



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

RECLUTAMIENTO DE MACRÓFAGOS ASOCIADOS A  
TUMORES DURANTE EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE  
COLON ASOCIADO A COLITIS (CAC) EN DEFICIENCIA DE  
STAT1

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ARMANDO VÁZQUEZ SANDOVAL

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. SONIA ANDREA LEÓN CABRERA



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA EDO. DE MÉXICO., 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>12</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1. CÁNCER DE COLON Y RECTO .....</b>	<b>14</b>
2.1.1. Epidemiología .....	14
2.1.2. Etiopatogenia.....	15
<b>2.2. CÁNCER DE COLON ASOCIADO A INFLAMACIÓN CRÓNICA .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3. MACRÓFAGOS ASOCIADOS A TUMORES DURANTE EL CARCINOMA COLORRECTAL .....</b>	<b>17</b>
2.3.1. Origen de los macrófagos .....	17
2.3.2. Macrófagos clásicamente activados (M1) .....	18
2.3.3. Macrófagos alternativamente activados (M2) .....	18
2.3.4. Macrófagos asociados a tumores (TAMs).....	19
2.3.5. TAMs durante el cáncer de colon y recto (CRC) .....	21
<b>2.4. TRANSDUCTOR DE SEÑALES Y ACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN 1 (STAT1) Y SU RELACIÓN CON EL CAC .....</b>	<b>24</b>
2.4.1. Vía de señalización JAK/STAT1 .....	24
2.4.2. STAT1 y sus funciones supresoras y promotoras de tumores.....	26
2.4.3. STAT1 y su relación con el cáncer de colon y recto .....	27
<b>2.5. MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER DE COLON ASOCIADO A COLITIS (AOM/DSS).....</b>	<b>28</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>31</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
4.1. General.....	31

4.2. Particulares: .....	31
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
5.1. Material Biológico .....	32
5.2. Extracción de DNA por digestión con proteinasa “k” y genotipo de animales knockout (KO) y wild tipe (WT) .....	33
5.3. Inducción del cáncer de colon asociado a colitis (CAC).....	34
5.4. Valoración de Índice de daño de la enfermedad (DAI).....	34
5.5. Sacrificio y Evaluación del CAC.....	35
5.6. PCR y determinación de la expresión de citocinas en el colon .....	36
5.7. Electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos .....	38
5.8. Análisis histológico.....	39
5.9. Tinción Inmunohistoquímica (IHC) .....	40
5.10. Cultivo celular.....	41
5.11. CBA (Cytometric Bead Array) .....	41
5.12. Citometría de flujo .....	42
5.13. Análisis estadístico .....	42
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
6.1. Genotipo de animales STAT1 <sup>-/-</sup> .....	43
6.2. La deficiencia de STAT1 favorece el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis	43
6.3. Los animales deficientes en STAT1 presentan un infiltrado inflamatorio importante y un mayor grado de lesión desde etapas tempranas en el desarrollo tumoral .....	46
6.4. Los animales deficientes en STAT1 presentan un menor infiltrado de células F4/80+ en la mucosa intestinal durante el desarrollo del CAC .....	49
6.5. La deficiencia de STAT1 provoca un decremento en el porcentaje de células iNOS+ en la mucosa intestinal durante las etapas tempranas del CAC .....	49

6.6. La deficiencia de STAT1 favorece el infiltrado de células Arginasa-1+en la mucosa intestinal desde etapas tempranas del desarrollo del CAC .....	50
6.7. La ausencia de STAT1 altera los niveles de expresión de genes asociados a macrófagos M1 en la mucosa intestinal durante el desarrollo del CAC.....	55
6.8. La ausencia de STAT1 altera los niveles de expresión de genes asociados a macrófagos M2 en la mucosa intestinal durante el desarrollo del CAC.....	56
6.9. La deficiencia de STAT1 favorece la producción de la citocina pro-inflamatoria IL-17-a en etapas tempranas y tardías del CAC .....	57
6.10. La deficiencia de STAT1 altera la producción de citocinas durante el desarrollo del CAC	58
6.11. La deficiencia de STAT1 alteró la acumulación de macrófagos totales en el bazo durante el desarrollo del CAC .....	60
6.12. La deficiencia de STAT1 afecta la población de células monocíticas durante el desarrollo del CAC a nivel sistémico .....	63
6.13. Los ratones deficientes de STAT1 presentan un aumento de las células CD11b+Ly6C-Ly6G+ en circulación durante el transcurso del CAC.....	66
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>68</b>
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>79</b>
<b>9. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>81</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

