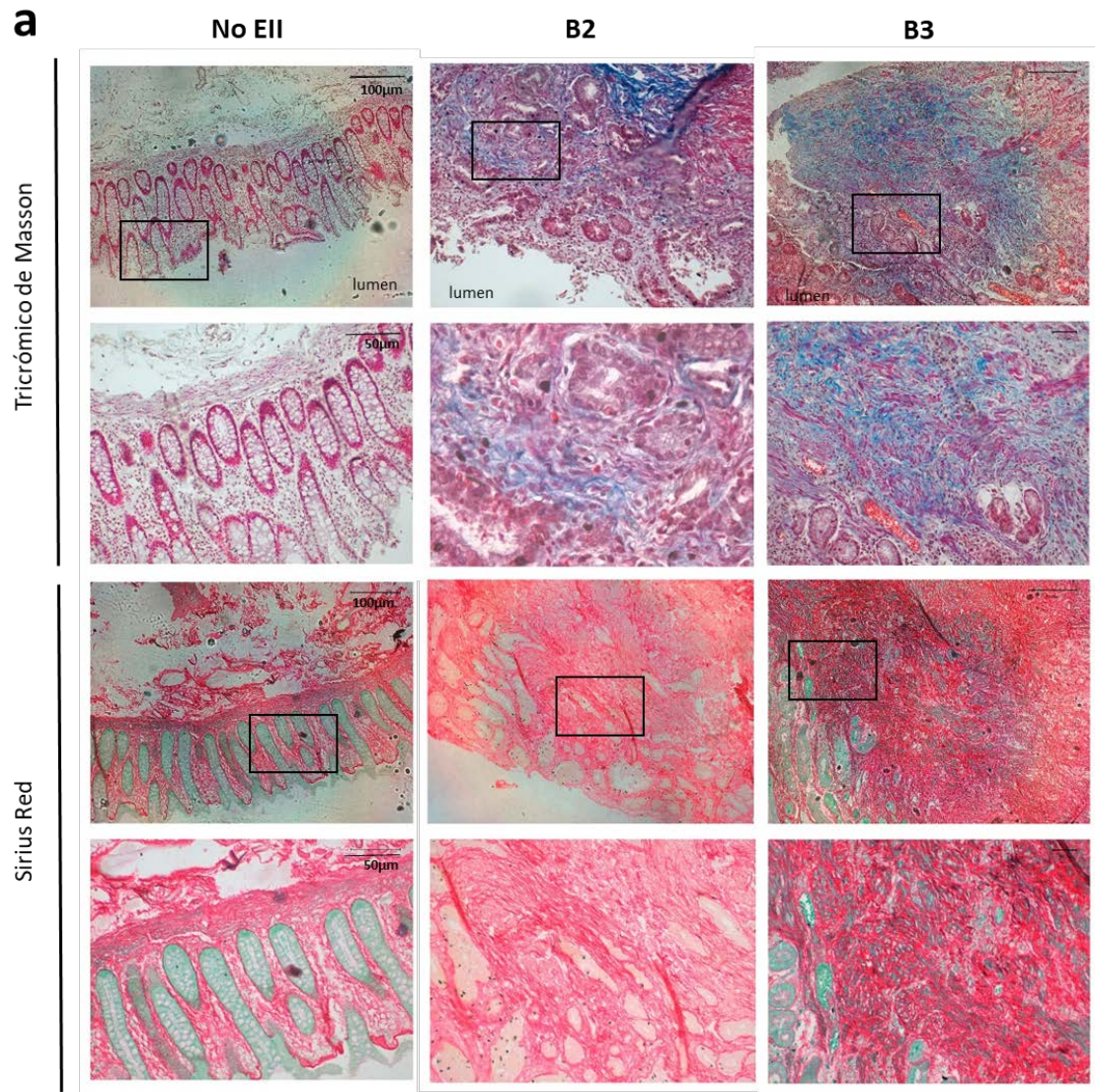


Figura IV. 7 Incremento de la presencia de colágeno en muestras intestinales que rodean el tracto de la fístula. Se obtuvieron resecciones quirúrgicas de pacientes sin EII, con EC B2 y con EC B3 y se fijaron para el análisis histológico. a) Imágenes representativas que muestran la deposición de colágeno (barras de escala de 50 y 100 µm), b) los gráficos muestran la cuantificación de la deposición de colágeno en el tejido intestinal por medio de las tinciones tricrómica de Masson y Sirius Red. Las barras representan la media ± s.e.m. de al menos veinte pacientes por grupo experimental y las diferencias significativas se muestran con * P <0.05 frente al grupo sin EII y con #P <0.05 frente al grupo B2.

El análisis de marcadores de fibrosis mostró un aumento en la expresión, tanto de ARNm de *COL3A1* como de proteína y ARNm de *COL1A1* en muestras de pacientes con EC (Figura IV. 8a-b). La expresión de *COL4A1* aumentó significativamente solo en muestras de pacientes con EC B3 (Figura IV. 8a).

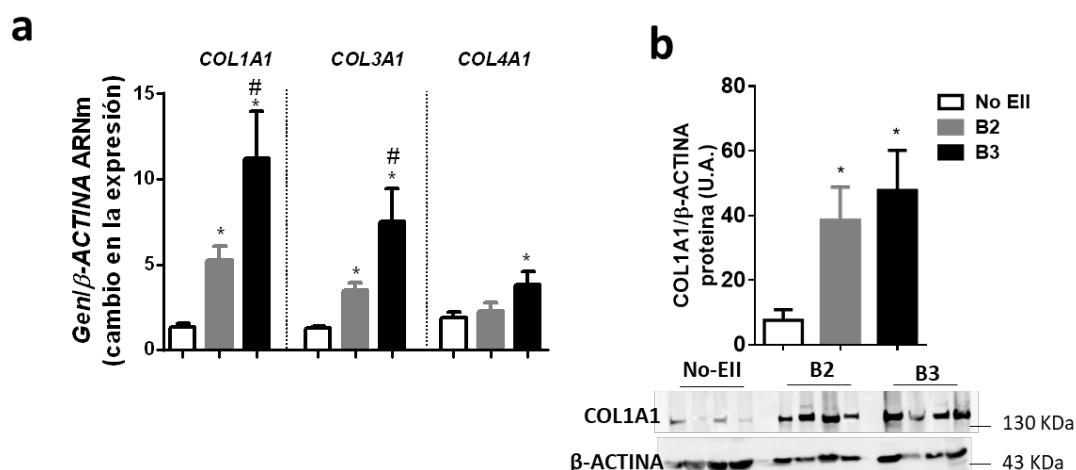


Figura IV. 8 La expresión génica y proteica de colágeno está incrementada en muestras intestinales que rodean el tracto de la fístula. Se obtuvieron resecciones quirúrgicas de pacientes sin EII, con EC B2 y con EC B3 y se congelaron para el análisis de PCRq. a) Los gráficos muestran la expresión de ARNm de varios colágenos y b) gráfico y WB representativo de un total de cuatro muestras que refleja los niveles de proteína de *COL1A1* en el tejido intestinal. En todos los casos, los datos corresponden a valores relativos frente a la expresión del gen constitutivo *ACTB* y se calculan como cambio en la expresión frente al grupo sin EII. Las barras representan la media \pm s.e.m. de al menos veinte pacientes por grupo experimental y las diferencias significativas frente al grupo sin EII se muestran con * $P < 0.05$ y frente al grupo con EC B2 con # $P < 0.05$.

Con el fin de analizar el proceso de TEM se realizaron estudios de inmunofluorescencia utilizando un marcador de células epiteliales, E-CADHERINA, junto con un marcador de células mesenquimales, VIMENTINA. Los resultados revelaron una colocalización de la E-CADHERINA con la VIMENTINA, sugiriendo la presencia de TEM en las criptas de tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula. Este fenómeno rara vez se observó en muestras de pacientes con EC B2 o muestras de pacientes sin EII (Figura IV. 9).

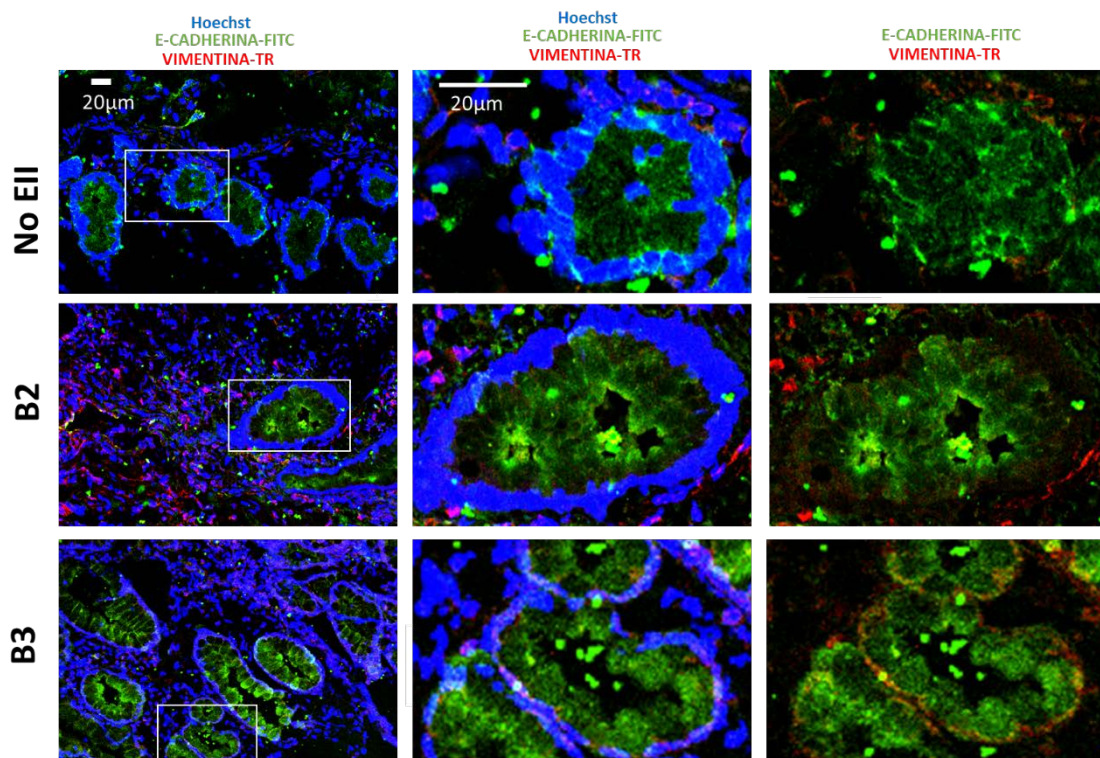


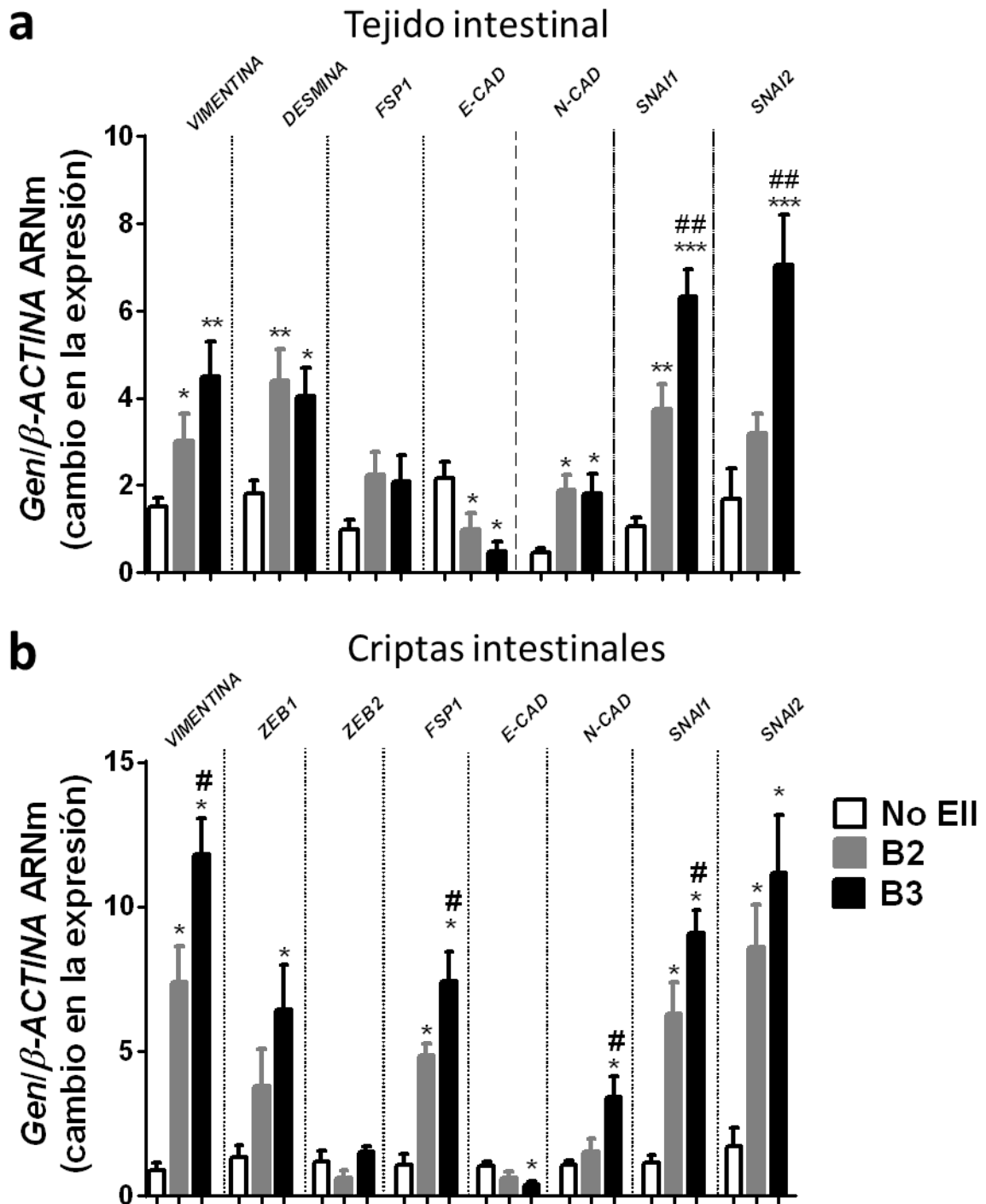
Figura IV. 9 Incremento de la TEM en muestras intestinales que rodean el tracto de la fistula. Se obtuvieron resecciones quirúrgicas de pacientes sin EII, con EC B2 y con EC B3 y se congelaron para el análisis de inmunofluorescencia. Imágenes representativas que muestran VIMENTINA (Tex Red), E-CADHERINA (FITC) y tinción nuclear (Hoechst) en tejido intestinal (barras de escala 20 μ m).

De forma paralela a los estudios de inmunofluorescencia, el análisis cuantitativo mediante PCRq mostró un aumento significativo en la expresión de *VIMENTINA* y otras proteínas mesenquimales (*DESMINA* y *N-CADHERINA*) junto con una disminución en la expresión de ARNm y proteína de *E-CADHERINA* en muestras de pacientes con EC en comparación con los pacientes sin EII (**Figura IV. 10a**). El aumento de la expresión de ARNm de los factores de transcripción implicados en TEM, *SNAI1* y *SNAI2*, también se detectó en pacientes con EC, y los niveles fueron significativamente más altos en pacientes con EC B3 que con EC B2.

El análisis de la expresión de estos genes en criptas intestinales aisladas obtenidas de las mismas muestras, mostró niveles más altos de los marcadores *VIMENTINA*, *FSP1* y *N-CADHERINA* en los pacientes con EC B3 que en pacientes con EC B2. Esto se asoció con una expresión reducida de *E-CADHERINA* (**Figura IV. 10b**). En estas mismas criptas, la expresión del ARNm de *SNAI1* y *SNAI2*, fue más elevada en muestras de pacientes con EII que en muestras de pacientes sin EII y en particular, la expresión de

SNAI1 fue mayor en los pacientes con EC B3 que en los pacientes con EC B2. La expresión de ZEB1 sólo aumentó significativamente en los pacientes con EC B3 (Figura IV. 10b).

La expresión de la proteína E-CADHERINA en el tejido intestinal disminuyó en todos los pacientes con EC, independientemente de su comportamiento clínico (Figura IV. 10c).



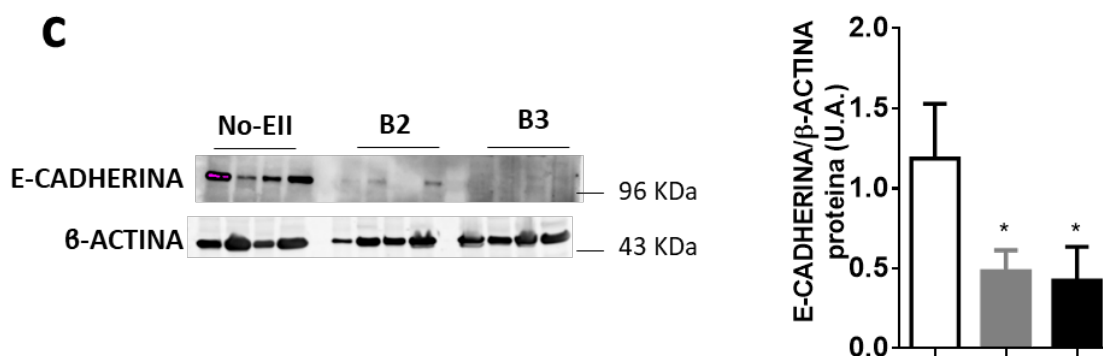


Figura IV. 10 Incremento en la expresión de marcadores de TEM en muestras intestinales que rodean el tracto de la fístula. Se obtuvieron resecciones quirúrgicas de pacientes sin EII, con EC B2 y con EC B3 y se congelaron para el análisis de qRT-PCR. a) El gráfico muestra la cuantificación de la expresión de ARNm de genes relacionados con la TEM en tejido intestinal completo, b) el gráfico muestra la cuantificación de la expresión de ARNm de genes relacionados con la TEM en criptas intestinales aisladas y c) WB representativo de un total de cuatro muestras que revela los niveles de proteína E-CADHERINA del tejido intestinal. En todos los casos, los datos corresponden a valores relativos frente a la expresión del gen constitutivo ACTB y se calculan como cambio en la expresión frente al grupo sin EII. Las barras representan la media \pm s.e.m. de al menos veinte pacientes por grupo experimental y las diferencias significativas con respecto al grupo sin EII se muestran con * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ o *** $P < 0.001$ y frente a las muestras de EC B2 con # $P < 0.05$ o ## $P < 0.01$.