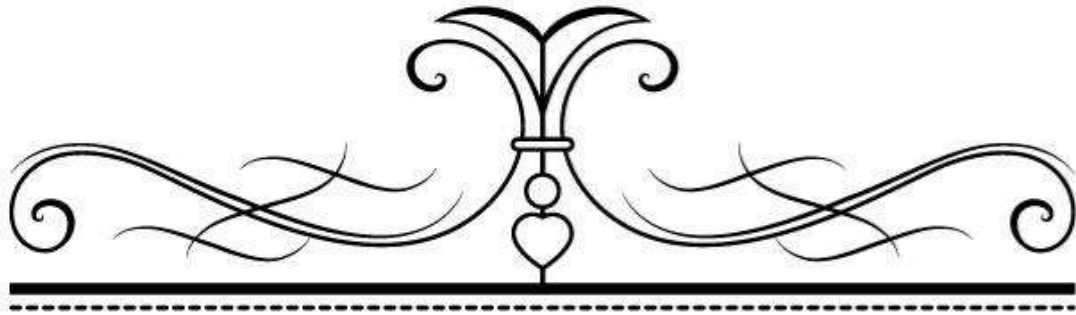
Figura 1. Número estimado de muertes por cáncer en hombres a nivel mundial. Globocan, 2012. ....	14
Figura 2. Número estimado de muertes por cáncer en mujeres a nivel mundial. Globocan, 2012. ....	14
Figura 3. Microambiente inflamatorio y genes involucrados en el crecimiento y desarrollo del CAC. Modificado de Markowitz y Bertagnolli, 2009. ....	17
Figura 4. Mecanismos y funciones de los macrófagos asociados a tumores (TAM). ....	21
Figura 5. Vías de señalización JAK/STAT1 mediadas por IFN.....	26
Figura 6. Metabolismo del Azoximetano (AOM) vía citocromo P450.....	30
Figura 7. Estructura química del Dextran Sulfato de Sodio (DSS), (Tanaka, 2012). ....	31
Figura 8. Interpretación del genotipo de los animales silvestres (WT) y deficientes en STAT1 (KO).....	34
Figura 9. Representación de inducción del modelo del CAC y valoración del índice de daño de la enfermedad.....	34
Figura 10. Corte longitudinal de colon de ratón, en la imagen se muestran 3 regiones establecidas (Proximal, media, distal). ....	36
Figura 11. Genotipo de animales silvestres (WT) y deficientes en STAT1 (STAT1-/-).....	43
Figura 12. Registro del índice de daño de la enfermedad (DAI) (A y B) y Mortalidad de los animales tratados con AOM/DSS a lo largo del desarrollo del CAC (C). ....	44
Figura 13. Registro del cambio en el peso corporal (A) y animales libres de tumores a lo largo del desarrollo del CAC (B). Características macroscópicas del colon (C), número (D) y tamaño (E) de los tumores durante el día 68 del CAC. ....	46
Figura 14. Análisis histopatológico del colon de los animales sanos (control) y de los animales tratados con AOM/DSS, los diferentes ciclos del CAC (día 20, 40 y 68) fueron caracterizados según el estadio de la enfermedad (hiperplasia inflamatoria, displasia y carcinoma) respectivamente. ....	48
Figura 15. Tinción inmunohistoquímica del infiltrado de macrófagos (F4/80+) dentro del tejido colónico en los animales sanos (control) y los animales tratados con AOM/DSS (día 20, 40 y 68).....	52