La expresión del ARNm de citocinas proinflamatorias *IL1 β* , *IL6* e *IL8* fue significativamente más elevada en las muestras de pacientes con EC que en las muestras de pacientes sin EII, aunque el aumento solo alcanzó significación estadística en los pacientes con EC B3 para *IL1 β* e *IL6* (Figura IV. 11).

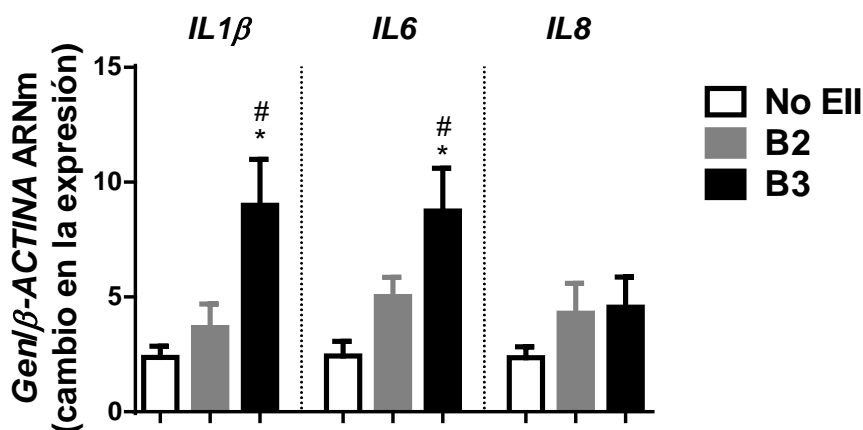


Figura IV. 11 Incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias en muestras intestinales que rodean el tracto de la fístula. Se obtuvieron resecciones quirúrgicas de pacientes sin EII, con EC B2 y con EC B3 y se congelaron para el análisis de qRT-PCR. El gráfico muestra la cuantificación de la expresión de ARNm de citocinas proinflamatorias. En todos los casos, los datos corresponden a valores relativos frente a la expresión del gen constitutivo ACTB y se calculan como cambio en la expresión frente al grupo sin EII. Las barras representan la media \pm s.e.m. de al menos veinte pacientes por grupo experimental y las diferencias significativas con respecto al grupo sin EII se expresan con * $P < 0.05$ y frente a las muestras de EC B2 con # $P < 0.05$.

2.2. La expresión de FZD4 epitelial y la señalización WNT aumentan en las muestras intestinales que rodean el tracto de la fístula en pacientes con EC

El análisis de la expresión de ARNm de los receptores FZD en el intestino humano mostró ligeras diferencias, no significativas, entre los pacientes sin EII y los pacientes con EC y sólo se detectó una disminución significativa de *FZD5* en el tejido de los pacientes con EC (**Tabla IV. 1a**). Sin embargo, la expresión proteica de *FZD4* fue significativamente mayor en el tejido de los pacientes con patrón fistulizante que en el de los controles o en pacientes con patrón estenosante (**Figura IV. 12**).

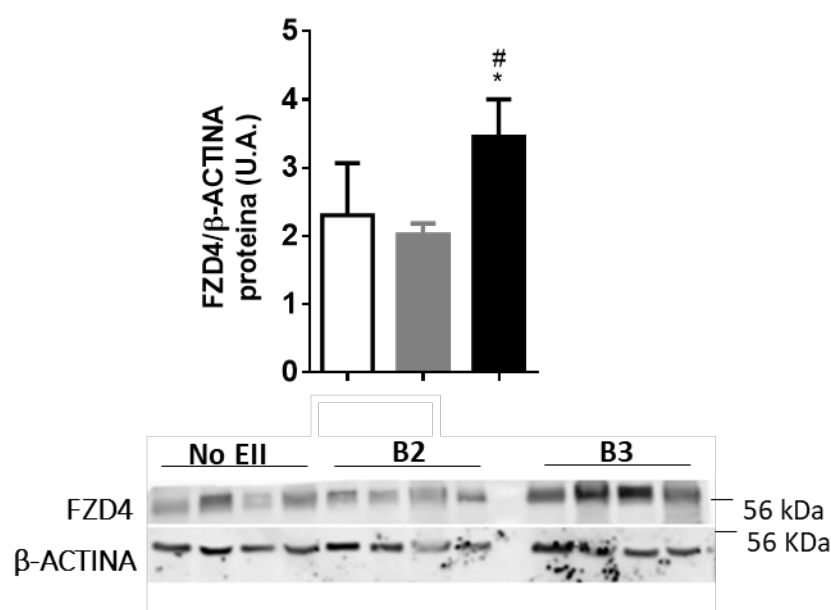


Figura IV. 12 La expresión proteica de *FZD4* aumenta en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula. Se obtuvieron resecciones quirúrgicas de pacientes sin EII, con EC B2 y con EC B3 y se congelaron para el análisis por WB. Se expone un WB representativo, de un total de cuatro, con los niveles de proteína de *FZD4* ($n = 4$). Las barras representan la media \pm s.e.m. de al menos cuatro pacientes por grupo experimental y las diferencias significativas frente al grupo sin EII se expresan con * $P < 0.05$, y frente a las muestras de EC B2 con # $P < 0.05$.

En criptas intestinales aisladas de pacientes con EC B3 la expresión de ARNm de *FZD4* es significativamente mayor que la observada en muestras de pacientes con EC B2 o sujetos sin EII (**Tabla IV. 1b**).

En fibroblastos humanos aislados de tejido intestinal, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de ARNm de los receptores FZD entre los pacientes con EC y sin EII (**Tabla IV. 1c**).

a**Tejido intestinal**

Δ Ct		FZD1	FZD2	FZD3	FZD4	FZD5	FZD6	FZD7	FZD8	FZD9	FZD10
No EII	Media \pm s.e.m.	17,2 \pm 0,68	11,0 \pm 0,25	9,6 \pm 0,33	8,1 \pm 0,49	11,1 \pm 0,27	8,9 \pm 0,3	7,0 \pm 0,2	18,6 \pm 0,6	16,0 \pm 0,5	13,0 \pm 0,3
	Mediana e intervalo	17,0 (14,1-20,8)	10,9 (8,6-13,5)	9,6 (6,8-13,8)	6,9 (5,4-11,1)	10,9 (9,2-13,6)	9,1 (6,4-11,3)	7,0 (5,5-9,9)	18,9 (15,6-21,2)	15,5 (10,5-19,9)	13,3 (8,7-14,8)
B2	Media \pm s.e.m.	17,2 \pm 0,45	10,2 \pm 0,23	10,0 \pm 0,5	7,7 \pm 0,5	12,8 \pm 0,4*	7,9 \pm 0,4	6,9 \pm 0,2	18,6 \pm 1,1	15,1 \pm 0,4	12,2 \pm 0,3
	Mediana e intervalo	17,2 (13,5-20,0)	10,0 (8,0-14,1)	9,3 (6,5-16,65)	6,4 (1-13,3)	12,5 (9,5-17,3)	8,2 (2,4-12,7)	7,0 (2,7-11,3)	18,4 (10,9-27,0)	15,0 (8,8-20,4)	12,7 (9,1-16,2)
B3	Media \pm s.e.m.	18,4 \pm 0,66	10,1 \pm 0,41	9,2 \pm 0,32	7,8 \pm 0,65	13,0 \pm 0,6*	7,8 \pm 0,4	7,1 \pm 0,2	15,8 \pm 1,5	16,4 \pm 0,4	11,4 \pm 0,8
	Mediana e intervalo	17,8 (15,7-25,4)	10,4 (6,2-12,7)	9,6 (5,8-11,4)	8,8 (2,4-11,4)	12,9 (9,3-20,5)	8,1 (2,5-10,3)	7,1 (3,8-9,1)	16,0 (6,4-25,1)	16,5 (13,3-20,1)	12,1 (1-15,7)

b**Criptas intestinales**

Δ Ct		FZD1	FZD2	FZD3	FZD4	FZD5	FZD6	FZD7	FZD8	FZD9	FZD10
No EII	Media \pm s.e.m.	16,6 \pm 0,1	7,1 \pm 0,1	13,7 \pm 0,1	4,9 \pm 0,03	8,5 \pm 0,01	10,0 \pm 0,2	5,7 \pm 0,06	18,3 \pm 0,2	7,7 \pm 0,1	4,9 \pm 0,2
	Mediana e intervalo	16,5 (16,3-17,0)	7,0 (6,9-7,3)	13,3 (13,5-13,9)	4,9 (4,8-4,9)	8,5 (8,5-8,5)	10,0 (9,7-0,2)	5,6 (5,6-5,8)	18,3 (18,1-18,5)	7,7 (7,5-7,9)	4,9 (4,5-5,4)
B2	Media \pm s.e.m.	21,3 \pm 2,7*	7,5 \pm 0,9	13,1 \pm 0,5	5,0 \pm 0,6	11,7 \pm 0,6*	12,2 \pm 1,1	5,6 \pm 0,8	16,0 \pm 0,6	8,4 \pm 0,8	5,5 \pm 0,8
	Mediana e intervalo	21,3 (19,4-23,4)	7,0 (6,1-9,4)	13,3 (12,0-13,9)	4,7 (4,1-6,3)	12,0 (10,5-12,6)	12,1 (11,1-13,3)	5,2 (4,5-7,2)	16,0 (15,5-16,4)	8,0 (7,3-10,1)	4,9 (4,4-7,5)
B3	Media \pm s.e.m.	17,9 \pm 0,1	4,9 \pm 0,8	12,1 \pm 0,6	2,6 \pm 0,5*#	10,6 \pm 0,3*	10,5 \pm 0,5	5,3 \pm 0,8	18,8 \pm 0,9	9,6 \pm 2,6	3,7 \pm 0,5
	Mediana e intervalo	17,9 (17,7-18,1)	5,6 (3,3-6,0)	11,9 (11,6-12,8)	3,2 (1,4-3,2)	10,5 (10,0-11,3)	10,1 (9,6-11,5)	5,8 (3,8-6,5)	18,8 (17,8-19,8)	9,6 (7,0-12,3)	3,8 (2,6-4,6)

c

Fibroblastos

ΔCt		FZD1	FZD2	FZD3	FZD4	FZD5	FZD6	FZD7	FZD8	FZD9	FZD10
No EII	Media \pm SEM	15,3 \pm 0,3	7,5 \pm 0,1	17,4 \pm 0,5	8,0 \pm 0,2	>18,6 \pm 1,0	7,2 \pm 0,2	8,0 \pm 0,5	>20,0 \pm 0,1	13,8 \pm 0,6	16,4 \pm 0,3
	Mediana e intervalo	15,1 (14,8-15,9)	7,4 (7,3-7,8)	16,9 (16,8-18,5)	7,9 (7,8-8,3)	17,7 (17,5-20,6)	7,0 (6,9-7,7)	7,6 (7,4-9,0)	20,0 (19,9-20,2)	13,5 (12,9-14,9)	16,6 (15,8-16,7)
B2	Media \pm SEM	17,4 \pm 0,5*	7,6 \pm 0,1	14,9 \pm 0,6	8,0 \pm 0,5	>14,0 \pm 0,3*	7,4 \pm 0,3	6,8 \pm 0,2	>23,2 \pm 2,2	16,1 \pm 0,1*	19,2 \pm 1,0
	Mediana e intervalo	17,3 (16,5-18,6)	7,6 (7,3-7,8)	14,8 (13,5-16,5)	8,1 (6,9-9,0)	14,1 (13,3-14,7)	7,6 (6,6-7,9)	6,8 (6,2-7,4)	21,3 (20,8-27,5)	16,1 (15,8-16,4)	18,5 (17,9-21,0)
B3	Media \pm SEM	18,3 \pm 0,6**	7,9 \pm 0,0	14,0 \pm 0,9*	8,0 \pm 0,1	>15,1 \pm 1,1	7,6 \pm 0,2	7,3 \pm 0,6	>21,9 \pm 0,7	16,5 \pm 1,0	19,1 \pm 0,6
	Mediana e intervalo	18,4 (17,3-19,3)	7,9 (7,8-8,0)	14,2 (12,4-15,4)	8,0 (7,9-8,1)	14,5 (13,5-17,3)	7,4 (7,3-8,0)	7,4 (6,2-8,3)	21,5 (20,923,1)	16,4 (15,0-18,3)	18,6 (18,5-20,2)

d

Tejido intestinal

ΔCt		WNT1	WNT2	WNT2B	WNT3	WNT4	WNT5A	WNT5B	WNT6	WNT9A	WNT9B	WNT10A	WNT10B
No EII	Media \pm SEM	16,1 \pm 0,3	13,6 \pm 0,3	11,0 \pm 0,2	12,9 \pm 0,2	13,1 \pm 0,2	13,9 \pm 0,2	14,6 \pm 0,8	14,7 \pm 0,2	11,5 \pm 0,1	16,1 \pm 0,6	15,1 \pm 0,2	14,9 \pm 0,2
	Mediana e intervalo	16,2 (12,2-24,7)	14,1 (8,7-19,0)	10,7 (9,0-15,7)	13,0 (8,9-17,4)	12,8 (10,1-17,3)	13,9 (10,9-16,9)	15,5 (1-19,85)	14,4 (13-18,9)	11,4 (7,5-14,9)	11,4 (10,8-23,1)	14,7 (12,4-20,7)	14,8 (11,6-18,6)
B2	Media \pm SEM	17,0 \pm 0,9	12,2 \pm 0,3*	12,2 \pm 0,5*	12,0 \pm 0,2*	13,1 \pm 0,3	14,1 \pm 0,3	15,1 \pm 0,8	13,0 \pm 0,2*	11,3 \pm 0,4	16,4 \pm 0,5	14,0 \pm 0,3*	13,7 \pm 0,4*
	Mediana e intervalo	15,9 (9,2-28,1)	12,1 (9,8-16,6)	11,3 (9,3-23,8)	12,2 (9,7-14,3)	13,6 (8,8-17,0)	14,5 (9,7-17,4)	15,4 (7,1-28,1)	12,9 (10,4-15,6)	10,9 (7,5-21,2)	11,4 (12,1-20,4)	13,3 (10,0-17,4)	4,9 (11,0-16,1)
B3	Media \pm SEM	15,0 \pm 0,3	11,8 \pm 0,4*	9,8 \pm 0,2*#	11,15 \pm 0,1*	13,7 \pm 0,4	13,6 \pm 0,4	15,0 \pm 0,6	13,1 \pm 0,1*	11,3 \pm 0,4	15,0 \pm 0,7	14,0 \pm 0,3*	13,3 \pm 0,5*
	Mediana e intervalo	15,4 (12,5-17,3)	11,6 (8,8-16,6)	9,8 (8,5-11,1)	12,2 (10,1-12,7)	13,6 (9,9-17,5)	10,1 (8,4-16,2)	14,9 (11,8-22,0)	13,1 (12-14,2)	11,3 (8,2-17,4)	14,8 (9,3-19,6)	13,8 (11,7-16,5)	3,8 (10,0-16,1)

Tabla IV. 1 Análisis de la expresión de ARNm de receptores FZD y ligandos WNT en tejido intestinal, criptas intestinales y fibroblastos de pacientes con EC y sin EII. Las tablas muestran la expresión relativa del ARNm de los ligandos WNT y los receptores FZD frente al gen constitutivo ACTB en la mucosa intestinal (a, d, n = 20), criptas intestinales (b, n = 6) y fibroblastos (c, n = 6) y los valores corresponden a la media del ΔCt (CT del gen analizado – CT del gen constitutivo) \pm s.e.m. Las diferencias significativas frente a los respectivos pacientes sin EII se expresan con * P <0.05 o ** P <0.05 y frente a pacientes con EC B2 con #P <0.05.

La vía de señalización de WNT se analizó mediante la determinación de los niveles de la proteína β -CATENINA y la expresión de ARNm de los genes diana de WNT. La inmunohistoquímica muestra la presencia de β -CATENINA principalmente en las células epiteliales del tejido intestinal (**Figura IV. 13a**).

El análisis de WB reveló que los niveles de la proteína β -CATENINA fueron mayores en las criptas intestinales de pacientes con EC B3 que en los pacientes sin EII o pacientes con EC B2 (**Figura IV. 13b**).