Figura 16. Análisis por inmunohistoquímica de las células iNOS+ ubicadas dentro del colon en animales sanos (control) y animales bajo tratamiento con AOM/DSS (día 20, 40 y 68)..	53
Figura 17. Tinción inmunohistoquímica del infiltrado de células Arginasa-1+ dentro del tejido colónico en los animales sanos (control) y los animales tratados con AOM/DSS (día 20, 40 y 68).....	54
Figura 18. Análisis de los cambios en la expresión de genes asociados a macrófagos M1 (iNOS y TNF- $\alpha$ ) en el tejido intestinal.....	56
Figura 19. Análisis de los cambios en la expresión de genes asociados a macrófagos M2 (Arginasa-1 y FIZZ-1) en el tejido intestinal.....	57
Figura 20. Análisis de los cambios en la expresión de IL-17A en el tejido intestinal. ....	58
Figura 21. Análisis de la producción de citocinas (pg/mL) relacionadas a respuestas Th1 (A y B), Th2 (C y G) y Th17 (D, F y G) en sobrenadantes de células de bazo estimuladas con anti-CD3 durante 48 hrs durante el transcurso de la enfermedad.....	60
Figura 22. Evaluación por citometría de flujo del reclutamiento de macrófagos totales (F4/80+) y macrófagos alternativamente activados (PD-L2+, MMR+) a nivel de bazo, durante el desarrollo del CAC. ....	62
Figura 23. Análisis por citometría de flujo de reclutamiento de células mieloides monocíticas ( CD11b+Ly6CHigh+, CD11b+Ly6Clow+ y CD11b+Ly6C-) nivel de bazo y sangre periférica durante el desarrollo del CAC.....	65
Figura 24. Análisis por citometría de flujo de reclutamiento de células mieloides granulocíticas ( CD11b+Ly6C-Ly6G*+ y CD11b+Ly6C+Ly6G+-) nivel de bazo y sangre periférica durante el desarrollo del CAC.....	67

## ÍNDICE DE TABLAS

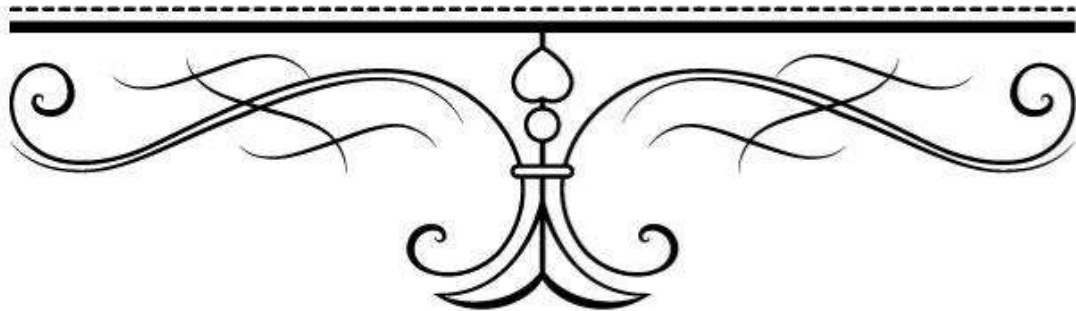
Tabla 1. Organización de los animales para la formación de los grupos de trabajo utilizados en el modelo de inducción del CAC.....	32
Tabla 2. Puntuación asignada para la valoración del índice de daño de la enfermedad (DAI). .....	35
Tabla 3. Condiciones utilizadas en las etapas de la PCR. ....	37
Tabla 4. Secuencias de los primers utilizados para el gen constitutivo (GAPDH), genes de interés (iNOS, TNF-a, Arginasa-1, Fizz-1 e IL-17A) y genotipo de STAT1. Temperaturas de alineación (Tm) y Tamaño del producto (pb).....	38