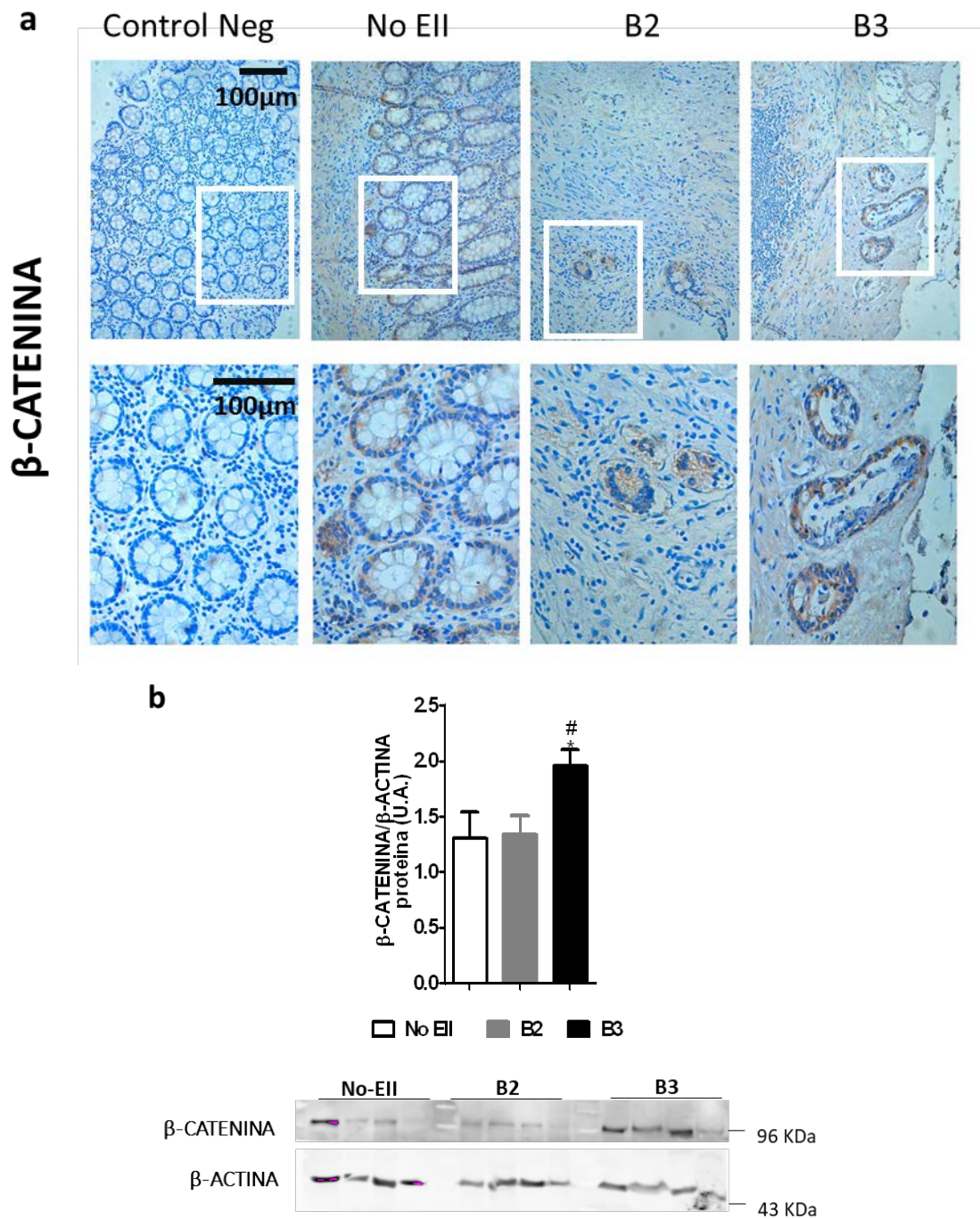


Figura IV. 13 La expresión de β-CATENINA epitelial aumenta en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fistula. Se obtuvieron resecciones quirúrgicas de pacientes sin EII, con EC B2 y con EC B3, se fijaron para el análisis inmunohistoquímico o se congelaron para el análisis de WB. a) Imágenes representativas que muestran la inmunotinción con β-CATENINA en tejido intestinal (barras de escala 100 μm) (n = 5) y b) un WB representativo de un total de cuatro que muestra los niveles de proteína de β-CATENINA en criptas intestinales (n = 4). Los datos corresponden a valores relativos frente a los niveles de la proteína constitutiva β-ACTINA y se calculan como unidades arbitrarias (A.U.). Las barras representan la media ± s.e.m. de al menos cuatro pacientes por grupo experimental y las diferencias significativas frente al grupo sin EII se expresan con * P < 0.05, y frente al grupo con EC B2 con #P < 0.05.

La expresión de ARNm de los genes diana de la ruta WNT (*CMYC*, *LGR5*, *DKK1* y *CYCLINA D1*) fue significativamente mayor en el tejido intestinal y en las criptas intestinales de los pacientes con EC B3 que en los pacientes sin EII o con EC B2 (Figura IV. 14).

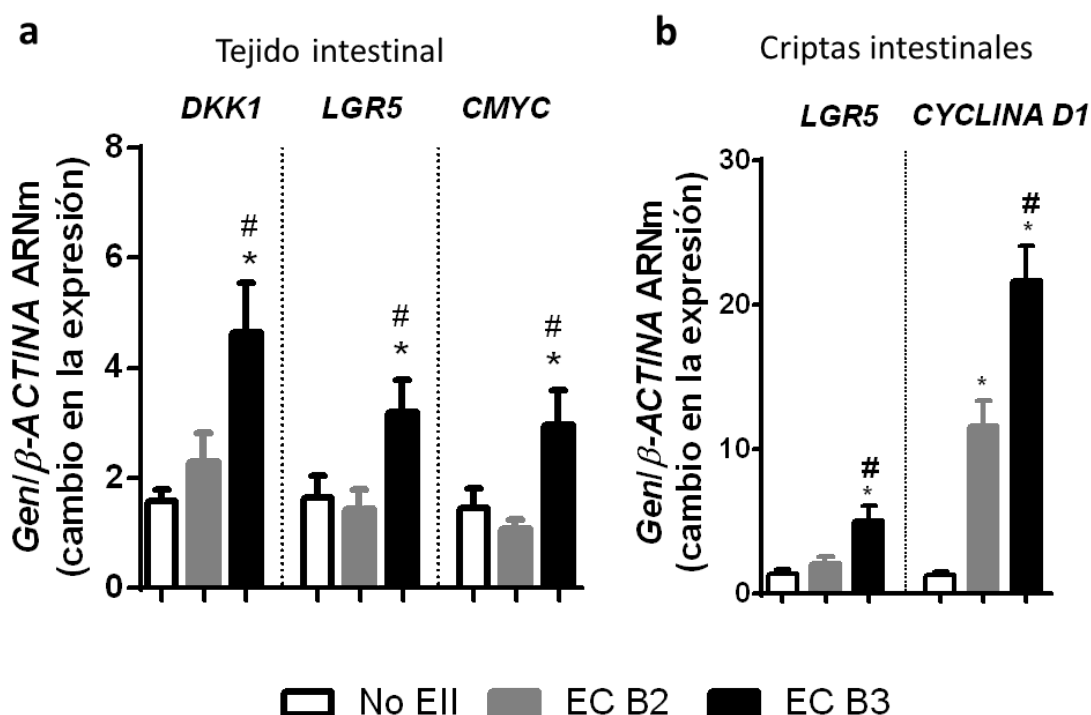


Figura IV. 14 La señalización de WNT aumenta en el tejido intestinal y en las criptas intestinales del tejido que rodea el tracto de la fístula. Se obtuvieron resecciones quirúrgicas de pacientes sin EII, con EC B2 y con EC B3 y se congelaron para el análisis de PCRq. Las gráficas muestran la expresión de ARNm de genes diana de WNT en a) tejido intestinal ($n = 25$) y b) criptas intestinales ($n = 5$). En todos los casos, los datos corresponden a valores relativos frente a la expresión del gen constitutivo *ACTB* y se calculan como cambio en la expresión frente al grupo sin EII. Las barras representan la media \pm s.e.m. de al menos cinco pacientes por grupo experimental y las diferencias significativas frente al grupo sin EII se expresan con * $P < 0.05$, y frente al grupo de EC B2 con # $P < 0.05$.

2.3. La expresión de WNT2B aumenta en las muestras intestinales que rodean el tracto de la fístula en pacientes con EC

El tejido intestinal de pacientes con EC presentó niveles más altos de *WNT2*, *WNT3*, *WNT6*, *WNT10A* y *WNT10B* que los observados en el tejido de pacientes sin EII (Tabla IV. 1d). La expresión de ARNm de *WNT2B* se redujo significativamente en las muestras de pacientes con EC B2, y aumentó significativamente en las de pacientes con EC B3, en comparación con el grupo sin EII (Figura IV. 15a). Esta sobreexpresión también se observó a nivel de proteína (Figura IV. 15b). El análisis inmunohistoquímico reveló la presencia de WNT2B tanto en células epiteliales como en células de la LP (Figura IV. 15c).

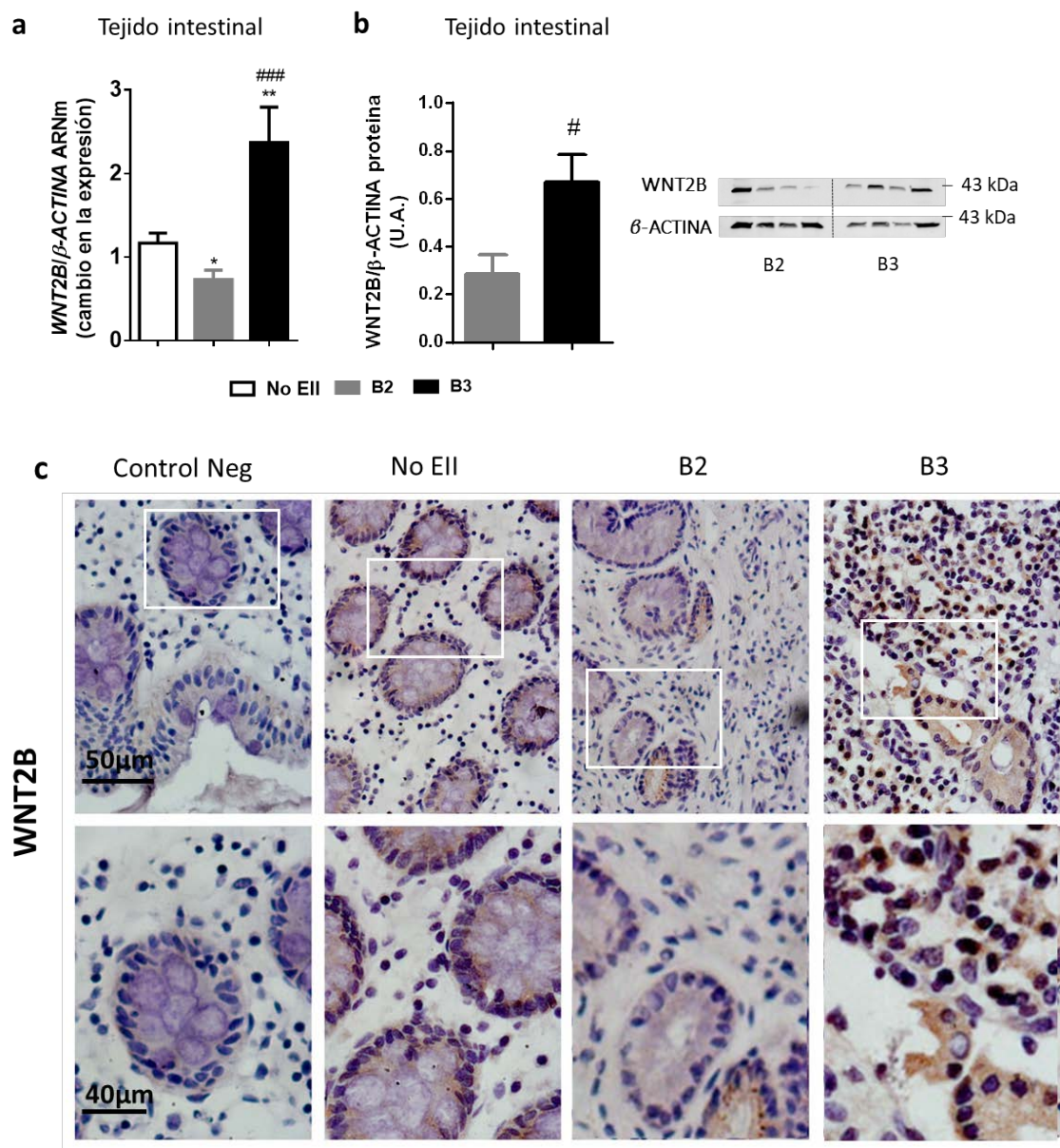


Figura IV. 15 La expresión de WNT2B aumenta en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula. Se obtuvieron resecciones quirúrgicas de pacientes sin EII, con EC B2 y con EC B3 y se congelaron para su análisis por WB y PCRq o se fijaron para su análisis inmunohistoquímico. a) El gráfico muestra la expresión de ARNm de WNT2B, b) gráfico y WB representativo de un total de cuatro que muestran los niveles de proteína de WNT2B en el tejido intestinal y c) imágenes representativas que muestran la inmunohistoquímica de WNT2B en tejido intestinal (barras de escala 50 μm y 40 μm). Las barras representan la media ± s.e.m. de al menos cinco pacientes por grupo experimental. Los datos corresponden a valores relativos frente a la expresión del gen constitutivo ACTB y se calculan como cambio en la expresión frente al grupo sin EII y las diferencias significativas frente al grupo sin EII se muestran con * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y frente al grupo de EC B2 con # $P < 0.05$ y ### $P < 0.001$.

2.4. Macrófagos CD16 + actúan como fuente de WNT2B en el tejido intestinal de pacientes con EC B3

Con el fin de determinar el posible origen macrófagico del ligando WNT2B realizamos estudios de citometría de flujo. El número total de MΦ presente en las resecciones intestinales de los pacientes con EC, tanto B2 como B3, fue superior al

detectado en los controles (**Figura IV. 16a**). Cuando se analizó el fenotipo de esos MΦ, se observó que todos expresaban de forma constitutiva CD206 y CD163, no encontrando diferencias entre los grupos. Sin embargo, se encontró un mayor número de MΦ positivos para CD16 y CD86 en pacientes con EC B3 en comparación con controles y pacientes con EC B2 (**Figura IV. 16b**). Estos datos se corroboraron mediante el estudio de la expresión génica de los mismos marcadores en el tejido intestinal (**Figura IV. 16c**). Un alto porcentaje de MΦ CD16 también fue positivo para CD86 en pacientes con EC B3 en comparación con los controles y pacientes con EC B2 (**Figura IV. 16d**).

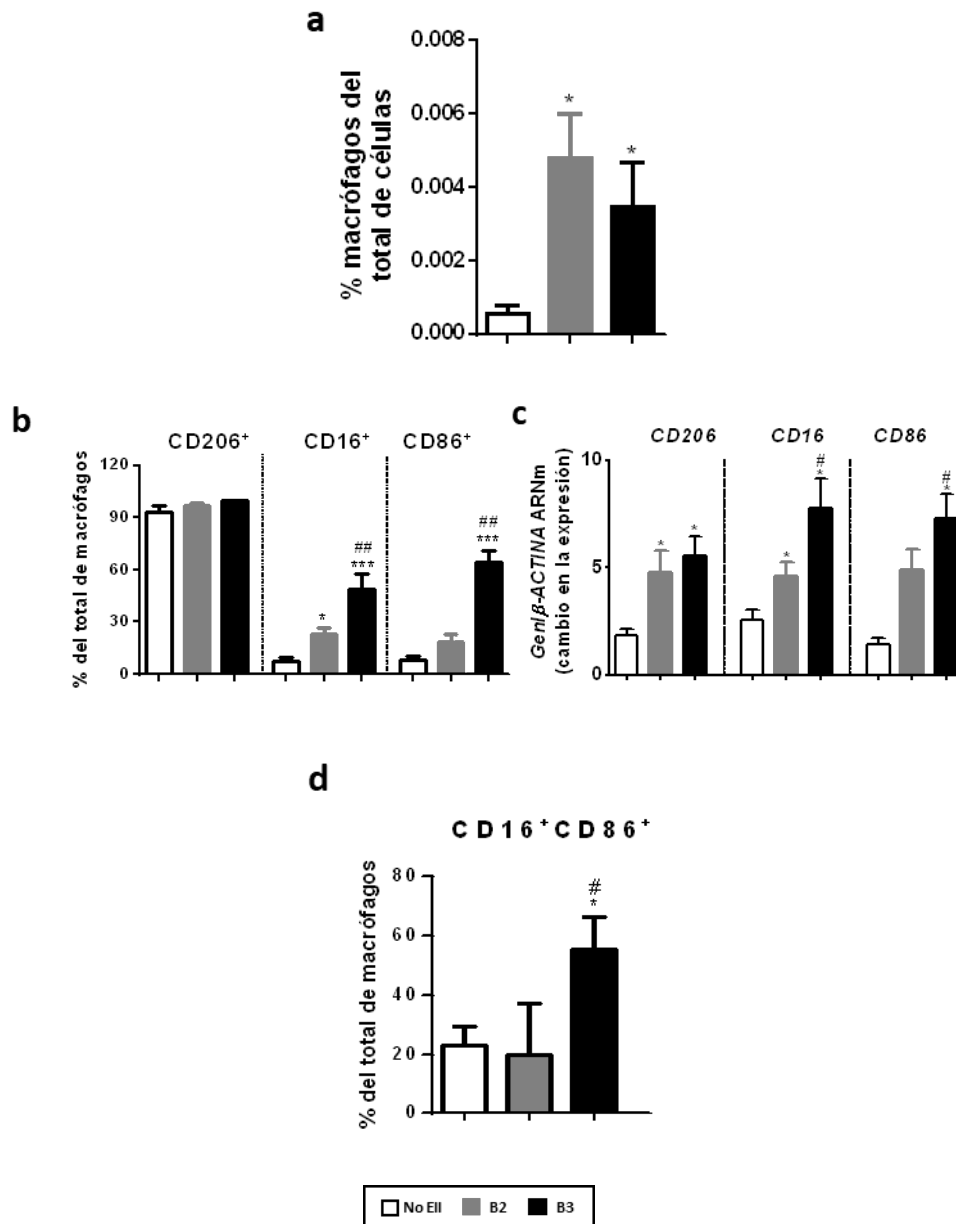


Figura IV. 16 Macrófagos CD16 + CD86 + son mas abundantes en el tejido intestinal de pacientes con EC B3. Se obtuvieron resecciones quirúrgicas de pacientes sin EII, con EC B2 y con EC B3 y se congelaron para el análisis de PCRq o se digirieron para su análisis por citometría de flujo. a) La gráfica muestra el porcentaje de células positivas para los marcadores, CD45, CD14 y CD64 y las diferencias significativas frente al grupo sin EII se muestran por * $P < 0.05$. b, d) Los gráficos muestran el porcentaje de M Φ positivos para los marcadores analizados y las diferencias significativas frente al grupo sin EII se muestran por * $P < 0.05$ y frente al grupo EC B2 se muestran por # $P < 0.05$ y c) los gráficos muestran la expresión relativa de ARNm frente al gen constitutivo ACTB y se representan como cambio en la expresión frente al grupo sin EII. Las barras representan la media \pm s.e.m. de treinta y nueve (No EII) veintinueve (B2) y diecinueve (B3) muestras y las diferencias significativas frente al grupo sin EII se muestran por * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y frente al grupo EC B2 se muestran por # $P < 0.05$ y ### $P < 0.001$.