### DEDICATORIA

*A mis muy queridos padres, porque ustedes han sido mi principal inspiración para poder cumplir mis sueños, en especial éste. Han sido mis acompañantes incondicionales durante todo éste tiempo, siempre en las buenas y las malas han estado ahí mostrándome su apoyo, porque pese a las dificultades, de alguna manera me convencen y me hacen creer que si se puede, porque su amor de padres ha sido tan grande que siempre me ha impulsado a seguir, porque éste logro no solo es mío, también es de ustedes, los amo.*





*Sé el cambio que quieres ver en el mundo.*

*Mahatma Gandhi*

*La ciencia no es una disciplina de razón, sino también de romance y pasión.*

*Stephen Hawking*

*Por favor ve por tus sueños, cualesquiera que sean tus ideales... puedes llegar a ser lo que tú quieras ser.*

*Michael Jackson*



## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es el producto de muchísimo esfuerzo y dedicación, y es para mí de suma importancia agradecer a toda la gente que estuvo presente en ésta experiencia tan inolvidable.

A mis hermanos Enrique, Cristian, Vanessa, Érica y Paola, porque a su manera me han demostrado su cariño y su apoyo, y porque siempre han confiado en mí, los amo.

A Sofía, también has sido una de mis principales inspiraciones, siempre has estado ahí, escuchando mis quejas y mis alegrías sin importar que tan irritante pueda ser. Me has demostrado que puedo acudir a ti cuando lo necesite, y me has hecho ver que soy una persona muy capaz. De verdad gracias por siempre hacer que todo sea mejor con el simple hecho de saber que te tengo a ti, me alegra mucho que estés presente en mi vida.

A mis mejores amigos de casi toda la vida, Alan, Tehua y Anahí, que pese a que es difícil frecuentarnos, siempre me han mostrado todo su apoyo, cariño y siempre me han motivado a seguir, de verdad que su amistad la llevo en mi corazón.

A mis mejores amigos de la FESI, Efraín, Itzel, Emmanuel y Bere, porque ustedes hacen que las horas en el laboratorio sean más amenas y muy divertidas. Porque además he aprendido muchísimo de ustedes no solo académicamente, también he aprendido que se puede encontrar a un hermano en muy poco tiempo, los estimo mucho, de verdad gracias.

A toda mi familia en general, por estar siempre pendientes de mis estudios y porque con alegría, siempre me hicieron ver su confianza en mí.

A mis compañeros de carrera, Arturo, Alberto, Diana y Aracely que fueron mis acompañantes durante muchos años, y fueron motivo de muchas risas y aprendizajes a lo largo de estos años, los quiero.

A Ameyalli, que aunque no te he frecuentado, tú formaste parte del inicio de ésta historia, influiste mucho en mis ganas de estudiar, confiaste en mí y me motivaste a culminarla, de verdad gracias.

Mis compañeras de laboratorio, Megan, Leslie y Yael por apoyarme en el ámbito laboral siempre que lo he necesitado.

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, por haberme brindado la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación, permitirme trabajar en su laboratorio y ser un ejemplo a seguir.

Mi directora de tesis la Dra. Sonia Andrea León, por haberme permitido trabajar con usted, por haberme guiado en ésta etapa tan importante, y ayudarme a concluirla con éxito.

La Universidad Nacional Autónoma de México, FES Iztacala y todos los académicos que con compromiso y dedicación se esforzaron por darme la mejor formación profesional y humana.

Y por último es indispensable agradecer al Programa de Apoyo a proyectos de Investigación Científica y Tecnológica PAPIIT. UNAM, 2016-2017, proyecto IA206216. Y al Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para Promover Grupos de Investigación. FES-IZTACALA. UNAM, 2017.