Con el fin de conocer si los MΦ CD16 + expresaban WNT2B, se procedió al análisis por citometría de flujo de este ligando. Los resultados mostraron un elevado porcentaje de macrófagos WNT2B+ en pacientes con EC B3. Además, un mayor porcentaje de MΦ positivos para CD16 también fue positivo para WNT2B en estos mismos pacientes (Figura IV. 17a). También se encontró una correlación positiva y significativa entre la expresión de WNT2B y CD16 o CD86 en el tejido intestinal de pacientes con EC B3 y esta correlación no se encontró en los controles ni en los pacientes con EC B2 (Figura IV. 17b).

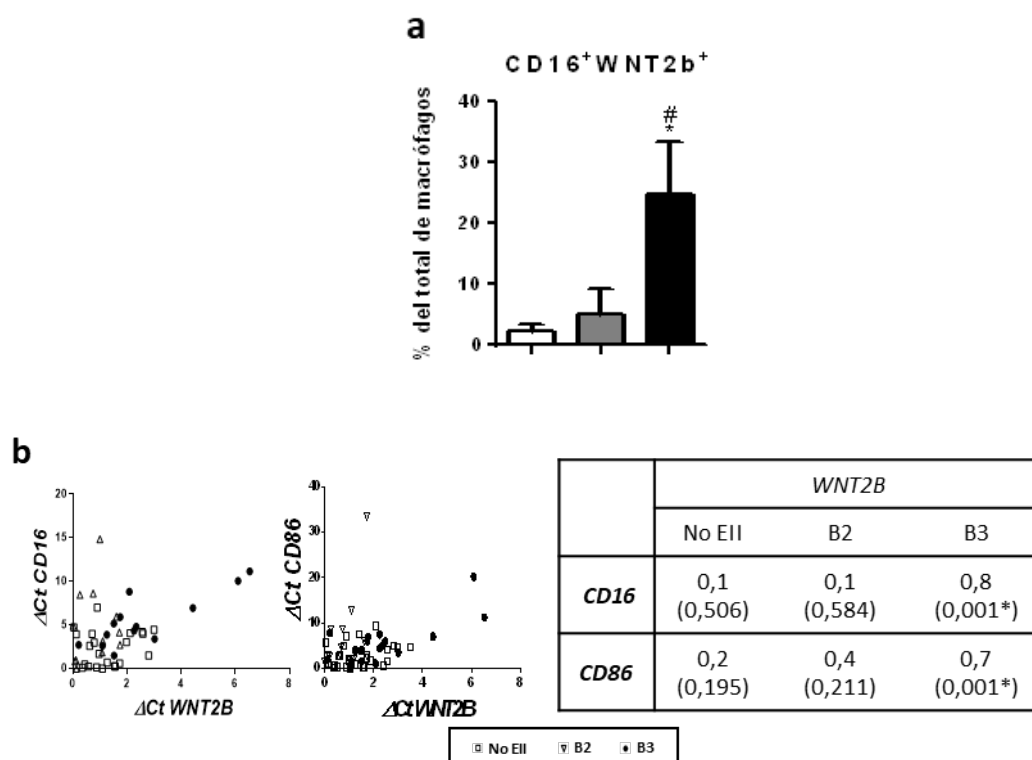


Figura IV. 17 Macrófagos CD16 + CD86 + actúan como fuente de WNT2B en el tejido intestinal de pacientes con EC B3. Se obtuvieron resecciones quirúrgicas de pacientes sin EII, con EC B2 y con EC B3 y se congelaron para el análisis de PCRq o se digirieron para su análisis por citometría de flujo. a) La gráfica muestra el porcentaje de células doblemente positivas para los marcadores CD16 y WNT2B y las diferencias significativas frente al grupo sin EII se muestran por * P <0.05 y frente al grupo EC B2 se muestran por # P <0.05 y b) la gráfica muestra el análisis de correlación entre la expresión génica relativa frente al gen constitutivo ACTB de WNT2B y CD16 o CD86. La tabla muestra los valores de r (P) del análisis de correlación de Pearson.

2.5. WNT2B colocaliza con E-CADHERINA, correlaciona con los marcadores de TEM y

se une a FZD4 en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula en pacientes con EC

Con el fin de relacionar el ligando WNT2B con el proceso de TEM, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia que mostraron una alta expresión del ligando en

células de la lámina propia, ubicadas muy cerca de las células epiteliales y la colocalización de WNT2B y E-CADHERINA, especialmente en tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula (**Figura IV. 18**).

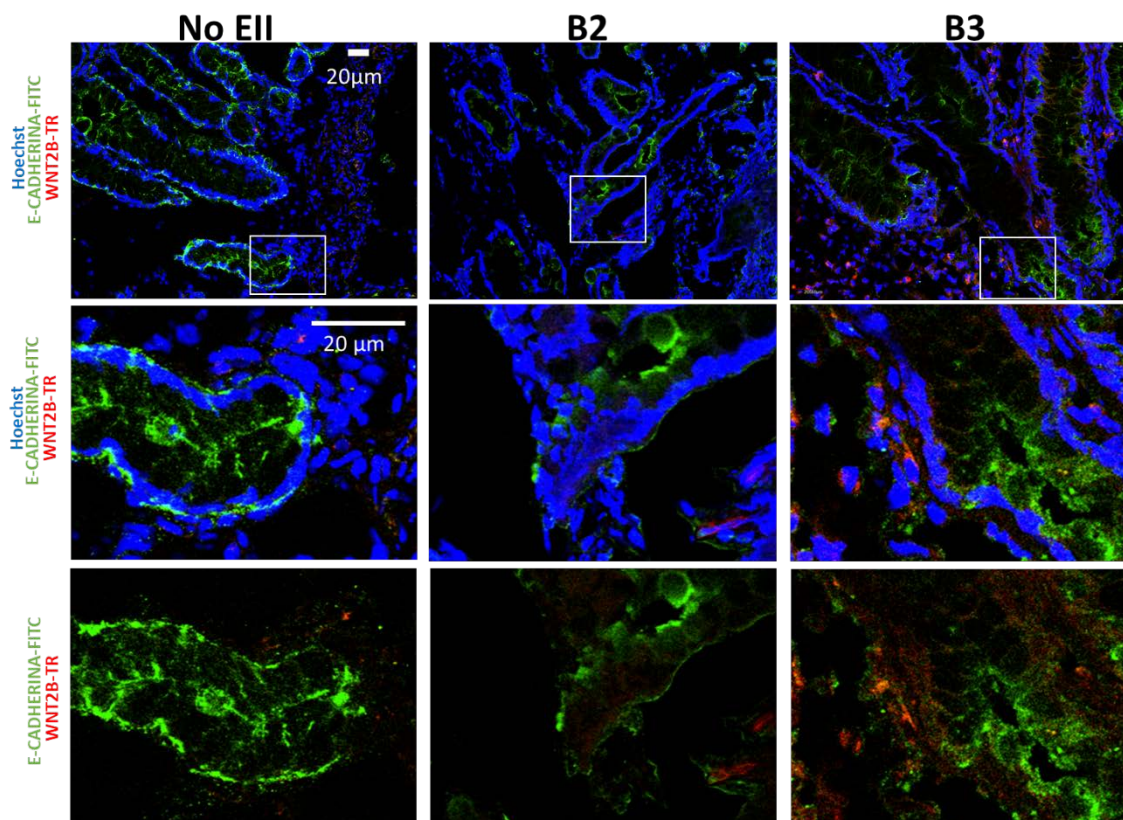


Figura IV. 18 WNT2B colocaliza con E-CADHERINA en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula. Se obtuvieron resecciones quirúrgicas de pacientes sin EII, con EC B2 y con EC B3 y se congelaron para su análisis por inmunofluorescencia. Imágenes representativas que muestran WNT2B (Tex Red), E-CADHERINA (FITC) y tinción nuclear (Hoechst) en tejido intestinal de pacientes sin EII, con EC B2 o con EC B3 (barras de escala 20 μ m).

Se encontró una correlación positiva y significativa entre la expresión del ARNm de WNT2B y la de los marcadores mesenquimales (VIMENTINA y FSP1), el colágeno (COL1A1, COL3A1 y COL4A1) y los factores de transcripción asociados a fibrosis/TEM (STAT3 / SNAI2, respectivamente) específicamente en el intestino que rodea el tracto de la fístula. En estas muestras, la expresión de VIMENTINA, SNAI2 y LGR5 también se correlacionó con la del receptor FZD4. En tejido estenótico de pacientes con EC B2, no se detectaron correlaciones entre FZD4 y los marcadores analizados, mientras que WNT2B se correlacionaba con VIMENTINA y COL3A1 (**Tabla IV. 2**).

	No EII	B2	B3
FZD4			
VIMENTINA	-0.001(0.99)	0.2(0.18)	0.8(0.0001*)
SNAI2	-0.08(0.7)	0.3(0.18)	0.5(0.04*)
LGR5	0.04(0.84)	0.10(0.49)	0.5(0.032*)
WNT2B			
VIM	0.3(0.09)	0.5(0.011*)	0.6(0.008*)
SNAI2	0.05(0.98)	-0.1(0.46)	0.6(0.07*)
FSP1	0.2(0.158)	0.3(0.137)	0.6(0.004*)
STAT3	0.2(0.158)	0.3(0.137)	0.6(0.009*)
COL1A1	-0.4(0.17)	0.2(0.200)	0.6(0.015*)
COL3A1	-0.1(0.457)	0.5(0.032*)	0.5(0.028*)
COL4A1	0.1(0.906)	0.2(0.313)	0.5(0.041*)

Tabla IV. 2 WNT2B y FZD4 se correlacionan con marcadores TEM en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula. La tabla muestra el coeficiente de correlación de Spearman r (P) entre la expresión del ARNm ileal de WNT2B y FZD4 y el de los marcadores TEM en pacientes sin EII, B2 y B3-CD. Los datos corresponden a valores relativos frente a la expresión del gen constitutivo ACTB ($n = 20$). Las correlaciones se consideraron significativas [*] en $P < 0.05$.

Finalmente, el análisis de la expresión de WNT2B en inmunoprecipitados de FZD4 de tejido intestinal de pacientes con EC revela la interacción de WNT2B y FZD4, especialmente en el intestino que rodea el tracto de la fístula (**Figura IV. 19d**).



Figura IV. 19 WNT2B interacciona con FZD4 en pacientes con EC B3. Dos WB representativas que muestran la expresión de WNT2B después de la inmunoprecipitación de FZD4 de tejido intestinal de pacientes con EC B2 y B3 ($n = 7$).

2.6. Los secretomas procedentes de pacientes con EC B3 inducen un incremento en la expresión de CD16, CD86 y WNT2B en CMSP

La incubación con los secretomas de tejido intestinal procedente de pacientes con EC B3 a CMSP produjo un incremento en la expresión génica de los marcadores de MΦ *CD16* y *CD86* y del ligando *WNT2B* en comparación con la expresión obtenida en las CMSP incubadas con secretomas de pacientes con EC B2 y pacientes sin EII, mientras que la expresión génica del marcador de MΦ *CD206* fue constante en los tres grupos experimentales (Figura IV. 20).

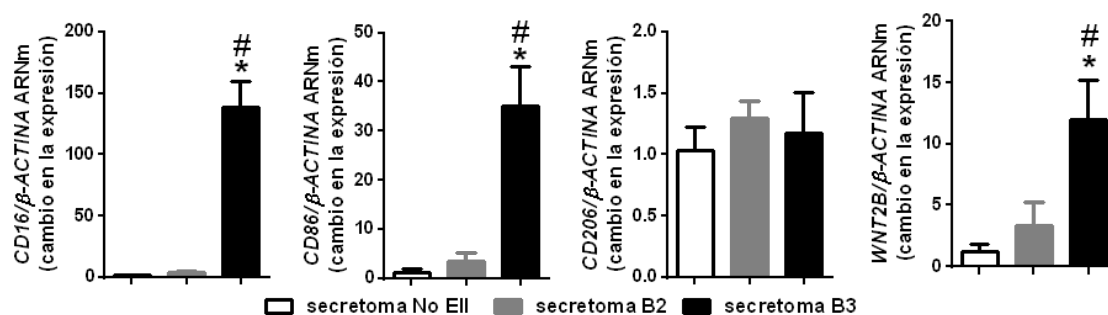


Figura IV. 20 CMSP tratadas con secretomas procedentes de pacientes con EC B3 muestran un incremento en la expresión de *CD16*, *CD86* y *WNT2B*. Análisis de la expresión génica en CMSP tratadas con secretomas de tejido intestinal procedentes de resecciones quirúrgicas de pacientes con EC B2, EC B3 o cáncer de colon. Los gráficos muestran la expresión relativa de ARNm frente al gen constitutivo *ACTB* y se representan como cambio en la expresión frente al grupo sin EII. Las barras representan la media \pm s.e.m. de tres muestras y las diferencias significativas frente al grupo sin EII se expresan por * $P < 0.05$ y frente al grupo EC B2 por # $P < 0.05$.

3. WNT2B induce transición epitelial-mesenquimal a través de FZD4

En un último bloque de experimentos analizamos los efectos de WNT2B en la TEM. Para ello las criptas intestinales obtenidas de tejido humano fueron tratadas con diferentes dosis de WNT2B y los resultados muestran un incremento en la expresión del ARNm de *CMYC*, *VIMENTINA*, *SNAI1* y *SNAI2* en paralelo a una disminución en la expresión de la E-CADHERINA (**Figura IV. 21a**). Además, WNT2B indujo la fosforilación de STAT3 en estas células (**Figura IV. 21b**).

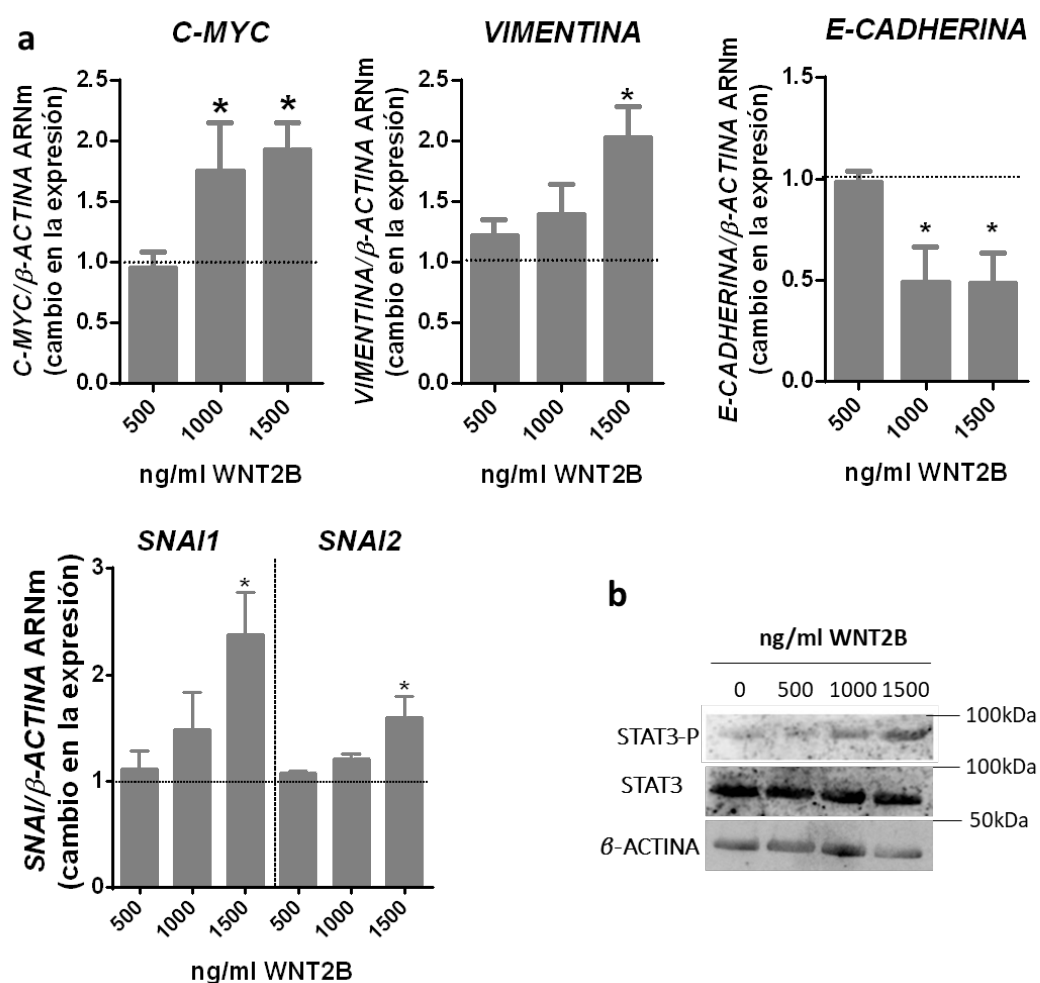


Figura IV. 21 WNT2B induce la expresión de marcadores de TEM en criptas intestinales aisladas. Las criptas intestinales se obtuvieron de resecciones quirúrgicas y se trataron con diferentes dosis de WNT2B. a) Los gráficos muestran la expresión relativa de ARNm frente al gen constitutivo ACTB y se representan como cambio en la expresión frente a criptas intestinales tratadas con vehículo (línea horizontal). Las barras representan la media \pm s.e.m. de al menos cinco muestras por grupo experimental y las diferencias significativas frente al grupo tratado con vehículo se muestran por * $P < 0.05$. b) WB representativo que muestra los efectos de WNT2B en los niveles de proteína STAT3 y p-STAT3.

Los experimentos de inmunofluorescencia revelaron un aumento en la expresión de *VIMENTINA* inducida tanto por WNT2B como por TGF β 1 en células HT29 (**Figura IV.**

22a). De manera similar a la observada en las células primarias, WNT2B aumentó la expresión del ARNm de *CMYC*, *VIMENTINA*, *SNAI1* y *SNAI2* mientras que redujo la de *E-CADHERINA* en las células HT29, y estos efectos fueron mediados por FZD4, ya que el silenciamiento transitorio de este receptor previno los efectos inducidos por el ligando (**Figura IV. 22b**).

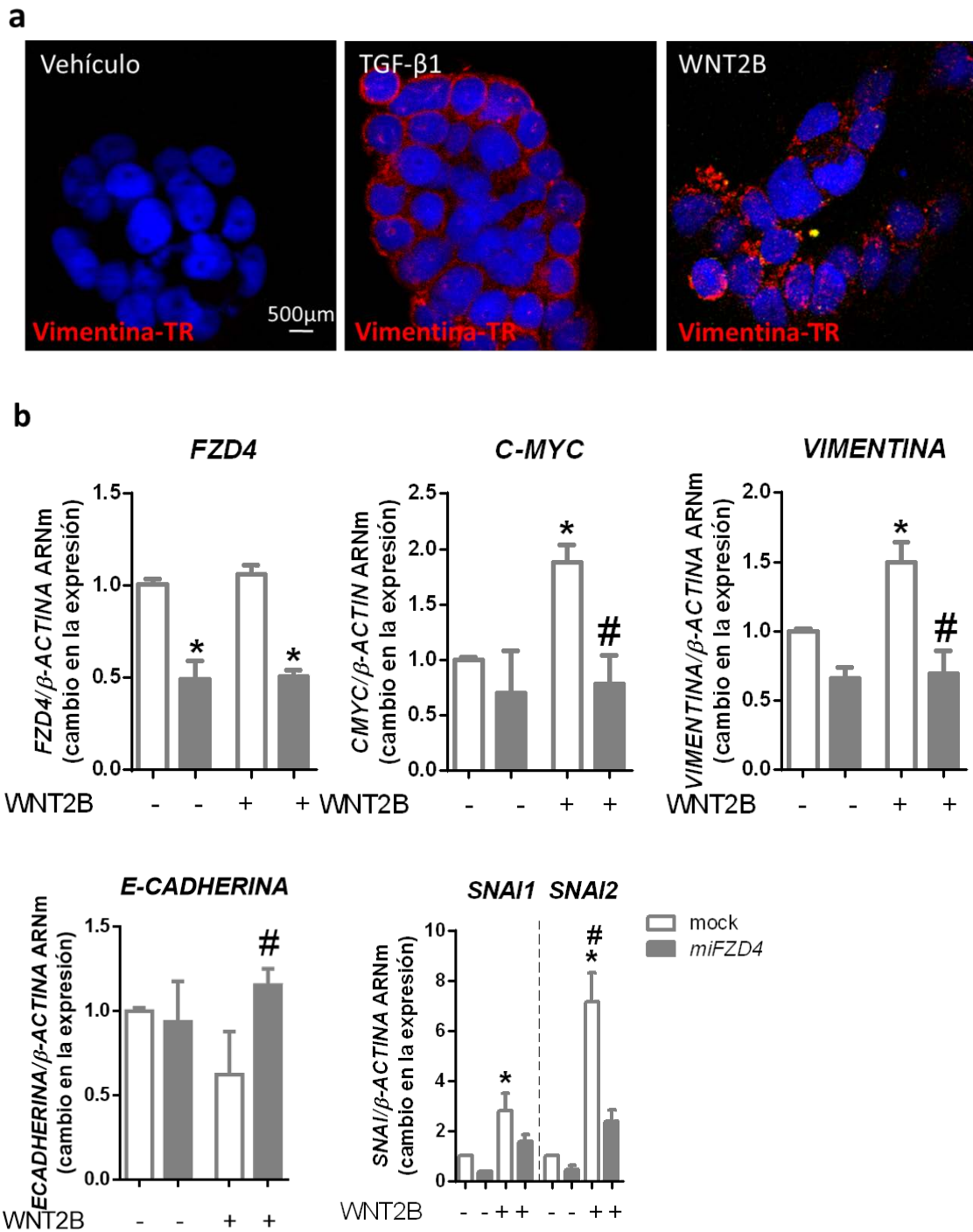


Figura IV. 22 WNT2B induce TEM en células HT29. a) Imágenes representativas que muestran VIMENTINA (Tex Red) y tinción nuclear (Hoechst) en células HT29 tratadas con vehículo, TGFβ1 o WNT2B durante 7 días (n = 3) (barra de escala 500 μm). b) Las gráficas muestran la expresión relativa de ARNm frente al gen constitutivo ACTB y se representan como cambio en la expresión frente a células tratadas con vehículo, en células HT29 tratadas con miFZD4 o vector vacío. Las barras representan la media ± s.e.m. de al menos cuatro muestras por grupo experimental y las diferencias significativas frente a las células tratadas con vehículo se muestran mediante * P < 0.05 y frente a las células tratadas con WNT2B mediante # P < 0.05.

Por otro lado, WNT2B no logró modificar significativamente la expresión de *VIMENTINA*, *SNAI1* y *SNAI2* en fibroblastos primarios aislados del intestino humano (Figura IV. 23) así como tampoco pudo modular, en estas células, la expresión de *CMYC*, un gen diana de la ruta WNT.

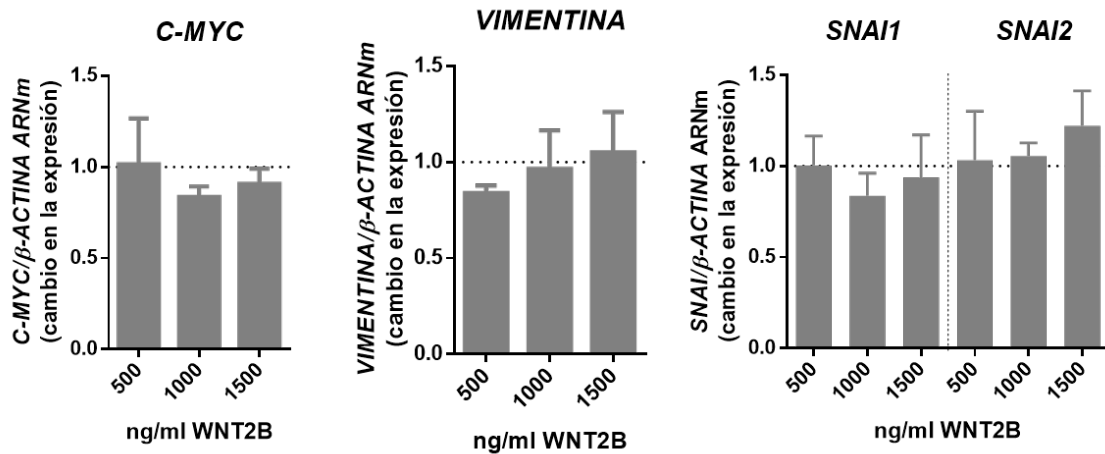
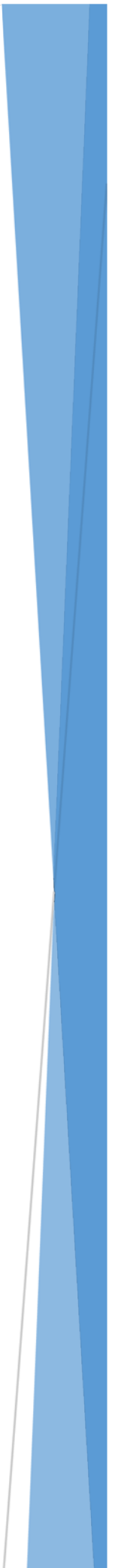


Figura IV. 23 WNT2B no induce la señalización WNT en fibroblastos primarios humanos. Los fibroblastos se obtuvieron de las resecciones quirúrgicas de pacientes sin EII y se trataron con diferentes dosis de WNT2B. Los gráficos muestran la expresión relativa de ARNm frente al gen constitutivo ACTB y se representan como cambio en la expresión frente a células tratadas con vehículo (línea horizontal). Las barras representan la media \pm s.e.m. de al menos cinco muestras por grupo experimental.

V. DISCUSIÓN



La estenosis y las fistulas son las complicaciones más frecuentes de la EII, especialmente de la EC. Por el momento no existe ningún tratamiento farmacológico efectivo para su prevención o tratamiento por lo que su aparición requiere con frecuencia de la hospitalización e intervención quirúrgica del paciente con el fin de eliminar el área afectada, lo que disminuye considerablemente su calidad de vida y no es garantía de curación. Hasta ahora se desconocen los mecanismos concretos que median la aparición de la fibrosis y la fístula en esta patología y se cree que la inflamación persistente y la mala recuperación mucosa subyacen a estas complicaciones. Los MΦ son células con una gran plasticidad, que adquieren diferentes fenotipos funcionales dependiendo del microambiente y ejercen funciones esenciales en el proceso inflamatorio, en los mecanismos de regeneración mucosa tras un daño y en la activación de los miofibroblastos y aparición de fibrosis. Nosotros hipotetizamos que la alteración de la función macrofágica en el intestino puede modificar los procesos normales de regeneración tisular tras un daño, lo que en última instancia puede ser una de las causas de la aparición de procesos fibróticos y fistulizantes característicos de la EC.

Considerando resultados previos de nuestro grupo de investigación iniciamos un modelo de inflamación intestinal crónica basado en la administración repetida de TNBS a ratones carentes del factor de transcripción Stat6. Estos ratones tienen alterada su composición macrofágica intestinal, ya que Stat6 es crucial para la polarización macrofágica hacia el fenotipo reparador. La falta del factor de transcripción Stat6 condujo a una predisposición a la fibrosis en este modelo. Los ratones *Stat6*^{-/-} exhibieron una expresión constitutivamente aumentada de algunos marcadores de fibrosis y tendieron a presentar un tejido mesenquimatoso más grueso en la mucosa colónica. Estas características se vieron incrementadas mediante la administración crónica de TNBS a dosis que no afectaron a la estructura de la mucosa en animales silvestres. La predisposición a la fibrosis detectada en animales *Stat6*^{-/-} se asoció con una respuesta macrofágica alterada. En este sentido, los ratones silvestres mostraron niveles elevados de MΦ CD206⁺ durante todo el período experimental, mientras los animales *Stat6*^{-/-} mostraron niveles constantes de estas células durante todo el tiempo. El aumento de los MΦ CD206⁺ en los animales silvestres fue probablemente debido a que con cada administración de TNBS se desencadenó una respuesta macrofágica que resultaba

fundamental para la normal recuperación de la mucosa (Cosin-Roger et al., 2016). De hecho, la administración exógena de MΦ obtenidos de ratones silvestres y tratados con IL4 a los ratones *Stat6*^{-/-} después de cada dosis de TNBS redujo significativamente la respuesta fibrótica. Estos resultados sugieren que la ausencia de Stat6 y la consiguiente incapacidad para generar el fenotipo macrofágico reparador que depende de la vía de señalización IL4/IL13-Stat6 subyace en el origen de la fibrosis (**Figura V. 1**).

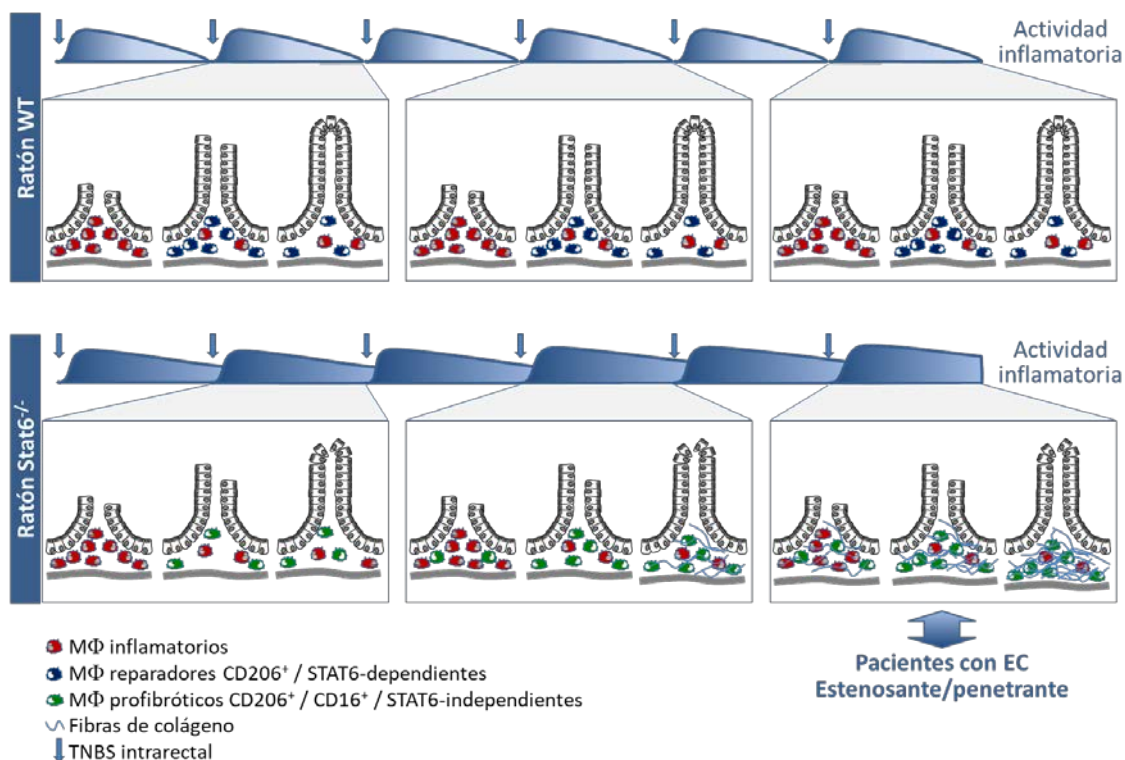


Figura V. 1 Modelo propuesto para la aparición de fibrosis en ratones *Stat6*^{-/-}.

Por otro lado, los ratones *Stat6*^{-/-} presentaron una acumulación progresiva de MΦ CD16⁺ y la expresión de CD16 se correlacionó con la de los marcadores fibróticos en este grupo, mientras que este aumento no se observó en los ratones silvestres. Esto sugiere que este subgrupo de MΦ contribuye a la generación de fibrosis y, en consecuencia, la protección provocada por los MΦ exógenos se acompaña de una expresión reducida de CD16 en la mucosa. Es importante destacar que el análisis de la infiltración de MΦ en muestras intestinales obtenidas de pacientes con EII sometidos a cirugía debido a complicaciones estenóticas o penetrantes también reveló un aumento significativo en MΦ CD16. Por lo tanto, aunque los ratones *Stat6*^{-/-} tratados con TNBS mostraron una fibrosis leve en el espacio submucoso y no las características lesiones

transmurales de la EC, el patrón de infiltración macrofágica es similar al presente en muestras fibróticas obtenidas de este grupo de pacientes. Estudios previos han demostrado que los niveles de monocitos CD16 + circulantes y células infiltrantes de la mucosa aumentan con la actividad de la enfermedad. Ahora podemos demostrar su contribución a la fibrosis de acuerdo con la evidencia *in vitro* de la regulación positiva de CD16 en respuesta al TGF β (Zizzo et al., 2012, Liaskou et al., 2013) y estudios anteriores indicando que los monocitos y M Φ CD16 + contribuyen a la fibrosis en el hígado y la piel (Liaskou et al., 2013, Zhang et al., 2011, Lescoat et al., 2017). Por lo tanto, la falta de M Φ dependientes de Stat6 tiene dos consecuencias: la cicatrización deficiente y la acumulación de M Φ CD16 +, que promueven la fibrosis. El papel de los M Φ estimulados por IL4 en la reparación de tejidos es evidente en diferentes órganos, (Cosin-Roger et al., 2016, Minutti et al., 2017, Knipper et al., 2015) pero su función requiere un estudio en profundidad, ya que existe evidencia de que también contribuyen a la fibrosis. En contraste con la tendencia a la fibrosis intestinal observada en los ratones *Stat6*^{-/-}, se ha reportado que la eliminación del receptor de IL4 α o de los coestimuladores de IL4 protege contra la fibrosis en la piel, (Knipper et al., 2015) mesenterio (Minutti et al., 2017) y páncreas (Xue et al., 2015). No podemos descartar que estas diferencias se relacionen con las particularidades tisulares, como en el caso de los potenciadores de la señalización de IL4 (Knipper et al., 2015), o con efectos adicionales derivados de la actividad de transcripción de Stat6 regulada por otros mediadores. Sin embargo, se esperaría una gama más amplia de efectos después de la eliminación del propio receptor de IL4 α que de la eliminación de una, aunque significativa, de sus vías de señalización, es decir, Stat6 (Lawrence, Natoli, 2011). Por ejemplo, la eliminación del receptor de IL4 α impediría la estimulación de Stat3 por parte de IL4 e IL13, lo que probablemente influya en el fenotipo de los M Φ (Ul-Haq, Naz & Mesaik, 2016, Rogler et al., 1997). De hecho, hemos observado que la reducción en los M Φ dependientes de Stat6 está asociada con la regulación positiva de *Stat3* en la mucosa intestinal y que los M Φ CD16 + que se acumulan en estas circunstancias muestran una mayor expresión de *Stat3*. Por lo tanto, parece que la ausencia de señalización mediada por Stat6 permite la activación de M Φ dependientes de Stat3.

Los MΦ actúan como una de las fuentes de numerosos mediadores con actividades profibróticas, entre los cuales, el TGFβ es el más destacado. De hecho, los ratones *Stat6*^{-/-} presentan niveles más altos de ARNm de *TGFβ* que los ratones silvestres, y su expresión se correlaciona con la de CD16. Sin embargo, el tratamiento con TNBS no aumenta su expresión, y la correlación con el marcador de MΦ ocurre tanto en ratones silvestres como *Stat6*^{-/-}, lo que sugiere que TGFβ no es responsable de la respuesta diferencial observada en este último grupo. Los MΦ también son una fuente de ligandos Wnt, los cuales desempeñan un papel central en la promoción del crecimiento de las células destinadas a reparar el tejido después del daño en la mucosa (Clevers, 2013). Anteriormente hemos observado que los MΦ secretan Wnt2b, Wnt7 y Wnt10a de una manera dependiente de Stat6 y que el déficit de estos ligandos en ratones *Stat6*^{-/-} merma la reparación aguda de la herida (Cosin-Roger et al., 2016). Es interesante observar que un estudio reciente asigna un papel particularmente esencial al Wnt2b secretado de fuentes extraepiteliales en la renovación epitelial intestinal (Valenta et al., 2016), mientras que se ha observado una producción reducida de este mediador en fibroblastos aislados de pacientes con EC estenosante (Sadler et al., 2016). Por lo tanto, el efecto beneficioso de administrar MΦ silvestres estimulados con IL4 después de cada sonda de TNBS probablemente esté mediado por el aumento del suministro de ligandos Wnt que lo acompaña. Sin embargo, la mucosa de los ratones *Stat6*^{-/-} mostró niveles aumentados de ARNm de *Wnt6* y *Wnt10a* al final del período experimental, y la expresión de *Wnt6* se correlacionó con la de los marcadores de MΦ y fue mayor en los MΦ CD16⁺. Estos resultados, junto con el aumento observado en la señalización de Wnt, sugieren que Wnt6 contribuye a la generación de fibrosis. De esta manera, los ligandos Wnt en conjunto parecen ser un arma de doble filo con respecto a la lesión de la mucosa, ya que afectan tanto a la cicatrización como a la fibrosis. Este concepto ya se ha demostrado en el riñón (Zhou et al., 2016) y requiere una mayor exploración de sus funciones con la esperanza de encontrar roles específicos de ligandos específicos para deducir el valor terapéutico de modular su función. En resumen, los experimentos en ratón del presente estudio demuestran que las deficiencias en la actividad de *Stat6*^{-/-} desregulan la respuesta de los MΦ a los brotes inflamatorios al aumentar la presencia

de una población de MΦ CD16 + asociados con una mayor susceptibilidad a la fibrosis intestinal.

La relevancia del fenotipo macrofágico como fuente de ligandos WNT y la importancia relativa de los diferentes ligandos en las complicaciones asociadas a la EC se ha analizado en resecciones intestinales de pacientes con esta patología. Nuestro estudio incluye muestras ileales de pacientes con EC con fenotipo estenosante y penetrante y en ambos casos hemos detectado presencia de fibrosis submucosa y suberosa. Fuertes evidencias proponen que las complicaciones penetrantes de esta patología no se producen en ausencia de fibrosis intestinal (Cayci et al., 2015, Orscheln et al., 2018), sin embargo se desconocen los mecanismos que favorecen el desarrollo de la fístula sobre la fibrosis. En línea con estudios previos, los resultados muestran una disminución en la expresión de ARNm de *E-CADHERINA* e inducción de marcadores de TEM y miembros de la familia de factores de transcripción SNAI en tejido completo y en criptas intestinales aisladas de pacientes con EC. Estos cambios fueron más pronunciados en el tejido de los pacientes con EC B3 en los que se detectó una colocalización aumentada de VIMENTINA y E-CADHERINA, lo que apunta a la presencia de TEM. Estudios anteriores han descrito que la TEM es una fuente novedosa de fibroblastos que contribuyen a la fibrosis intestinal (Scharl et al., 2015, Flier et al., 2010, Jiang, Shen & Ran, 2018) y este proceso también se ha detectado en la mayoría de las fístulas asociadas con EC (Bataille et al., 2008) y alrededor de ellas. Nuestro trabajo demuestra por primera vez que la TEM es más prevalente en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula en pacientes con EC B3 que en la estenosis de pacientes con EC B2.

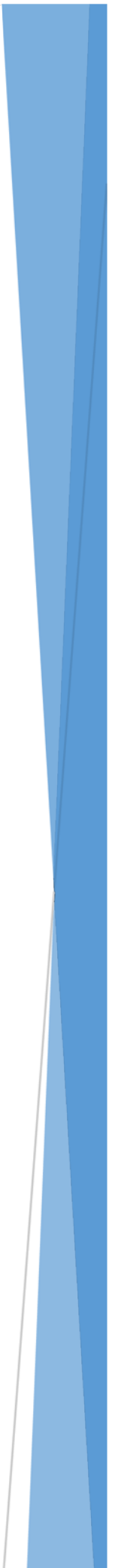
La vía de señalización de WNT desempeña un papel fundamental en la fibrosis pulmonar (Yan, Kui & Ping, 2014) y renal (Tan et al., 2014) humana, pero su papel en la patogénesis de la fístula sigue siendo desconocido. Nuestros datos revelan una acumulación nuclear de β -CATENINA y una mayor expresión de los genes diana de WNT en la enfermedad penetrante que en la enfermedad estenosante. Esto también se observa en las criptas aisladas de estos pacientes, lo que sugiere fuertemente una mayor activación epitelial de la vía de señalización WNT en pacientes con fistulización. Estudios previos han descrito la activación de la señalización WNT por mediadores endógenos

involucrados en la patogénesis de la fístula, como el TGF β (Scharl et al., 2013). Este estudio amplía estas observaciones y muestra una incrementada expresión de varios ligandos WNT en muestras de pacientes con EC en comparación con los controles. Entre ellos, destaca la expresión de *WNT2B*, potente activador de la señalización de WNT/ β -CATENINA por estar incrementada en el intestino de los pacientes con EC B3 y disminuida en las muestras de pacientes con EC B2, en comparación con los controles. Esto, unido a la observación de que *WNT2B* se expresa en células de la LP y a estudios previos mostrando que *WNT2B* se produce fuera del epitelio (Gregorieff et al., 2005), nos ha permitido hipotetizar que la expresión diferencial de *WNT2B* entre los diferentes comportamientos de la enfermedad pudiera tener su origen en diferentes patrones de expresión macrofágica. El análisis realizado con citometría de flujo revela un elevado nivel de infiltración de macrófagos en pacientes con EC comparado con controles, pero similar entre los pacientes con EC B2 y EC B3. Sin embargo, el fenotipo macrofágico fue diferente y los pacientes con EC B3 mostraron una mayor proporción de macrófagos CD16 + y CD86 +, y a su vez una mayor proporción de células positivas para el *WNT2B* que los pacientes con EC B2. Esta observación es reforzada por el tratamiento de CMSP con los secretomas producidos por el tejido intestinal de los diferentes pacientes, en el que observamos que la expresión de ARNm de *CD16*, *CD86* y *WNT2B* se vio significativamente aumentada en los M Φ tratados con los secretomas obtenidos de pacientes con EC B3 en comparación con el resto de grupos. Parece por tanto que un factor o un conjunto de factores solubles producidos por el propio tejido o las células infiltradas que éste contiene están induciendo la polarización macrofágica hacia este tipo de M Φ en pacientes con EC B3. En conjunto, estos datos indican, que los M Φ CD16 + CD86 + actúan como fuente de *WNT2B* en el tejido intestinal de pacientes con EC B3. Estos resultados comparten con la fibrosis murina la mayor presencia de M Φ CD16 + pero difieren de aquella en la importancia del ligando *WNT2B*, lo que podría tener relación con la ausencia de STAT6 en nuestro modelo murino de fibrosis (Cosin-Roger et al., 2016).

En los últimos años, se ha visto que no todos los ligandos WNT canónicos emiten señales a través de cada receptor FZD y las interacciones específicas y su papel en la enfermedad han comenzado a definirse (Arthofer et al., 2016, Burgy, Konigshoff, 2018,

Dijksterhuis et al., 2015). El análisis de la expresión de los receptores FZD en el intestino no muestra diferencias significativas entre los pacientes control y los de EC, pero refleja una mayor expresión de FZD4 en las criptas aisladas del intestino que rodean el tracto de la fístula. La baja expresión de FZD4 detectada en el tejido intestinal en comparación con la de las criptas aisladas del mismo tejido sugiere que este receptor se expresa principalmente en las células epiteliales diferenciadas de las vellosidades, como se ha descrito (Gregorieff et al., 2005). La inmunoprecipitación de FZD4 intestinal revela la unión de WNT2B a este receptor, especialmente en muestras de pacientes con EC B3. Se ha reportado que WNT2B transduce señales dependientes de β -CATENINA a través de los receptores FZD; además se ha descrito la activación de la señalización WNT por la interacción específica WNT2B/FZD4 en el desarrollo del ojo de pollo (Ohta et al., 2011). Estas observaciones sugieren un papel para la interacción WNT2B/FZD4 en el aumento de la señalización WNT epitelial detectada en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula, lo que se refuerza por los resultados *in vitro* que muestran que WNT2B, a través de la activación de FZD4 induce las vías de señalización dependientes de β -CATENINA en células epiteliales intestinales. Este efecto se detecta en paralelo a un aumento en la expresión de marcadores de TEM inducido por WNT2B en criptas aisladas del intestino humano y al papel del FZD4 en la inducción de la TEM por WNT2B en células epiteliales en cultivo. Tanto el FZD4 (Yang et al., 2018) como el WNT2B (Liu et al., 2017a, Liu et al., 2017b) se han relacionado previamente con la TEM, pero este es el primer estudio que demuestra un papel para la interacción específica de WNT2B y FZD4 en este proceso. Es de destacar la ausencia de activación de la ruta de señalización WNT por parte del WNT2B en los fibroblastos humanos primarios. En línea con un estudio anterior (Hughes, Sablitzky & Mahida, 2011), encontramos una baja expresión de receptores FZD en estas células y ausencia de diferencias significativas entre los diferentes tejidos analizados lo que apunta a las células epiteliales como la diana principal de WNT2B en el intestino humano. Este estudio demuestra la presencia de TEM y una mayor interacción de WNT2B/FZD4 en el tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula, lo que puede estar involucrado en la patogénesis de la fístula. Una mejor caracterización del papel desempeñado por FZD4 en este proceso puede ayudar a establecer nuevos enfoques terapéuticos para prevenir las complicaciones de la EC.

VI. CONCLUSIONES



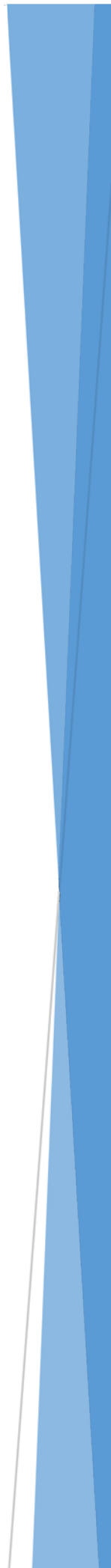
1. En un modelo murino de colitis crónica inducida por el ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico:
 - a. La deficiencia de Stat6 impide la acumulación de macrófagos CD206 positivos, promueve la de macrófagos CD16 positivos que producen Wnt6 y favorece el desarrollo de fibrosis intestinal.
 - b. La transferencia de macrófagos silvestres tratados con IL4 a ratones deficientes en Stat6 previene la acumulación de macrófagos positivos para CD16 y reduce la fibrosis intestinal.

2. El tejido intestinal que rodea el tracto de la fístula en pacientes con EC de fenotipo penetrante, en comparación con el tejido fibrótico de pacientes con fenotipo estenosante muestra:
 - a. Elevada presencia de fibrosis submucosa y subserosa, de transición epitelial-mesenquimal y de expresión de citocinas proinflamatorias.
 - b. Un mayor número de macrófagos positivos para CD16 y WNT2B.
 - c. Una mayor interacción del ligando WNT2B y el receptor FZD4.

3. WNT2B induce transición epitelial-mesenquimal a través de la activación de FZD4 en células epiteliales aisladas.

4. Un mejor conocimiento del papel desempeñado por la interacción selectiva de ligandos WNT con receptores FZD puede ayudar a establecer nuevas dianas terapéuticas para prevenir las complicaciones asociadas a la enfermedad de Crohn.

VII. BIBLIOGRAFÍA



- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. 1997, "Beta-Catenin is a Target for the Ubiquitin-Proteasome Pathway", *The EMBO journal*, vol. 16, no. 13, pp. 3797-3804.
- Ali, T., Madhoun, M.F., Orr, W.C. & Rubin, D.T. 2013, "Assessment of the relationship between quality of sleep and disease activity in inflammatory bowel disease patients", *Inflammatory bowel diseases*, vol. 19, no. 11, pp. 2440-2443.
- Ananthakrishnan, A.N. 2015, "Epidemiology and risk factors for IBD", *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, vol. 12, no. 4, pp. 205-217.
- Arthofer, E., Hot, B., Petersen, J., Strakova, K., Jager, S., Grundmann, M., Kostenis, E., Gutkind, J.S. & Schulte, G. 2016, "WNT Stimulation Dissociates a Frizzled 4 Inactive-State Complex with Galpha12/13", *Molecular pharmacology*, vol. 90, no. 4, pp. 447-459.
- Bae, J.M., Choo, J.Y., Kim, K.J. & Park, K.S. 2017, "Association of inflammatory bowel disease with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis: A nationwide population-based study", *Modern rheumatology*, vol. 27, no. 3, pp. 435-440.
- Bartscherer, K. & Boutros, M. 2008, "Regulation of Wnt protein secretion and its role in gradient formation", *EMBO reports*, vol. 9, no. 10, pp. 977-982.
- Bataille, F., Rohrmeier, C., Bates, R., Weber, A., Rieder, F., Brenmoehl, J., Strauch, U., Farkas, S., Furst, A., Hofstadter, F., Scholmerich, J., Herfarth, H. & Rogler, G. 2008, "Evidence for a role of epithelial mesenchymal transition during pathogenesis of fistulae in Crohn's disease", *Inflammatory bowel diseases*, vol. 14, no. 11, pp. 1514-1527.
- Bernardo, D., Marin, A.C., Fernandez-Tome, S., Montalban-Arques, A., Carrasco, A., Tristan, E., Ortega-Moreno, L., Mora-Gutierrez, I., Diaz-Guerra, A., Caminero-Fernandez, R., Miranda, P., Casals, F., Caldas, M., Jimenez, M., Casabona, S., De la Morena, F., Esteve, M., Santander, C., Chaparro, M. & Gisbert, J.P. 2018, "Human intestinal pro-inflammatory CD11c(high)CCR2(+)CX3CR1(+) macrophages, but not their tolerogenic CD11c(-)CCR2(-)CX3CR1(-) counterparts, are expanded in inflammatory bowel disease", *Mucosal immunology*, vol. 11, no. 4, pp. 1114-1126.
- Brabletz, T., Jung, A., Dag, S., Hlubek, F. & Kirchner, T. 1999, "Beta-Catenin Regulates the Expression of the Matrix Metalloproteinase-7 in Human Colorectal Cancer", *The American journal of pathology*, vol. 155, no. 4, pp. 1033-1038.
- Burgy, O. & Konigshoff, M. 2018, "The WNT signaling pathways in wound healing and fibrosis", *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, .
- Burisch, J. & Munkholm, P. 2015, "The epidemiology of inflammatory bowel disease", *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 50, no. 8, pp. 942-951.

- Cayci, M., Bostanci, E.B., Turhan, N., Karaman, K., Dalgic, T., Ozer, I., Ercan, M., Ulas, M. & Akoglu, M. 2015, "The analysis of clinico-pathologic characteristics in patients who underwent surgery due to stricturing and non-perineal fistulizing forms of Crohn's disease: a retrospective cohort study", *International journal of surgery (London, England)*, vol. 15, pp. 49-54.
- Clevers, H. 2013, "The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment", *Cell*, vol. 154, no. 2, pp. 274-284.
- Clevers, H. 2006, "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease", *Cell*, vol. 127, no. 3, pp. 469-480.
- Cosin-Roger, J., Ortiz-Masia, D., Calatayud, S., Hernandez, C., Esplugues, J.V. & Barrachina, M.D. 2016, "The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD", *Mucosal immunology*, vol. 9, no. 4, pp. 986-998.
- Coskun, M. 2014, "Intestinal epithelium in inflammatory bowel disease", *Frontiers in medicine*, vol. 1, pp. 24.
- Dijksterhuis, J.P., Baljinnyam, B., Stanger, K., Sercan, H.O., Ji, Y., Andres, O., Rubin, J.S., Hannoush, R.N. & Schulte, G. 2015, "Systematic mapping of WNT-FZD protein interactions reveals functional selectivity by distinct WNT-FZD pairs", *The Journal of biological chemistry*, vol. 290, no. 11, pp. 6789-6798.
- Ek, W.E., D'Amato, M. & Halfvarson, J. 2014, "The history of genetics in inflammatory bowel disease", *Annals of gastroenterology*, vol. 27, no. 4, pp. 294-303.
- Flier, S.N., Tanjore, H., Kokkotou, E.G., Sugimoto, H., Zeisberg, M. & Kalluri, R. 2010, "Identification of epithelial to mesenchymal transition as a novel source of fibroblasts in intestinal fibrosis", *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 26, pp. 20202-20212.
- Gammons, M. & Bienz, M. 2017, "Multiprotein complexes governing Wnt signal transduction", *Current opinion in cell biology*, vol. 51, pp. 42-49.
- Gensel, J.C. & Zhang, B. 2015, "Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury", *Brain research*, vol. 1619, pp. 1-11.
- Gerner, R.R., Moschen, A.R. & Tilg, H. 2013, "Targeting T and B lymphocytes in inflammatory bowel diseases: lessons from clinical trials", *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*, vol. 31, no. 3-4, pp. 328-335.
- Gisbert-Ferrandiz, L., Salvador, P., Ortiz-Masia, D., Macias-Ceja, D.C., Orden, S., Esplugues, J.V., Calatayud, S., Hinojosa, J., Barrachina, M.D. & Hernandez, C. 2018, "A Single Nucleotide Polymorphism in the Vitamin D Receptor Gene Is Associated

- With Decreased Levels of the Protein and a Penetrating Pattern in Crohn's Disease", *Inflammatory bowel diseases*, vol. 24, no. 7, pp. 1462-1470.
- Gloria, L., Cravo, M., Pinto, A., de Sousa, L.S., Chaves, P., Leitao, C.N., Quina, M., Mira, F.C. & Soares, J. 1996, "DNA hypomethylation and proliferative activity are increased in the rectal mucosa of patients with long-standing ulcerative colitis", *Cancer*, vol. 78, no. 11, pp. 2300-2306.
- Gomollón, F. & Sans, M. 2012, "Enfermedad inflamatoria intestinal. Enfermedad de Crohn" in *Libro de Gastroenterología y Hepatología. Problemas comunes en la práctica clínica.*, eds. M.A. Montoro & J.C. García Pagán, 2nd edn, Jarpyo Editores, S.A., Madrid, pp. 443-458.
- Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destree, O., Kielman, M. & Clevers, H. 2005, "Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine", *Gastroenterology*, vol. 129, no. 2, pp. 626-638.
- Gross, J.C., Chaudhary, V., Bartscherer, K. & Boutros, M. 2012, "Active Wnt proteins are secreted on exosomes", *Nature cell biology*, vol. 14, no. 10, pp. 1036-1045.
- Grumolato, L., Liu, G., Mong, P., Mudbhary, R., Biswas, R., Arroyave, R., Vijayakumar, S., Economides, A.N. & Aaronson, S.A. 2010, "Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors", *Genes & development*, vol. 24, no. 22, pp. 2517-2530.
- Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M. & Kontula, K. 2006, "Family and twin studies in inflammatory bowel disease", *World journal of gastroenterology*, vol. 12, no. 23, pp. 3668-3672.
- Halmos, E.P. & Gibson, P.R. 2015, "Dietary management of IBD--insights and advice", *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, vol. 12, no. 3, pp. 133-146.
- Hasler, R., Feng, Z., Backdahl, L., Spehlmann, M.E., Franke, A., Teschendorff, A., Rakyán, V.K., Down, T.A., Wilson, G.A., Feber, A., Beck, S., Schreiber, S. & Rosenstiel, P. 2012, "A functional methylome map of ulcerative colitis", *Genome research*, vol. 22, no. 11, pp. 2130-2137.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. 1998, "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 281, no. 5382, pp. 1509-1512.
- Holleran, G., Lopetuso, L., Petito, V., Graziani, C., Ianiro, G., McNamara, D., Gasbarrini, A. & Scaldaferrì, F. 2017, "The Innate and Adaptive Immune System as Targets for Biologic Therapies in Inflammatory Bowel Disease", *International journal of molecular sciences*, vol. 18, no. 10, pp. 10.3390/ijms18102020.

- Hovanes, K., Li, T.W., Munguia, J.E., Truong, T., Milovanovic, T., Lawrence Marsh, J., Holcombe, R.F. & Waterman, M.L. 2001, "Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer", *Nature genetics*, vol. 28, no. 1, pp. 53-57.
- Howe, L.R., Watanabe, O., Leonard, J. & Brown, A.M. 2003, "Twist is up-regulated in response to Wnt1 and inhibits mouse mammary cell differentiation", *Cancer research*, vol. 63, no. 8, pp. 1906-1913.
- Hughes, K.R., Sablitzky, F. & Mahida, Y.R. 2011, "Expression profiling of Wnt family of genes in normal and inflammatory bowel disease primary human intestinal myofibroblasts and normal human colonic crypt epithelial cells", *Inflammatory bowel diseases*, vol. 17, no. 1, pp. 213-220.
- Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J.F., Sahbatou, M. & Thomas, G. 2001, "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease", *Nature*, vol. 411, no. 6837, pp. 599-603.
- Iida, T., Onodera, K. & Nakase, H. 2017, "Role of autophagy in the pathogenesis of inflammatory bowel disease", *World journal of gastroenterology*, vol. 23, no. 11, pp. 1944-1953.
- Issa, J.P., Ahuja, N., Toyota, M., Bronner, M.P. & Brentnall, T.A. 2001, "Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis", *Cancer research*, vol. 61, no. 9, pp. 3573-3577.
- Jarasvaraparn, C., Zlomke, K., Vann, N.C., Wang, B., Crissinger, K.D. & Gremse, D.A. 2018, "The Relationship between Sleep Disturbance, and Disease Activity in Pediatric Patients with Inflammatory Bowel Disease", *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, .
- Jiang, H., Shen, J. & Ran, Z. 2018, "Epithelial-mesenchymal transition in Crohn's disease", *Mucosal immunology*, vol. 11, no. 2, pp. 294-303.
- Juhas, U., Ryba-Stanislawowska, M., Szargiej, P. & Mysliwska, J. 2015, "Different pathways of macrophage activation and polarization", *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, vol. 69, pp. 496-502.
- Kalla, R., Ventham, N.T., Kennedy, N.A., Quintana, J.F., Nimmo, E.R., Buck, A.H. & Satsangi, J. 2015, "MicroRNAs: new players in IBD", *Gut*, vol. 64, no. 3, pp. 504-517.
- Kmiec, Z., Cyman, M. & Slebioda, T.J. 2017, "Cells of the innate and adaptive immunity and their interactions in inflammatory bowel disease", *Advances in medical sciences*, vol. 62, no. 1, pp. 1-16.

- Knights, D., Lassen, K.G. & Xavier, R.J. 2013, "Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome", *Gut*, vol. 62, no. 10, pp. 1505-1510.
- Knipper, J.A., Willenborg, S., Brinckmann, J., Bloch, W., Maass, T., Wagener, R., Krieg, T., Sutherland, T., Munitz, A., Rothenberg, M.E., Niehoff, A., Richardson, R., Hammerschmidt, M., Allen, J.E. & Eming, S.A. 2015, "Interleukin-4 Receptor alpha Signaling in Myeloid Cells Controls Collagen Fibril Assembly in Skin Repair", *Immunity*, vol. 43, no. 4, pp. 803-816.
- Komiya, Y. & Habas, R. 2008, "Wnt signal transduction pathways", *Organogenesis*, vol. 4, no. 2, pp. 68-75.
- Koukos, G., Polytarchou, C., Kaplan, J.L., Morley-Fletcher, A., Gras-Miralles, B., Kokkotou, E., Baril-Dore, M., Pothoulakis, C., Winter, H.S. & Iliopoulos, D. 2013, "MicroRNA-124 regulates STAT3 expression and is down-regulated in colon tissues of pediatric patients with ulcerative colitis", *Gastroenterology*, vol. 145, no. 4, pp. 842-852.e2.
- Kurayoshi, M., Yamamoto, H., Izumi, S. & Kikuchi, A. 2007, "Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling", *The Biochemical journal*, vol. 402, no. 3, pp. 515-523.
- Latella, G. 2018, "Redox Imbalance in Intestinal Fibrosis: Beware of the TGFbeta-1, ROS, and Nrf2 Connection", *Digestive diseases and sciences*, vol. 63, no. 2, pp. 312-320.
- Latella, G., Di Gregorio, J., Flati, V., Rieder, F. & Lawrance, I.C. 2015, "Mechanisms of initiation and progression of intestinal fibrosis in IBD", *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 50, no. 1, pp. 53-65.
- Lawrance, I.C., Rogler, G., Bamias, G., Breynaert, C., Florholmen, J., Pellino, G., Reif, S., Speca, S. & Latella, G. 2017, "Cellular and Molecular Mediators of Intestinal Fibrosis", *Journal of Crohn's & colitis*, vol. 11, no. 12, pp. 1491-1503.
- Lawrence, T. & Natoli, G. 2011, "Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity", *Nature reviews.Immunology*, vol. 11, no. 11, pp. 750-761.
- Lescoat, A., Lecureur, V., Roussel, M., Sunnaram, B.L., Ballerie, A., Coiffier, G., Jouneau, S., Fardel, O., Fest, T. & Jegou, P. 2017, "CD16-positive circulating monocytes and fibrotic manifestations of systemic sclerosis", *Clinical rheumatology*, vol. 36, no. 7, pp. 1649-1654.
- Liaskou, E., Zimmermann, H.W., Li, K.K., Oo, Y.H., Suresh, S., Stamataki, Z., Qureshi, O., Lalor, P.F., Shaw, J., Syn, W.K., Curbishley, S.M. & Adams, D.H. 2013, "Monocyte

- subsets in human liver disease show distinct phenotypic and functional characteristics", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 57, no. 1, pp. 385-398.
- Liu, C., Li, G., Ren, S., Su, Z., Wang, Y., Tian, Y., Liu, Y. & Qiu, Y. 2017a, "miR-185-3p regulates the invasion and metastasis of nasopharyngeal carcinoma by targeting WNT2B in vitro", *Oncology letters*, vol. 13, no. 4, pp. 2631-2636.
- Liu, C., Li, G., Yang, N., Su, Z., Zhang, S., Deng, T., Ren, S., Lu, S., Tian, Y., Liu, Y. & Qiu, Y. 2017b, "miR-324-3p suppresses migration and invasion by targeting WNT2B in nasopharyngeal carcinoma", *Cancer cell international*, vol. 17, pp. 2-016-0372-8. eCollection 2017.
- Macias-Ceja, D.C., Cosin-Roger, J., Ortiz-Masia, D., Salvador, P., Hernandez, C., Esplugues, J.V., Calatayud, S. & Barrachina, M.D. 2017, "Stimulation of autophagy prevents intestinal mucosal inflammation and ameliorates murine colitis", *British journal of pharmacology*, vol. 174, no. 15, pp. 2501-2511.
- Mann, E.R. & Li, X. 2014, "Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells", *World journal of gastroenterology*, vol. 20, no. 29, pp. 9653-9664.
- Minutti, C.M., Jackson-Jones, L.H., Garcia-Fojeda, B., Knipper, J.A., Sutherland, T.E., Logan, N., Ringqvist, E., Guillamat-Prats, R., Ferenbach, D.A., Artigas, A., Stamme, C., Chroneos, Z.C., Zaiss, D.M., Casals, C. & Allen, J.E. 2017, "Local amplifiers of IL-4R α -mediated macrophage activation promote repair in lung and liver", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 356, no. 6342, pp. 1076-1080.
- Molodecky, N.A., Soon, I.S., Rabi, D.M., Ghali, W.A., Ferris, M., Chernoff, G., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Barkema, H.W. & Kaplan, G.G. 2012, "Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review", *Gastroenterology*, vol. 142, no. 1, pp. 46-54.e42; quiz e30.
- Murray, P.J. 2017, "Macrophage Polarization", *Annual Review of Physiology*, vol. 79, pp. 541-566.
- Neurath, M.F. 2014, "Cytokines in inflammatory bowel disease", *Nature reviews. Immunology*, vol. 14, no. 5, pp. 329-342.
- Niida, A., Hiroko, T., Kasai, M., Furukawa, Y., Nakamura, Y., Suzuki, Y., Sugano, S. & Akiyama, T. 2004, "DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway", *Oncogene*, vol. 23, no. 52, pp. 8520-8526.
- Nusslein-Volhard, C. & Wieschaus, E. 1980, "Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*", *Nature*, vol. 287, no. 5785, pp. 795-801.
- Ohta, K., Ito, A., Kuriyama, S., Lupo, G., Kosaka, M., Ohnuma, S., Nakagawa, S. & Tanaka, H. 2011, "Tsukushi functions as a Wnt signaling inhibitor by competing

- with Wnt2b for binding to transmembrane protein Frizzled4", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 36, pp. 14962-14967.
- Okamoto, R. & Watanabe, M. 2016, "Role of epithelial cells in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease", *Journal of gastroenterology*, vol. 51, no. 1, pp. 11-21.
- Olivares-Villagomez, D. & Van Kaer, L. 2018, "Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier", *Trends in immunology*, vol. 39, no. 4, pp. 264-275.
- Orscheln, E.S., Dillman, J.R., Towbin, A.J., Denson, L.A. & Trout, A.T. 2018, "Penetrating Crohn disease: does it occur in the absence of stricturing disease?", *Abdominal radiology (New York)*, vol. 43, no. 7, pp. 1583-1589.
- Palmieri, O., Creanza, T.M., Bossa, F., Latiano, T., Corritore, G., Palumbo, O., Martino, G., Biscaglia, G., Scimeca, D., Carella, M., Ancona, N., Andriulli, A. & Latiano, A. 2017, "Functional Implications of MicroRNAs in Crohn's Disease Revealed by Integrating MicroRNA and Messenger RNA Expression Profiling", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, no. 7.
- Pastorelli, L., De Salvo, C., Mercado, J.R., Vecchi, M. & Pizarro, T.T. 2013, "Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics", *Frontiers in immunology*, vol. 4, pp. 280.
- Pekow, J.R., Dougherty, U., Mustafi, R., Zhu, H., Kocherginsky, M., Rubin, D.T., Hanauer, S.B., Hart, J., Chang, E.B., Fichera, A., Joseph, L.J. & Bissonnette, M. 2012, "MiR-143 and miR-145 are downregulated in ulcerative colitis: Putative regulators of inflammation and protooncogenes", *Inflammatory bowel diseases*, vol. 18, no. 1, pp. 94-100.
- Petronis, A. & Petroniene, R. 2000, "Epigenetics of inflammatory bowel disease", *Gut*, vol. 47, no. 2, pp. 302-306.
- Pohlers, D., Brenmoehl, J., Loffler, I., Muller, C.K., Leipner, C., Schultze-Mosgau, S., Stallmach, A., Kinne, R.W. & Wolf, G. 2009, "TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1792, no. 8, pp. 746-756.
- Qi, Z. & Chen, Y.G. 2015, "Regulation of intestinal stem cell fate specification", *Science China.Life sciences*, vol. 58, no. 6, pp. 570-578.
- Rogler, G., Andus, T., Aschenbrenner, E., Vogl, D., Falk, W., Scholmerich, J. & Gross, V. 1997, "Alterations of the phenotype of colonic macrophages in inflammatory

- bowel disease", *European journal of gastroenterology & hepatology*, vol. 9, no. 9, pp. 893-899.
- Rohr, M., Narasimhulu, C.A., Sharma, D., Doomra, M., Riad, A., Naser, S. & Parthasarathy, S. 2018, "Inflammatory Diseases of the Gut", *Journal of medicinal food*, vol. 21, no. 2, pp. 113-126.
- Sadler, T., Bhasin, J.M., Xu, Y., Barnholz-Sloan, J., Chen, Y., Ting, A.H. & Stylianou, E. 2016, "Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression defines molecular characteristics of Crohn's disease-associated fibrosis", *Clinical epigenetics*, vol. 8, pp. 30-016-0193-6. eCollection 2016.
- Salem, M., Ammitzboell, M., Nys, K., Seidelin, J.B. & Nielsen, O.H. 2015, "ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease", *Autophagy*, vol. 11, no. 4, pp. 585-594.
- Sampietro, G.M., Casiraghi, S. & Foschi, D. 2013, "Perforating Crohn's disease: conservative and surgical treatment", *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*, vol. 31, no. 2, pp. 218-221.
- Scaldaferri, F., Pizzoferrato, M., Lopetuso, L.R., Musca, T., Ingravalle, F., Sicignano, L.L., Mentella, M., Miggiano, G., Mele, M.C., Gaetani, E., Graziani, C., Petito, V., Cammarota, G., Marzetti, E., Martone, A., Landi, F. & Gasbarrini, A. 2017, "Nutrition and IBD: Malnutrition and/or Sarcopenia? A Practical Guide", *Gastroenterology research and practice*, vol. 2017, pp. 8646495.
- Scharl, M., Bruckner, R.S. & Rogler, G. 2016, "The two sides of the coin: Similarities and differences in the pathomechanisms of fistulas and stricture formations in irritable bowel disease", *United European gastroenterology journal*, vol. 4, no. 4, pp. 506-514.
- Scharl, M., Frei, S., Pesch, T., Kellermeier, S., Arikkat, J., Frei, P., Fried, M., Weber, A., Jehle, E., Ruhl, A. & Rogler, G. 2013, "Interleukin-13 and transforming growth factor beta synergise in the pathogenesis of human intestinal fistulae", *Gut*, vol. 62, no. 1, pp. 63-72.
- Scharl, M., Huber, N., Lang, S., Furst, A., Jehle, E. & Rogler, G. 2015, "Hallmarks of epithelial to mesenchymal transition are detectable in Crohn's disease associated intestinal fibrosis", *Clinical and translational medicine*, vol. 4, pp. 1-015-0046-5. eCollection 2015.
- Scharl, M., Rogler, G. & Biedermann, L. 2017, "Fistulizing Crohn's Disease", *Clinical and translational gastroenterology*, vol. 8, no. 7, pp. e106.
- Shi, C., Liang, Y., Yang, J., Xia, Y., Chen, H., Han, H., Yang, Y., Wu, W., Gao, R. & Qin, H. 2013, "MicroRNA-21 knockout improve the survival rate in DSS induced fatal

- colitis through protecting against inflammation and tissue injury", *PloS one*, vol. 8, no. 6, pp. e66814.
- Sobczak, M., Fabisiak, A., Murawska, N., Wesolowska, E., Wierzbicka, P., Wlzlowski, M., Wojcikowska, M., Zatorski, H., Zwolinska, M. & Fichna, J. 2014, "Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases", *Pharmacological reports : PR*, vol. 66, no. 5, pp. 766-775.
- Stedman, A., Nigro, G. & Sansonetti, P.J. 2016, "Microbiota-intestinal stem cells dialog: a key element for intestinal regeneration", *Medecine sciences : M/S*, vol. 32, no. 11, pp. 983-990.
- Steinbach, E.C. & Plevy, S.E. 2014, "The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD", *Inflammatory bowel diseases*, vol. 20, no. 1, pp. 166-175.
- Sun, M., He, C., Cong, Y. & Liu, Z. 2015, "Regulatory immune cells in regulation of intestinal inflammatory response to microbiota", *Mucosal immunology*, vol. 8, no. 5, pp. 969-978.
- Tan, R.J., Zhou, D., Zhou, L. & Liu, Y. 2014, "Wnt/beta-catenin signaling and kidney fibrosis", *Kidney international supplements*, vol. 4, no. 1, pp. 84-90.
- ten Berge, D., Koole, W., Fuerer, C., Fish, M., Eroglu, E. & Nusse, R. 2008, "Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies", *Cell stem cell*, vol. 3, no. 5, pp. 508-518.
- Tetsu, O. & McCormick, F. 1999, "Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells", *Nature*, vol. 398, no. 6726, pp. 422-426.
- Ul-Haq, Z., Naz, S. & Mesaik, M.A. 2016, "Interleukin-4 receptor signaling and its binding mechanism: A therapeutic insight from inhibitors tool box", *Cytokine & growth factor reviews*, vol. 32, pp. 3-15.
- Valatas, V., Filidou, E., Drygiannakis, I. & Kolios, G. 2017, "Stromal and immune cells in gut fibrosis: the myofibroblast and the scarface", *Annals of gastroenterology*, vol. 30, no. 4, pp. 393-404.
- Valenta, T., Degirmenci, B., Moor, A.E., Herr, P., Zimmerli, D., Moor, M.B., Hausmann, G., Cantu, C., Aguet, M. & Basler, K. 2016, "Wnt Ligands Secreted by Subepithelial Mesenchymal Cells Are Essential for the Survival of Intestinal Stem Cells and Gut Homeostasis", *Cell reports*, vol. 15, no. 5, pp. 911-918.
- Vlachos, C., Gaitanis, G., Katsanos, K.H., Christodoulou, D.K., Tsianos, E. & Bassukas, I.D. 2016, "Psoriasis and inflammatory bowel disease: links and risks", *Psoriasis (Auckland, N.Z.)*, vol. 6, pp. 73-92.

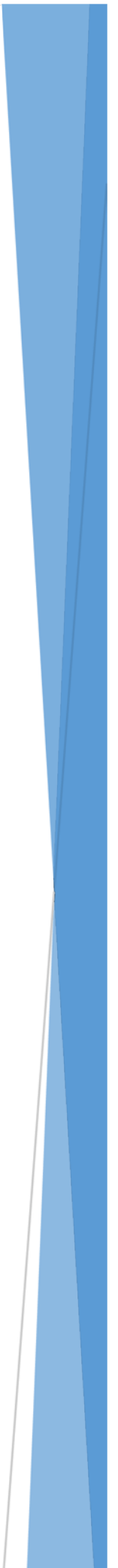
- Wang, J., Cortina, G., Wu, S.V., Tran, R., Cho, J.H., Tsai, M.J., Bailey, T.J., Jamrich, M., Ament, M.E., Treem, W.R., Hill, I.D., Vargas, J.H., Gershman, G., Farmer, D.G., Reyen, L. & Martin, M.G. 2006, "Mutant neurogenin-3 in congenital malabsorptive diarrhea", *The New England journal of medicine*, vol. 355, no. 3, pp. 270-280.
- Wawrzyniak, M. & Scharl, M. 2018, "Genetics and epigenetics of inflammatory bowel disease", *Swiss medical weekly*, vol. 148, pp. w14671.
- Weingarden, A.R. & Vaughn, B.P. 2017, "Intestinal microbiota, fecal microbiota transplantation, and inflammatory bowel disease", *Gut microbes*, vol. 8, no. 3, pp. 238-252.
- Wu, B., Crampton, S.P. & Hughes, C.C. 2007, "Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration", *Immunity*, vol. 26, no. 2, pp. 227-239.
- Wu, F., Zikusoka, M., Trindade, A., Dassopoulos, T., Harris, M.L., Bayless, T.M., Brant, S.R., Chakravarti, S. & Kwon, J.H. 2008, "MicroRNAs Are Differentially Expressed in Ulcerative Colitis and Alter Expression of Macrophage Inflammatory Peptide-2a", *Gastroenterology*, vol. 135, no. 5, pp. 1624-1635.e24.
- Xue, J., Sharma, V., Hsieh, M.H., Chawla, A., Murali, R., Pandol, S.J. & Habtezion, A. 2015, "Alternatively activated macrophages promote pancreatic fibrosis in chronic pancreatitis", *Nature communications*, vol. 6, pp. 7158.
- Yan, D., Wiesmann, M., Rohan, M., Chan, V., Jefferson, A.B., Guo, L., Sakamoto, D., Caothien, R.H., Fuller, J.H., Reinhard, C., Garcia, P.D., Randazzo, F.M., Escobedo, J., Fantl, W.J. & Williams, L.T. 2001, "Elevated expression of axin2 and hnk2 mRNA provides evidence that Wnt/beta-catenin signaling is activated in human colon tumors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, no. 26, pp. 14973-14978.
- Yan, Z., Kui, Z. & Ping, Z. 2014, "Reviews and perspectives of signaling pathway analysis in idiopathic pulmonary fibrosis", *Autoimmunity reviews*, vol. 13, no. 10, pp. 1020-1025.
- Yang, Y., Sun, Y., Wu, Y., Tang, D., Ding, X., Xu, W., Su, B. & Gao, W. 2018, "Downregulation of miR-3127-5p promotes epithelial-mesenchymal transition via FZD4 regulation of Wnt/beta-catenin signaling in non-small-cell lung cancer", *Molecular carcinogenesis*, vol. 57, no. 7, pp. 842-853.
- Yu, T., Chen, X., Zhang, W., Li, J., Xu, R., Wang, T.C., Ai, W. & Liu, C. 2012, "Kruppel-like factor 4 regulates intestinal epithelial cell morphology and polarity", *PLoS one*, vol. 7, no. 2, pp. e32492.
- Zhang, J.Y., Zou, Z.S., Huang, A., Zhang, Z., Fu, J.L., Xu, X.S., Chen, L.M., Li, B.S. & Wang, F.S. 2011, "Hyper-activated pro-inflammatory CD16 monocytes correlate with the

severity of liver injury and fibrosis in patients with chronic hepatitis B", *PloS one*, vol. 6, no. 3, pp. e17484.

Zhou, D., Tan, R.J., Fu, H. & Liu, Y. 2016, "Wnt/beta-catenin signaling in kidney injury and repair: a double-edged sword", *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, vol. 96, no. 2, pp. 156-167.

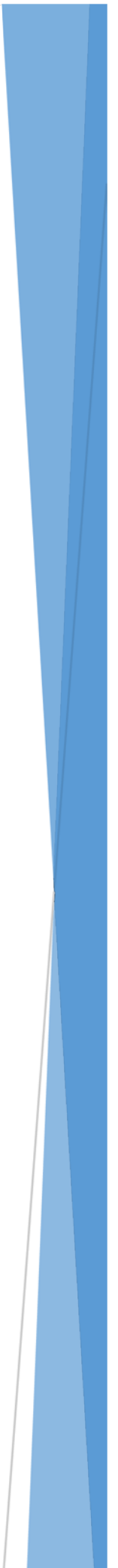
Zizzo, G., Hilliard, B.A., Monestier, M. & Cohen, P.L. 2012, "Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 189, no. 7, pp. 3508-3520.

VIII. PRODUCCIÓN BIBLIOGRÁFICA



- Dionne S., Restillini-Kherad S., Koenekoop J., **Salvador Escribano P.**, Piccirillo C.A., Charlebois P., Liberman A.S., Stein B., Duchatellier, C.F. & Seidman, E., "Characterization of myofibroblasts isolated from the intestine of patients with inflammatory bowel disease", F1000Research, In press.
- Gisbert-Ferrandiz, L., **Salvador, P.**, Ortiz-Masia, D., Macias-Ceja, D.C., Orden, S., Esplugues, J.V., Calatayud, S., Hinojosa, J., Barrachina, M.D. & Hernandez, C. 2018, "A single nucleotide polymorphism in the vitamin D receptor gene is associated with decreased levels of the protein and a penetrating pattern in Crohn's disease", Inflammatory bowel diseases, vol. 24, no. 7, pp. 1462-1470.
- Macias-Ceja, D.C., Cosin-Roger, J., Ortiz-Masia, D., **Salvador, P.**, Hernandez, C., Calatayud, S., Esplugues, J.V. & Barrachina, M.D. 2016, "The flesh ethanolic extract of *Hylocereus polyrhizus* exerts anti-inflammatory effects and prevents murine colitis", Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), vol. 35, no. 6, pp. 1333-1339.
- Macias-Ceja, D.C., Cosin-Roger, J., Ortiz-Masia, D., **Salvador, P.**, Hernandez, C., Esplugues, J.V., Calatayud, S. & Barrachina, M.D. 2017, "Stimulation of autophagy prevents intestinal mucosal inflammation and ameliorates murine colitis", British journal of pharmacology, vol. 174, no. 15, pp. 2501-2511.
- Macias-Ceja, D.C., Ortiz-Masia, D., **Salvador, P.**, Gisbert-Ferrandiz, L., Hernandez, C., Hausmann, M., Rogler, G., Esplugues, J.V., Hinojosa, J., Alos, R., Navarro, F., Cosin-Roger, J., Calatayud, S. & Barrachina, M.D. 2019, "Succinate receptor mediates intestinal inflammation and fibrosis", Mucosal immunology, vol. 12, no. 1, pp. 178-187.
- Ortiz-Masia, D., **Salvador, P.**, Macias-Ceja, D.C., Gisbert-Ferrandiz, L., Esplugues, J.V., Manyé J., Alós, R., Navarro-Vicente, F., Cosin-Roger, Calatayud, S. & Barrachina, M.D. 2019, " WNT2b/FZD4 interaction increases epithelial-mesenchymal transition and may mediate fistula pathogenesis in Crohn´s disease" Journal of Crohn's & colitis, Major revision.
- Salvador, P.**, Macias-Ceja, D.C., Gisbert-Ferrandiz, L., Hernandez, C., Bernardo, D., Alos, R., Navarro-Vicente, F., Esplugues, J.V., Ortiz-Masia, D., Barrachina, M.D. & Calatayud, S. 2018, "CD16+ Macrophages mediate fibrosis in inflammatory bowel disease", Journal of Crohn's & colitis, vol. 12, no. 5, pp. 589-599.

IX. ANEXOS



AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2016/VSC/PEA/00218

Vista la solicitud realizada en fecha **21/11/16** con nº reg. entrada **29741** por D/D^a. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora de Investigación i Política Científica, centro usuario **ES462500001003**, para realizar el procedimiento:

“ Modulación de la fibrosis intestinal por el sistema inmune innato en la enfermedad de crohn: relevancia de la autofagia”

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2016/VSC/PEA/00218** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **Maria Dolores Barrachina Sancho**

Establecimiento: **Animalario Facultad de Medicina-Campus Blasco Ibáñez**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 14 de diciembre de 2016

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Rogelio Llanes Ribas



INFORME DE LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN DEL HOSPITAL DE MANISES

D. Carlos Rodrigo Benito, Presidente de la Comisión de Investigación del Departamento de Salud de Manises,

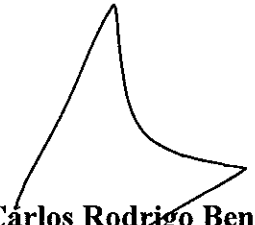
CERTIFICA:

Que esta comisión ha analizado los aspectos éticos y científicos relacionados con el proyecto de investigación titulado:

“MODULACIÓN DE LA FIBROSIS INTESTINAL POR EL SISTEMA INMUNE INNATO EN LA ENFERMEDAD DE CROHN: RELEVANCIA DE LA AUTOFAGIA.”

Que será llevado a cabo en el Servicio de Medicina Digestiva del Hospital de Manises, cuyo investigador principal es el Dr. Joaquín Hinojosa del Val. Que reúne las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica.

Manises a 20 de abril 2016



Dr. Carlos Rodrigo Benito
Director Médico de Atención Primaria
Presidente de la Comisión de Investigación
Hospital de Manises



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD

SECRETARÍA DE ESTADO DE INVESTIGACIÓN
DESARROLLO E INNOVACIÓN
SECRETARÍA GENERAL DE CIENCIA,
TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TÉCNICA
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE RECURSOS
HUMANOS PARA LA INVESTIGACIÓN

**AYUDAS A LA MOVILIDAD PREDOCTORAL PARA LA REALIZACIÓN DE ESTANCIAS BREVES EN
CENTROS DE I+D ESPAÑOLES Y EXTRANJEROS 2016**

CERTIFICADO DE REALIZACIÓN DE ESTANCIA BREVE

Apellidos, nombre: Pedro Salvador Escribano	NIF/NIE: 74519300J
Referencia de la ayuda: EEBB-I-17-12695	Referencia del proyecto: SAF2013-43441-P
Centro de I+D de la ayuda predoctoral: Universitat de València (BES-C-2014-0087)	
ORGANISMO DE I+D RECEPTOR: The Research Institute of the McGill University Health Centre	
CENTRO: The Research Institute of the McGill University Health Centre	
DEPARTAMENTO: Laboratory of Gastroenterology	
PAÍS: Canadá	

El abajo firmante certifica que el/la investigador/a en formación a quien se refiere el presente documento ha permanecido en el centro de trabajo desde el día 1 de Mayo de 2017 hasta el día 31 de Julio de 2017 (*)

ERNEST SEIDMAN MD, FRCP, FRCG

Nombre y apellidos del firmante:

Cargo: *Professor, Dept of Medicine, McGill University*

Fecha: July 31, 2017

Firma y sello

(*) TO BE COMPLETED BY THE HOST RESEARCH DIRECTOR

The undersigned certifies that the scholar has remained in this centre from 01 of May of 2017 until 31 of July of 2017.

Este informe, junto con la memoria de la estancia, una vez cargados en la aplicación de justificación, deberá presentarse en el plazo de 10 días hábiles a contar desde el siguiente a su regreso, en su Centro de I+D de adscripción, quien deberá conservar la documentación justificativa a los efectos de auditoría o comprobación.