## **1. RESUMEN**

El cáncer colorrectal (CRC) es una de las neoplasias más comunes a nivel mundial con una incidencia anual de 746,000 y 614,000 casos en hombres y mujeres respectivamente. En México el CRC constituye el primer lugar en incidencia de los tumores del tubo digestivo. La etiología del CRC es muy compleja, las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD) crónicas, como la Colitis Ulcerativa (UC) y la enfermedad de Crohn (CD) son un importante factor etiológico en el desarrollo del CRC ya que pueden aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de colon asociado a colitis (CAC). Se ha sugerido que la patogénesis molecular del epitelio inflamatorio puede jugar un papel crítico en la iniciación y progresión de la carcinogénesis. Los macrófagos asociados a tumores (TAMs) son el principal componente de los infiltrados leucocitarios en el estroma de varios tumores y son reguladores clave entre la inflamación y el cáncer, sin embargo, los mecanismos que regulan el reclutamiento y la diferenciación de estas células en la progresión colitis a cáncer aún no se conocen con claridad. El transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT1) es un mediador importante de numerosas vías de señalización encargadas de mantener la homeostasis y el funcionamiento intestinal, juega un rol esencial en la inmunidad innata ya que señala la unión de diversos interferones (IFN) a su receptor y media la transcripción de varios genes que codifican para proteínas con propiedades antiproliferativas, antivirales y reguladoras de la respuesta inmune. Además, STAT1 puede participar en la movilización y en la activación de los monocitos circulantes que contribuyen a la acumulación de TAMs durante el cáncer. Sin embargo, la función de esta molécula en el mantenimiento y diferenciación de los macrófagos tumorales hacia los fenotipos de activación inflamatoria o anti-inflamatoria durante el cáncer de colon asociado a colitis es desconocido. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó el papel de STAT1 en el reclutamiento de monocitos y su diferenciación a macrófagos asociados a tumores durante la progresión del cáncer de colon asociado a colitis. Para ello, se empleó el modelo experimental de CAC que utiliza AOM/DSS en animales Wild Type (WT) y deficientes en STAT1 (STAT1<sup>-/-</sup>). Los resultados mostraron que los signos asociados a la enfermedad como la diarrea, sangrado rectal y pérdida en el peso corporal fueron menos agresivos en los animales WT en comparación con los animales STAT1<sup>-/-</sup>, en los cuales se observó un daño más exacerbado. Además, los animales WT desarrollaron pólipos/tumores

desde el día 40 hasta el día 68, mientras que el desarrollo de pólipos /tumores en los animales deficientes en STAT1 fue observado desde el día 20 hasta el día 68, mismos en los que se observaron alteraciones histopatológicas más agravadas desde las etapas más tempranas y disminución en la tasa de supervivencia.

El análisis en el infiltrado de macrófagos totales (F4/80+) en el tejido intestinal y en el bazo mostró que los animales deficientes en STAT1 presentan una menor acumulación de estas células en comparación a los ratones WT durante el CAC. La deficiencia de STAT1 provocó un decremento en el porcentaje de células iNOS+ a nivel de colon durante las etapas tempranas del CAC, por el contrario, favoreció el infiltrado de células Arginasa-1+, coincidiendo con el análisis en la expresión de estos genes a nivel de mRNA. De manera interesante, la ausencia de STAT1 permitió un aumento en la expresión de IL-17A en el tejido intestinal y un incremento en la producción de IL-6, IL-10, IL-17A, IL17F e IL-22 en sobrenadantes de células de bazo estimuladas con anti-CD3 sobretodo en etapas tempranas del CAC, sugiriendo una posible participación de la respuesta Th17 en el desarrollo tumoral en dependencia de STAT1. El análisis en el reclutamiento de los monocitos circulantes indicó un incremento significativo en las células monocíticas CD11b+Ly6C<sup>high</sup> en el grupo WT, mientras que los porcentajes de la población de células granulocíticas CD11b+Ly6C-Ly6G+ se vio incrementada en deficiencia de STAT1. Estos datos sugieren que STAT1 está involucrado en la prevención del desarrollo del CAC durante las etapas tempranas, debido a que en ausencia de su señalización existe un desarrollo de la enfermedad más rápido y exacerbado. Esto coincidió con una alteración en las características de los macrófagos en el intestino, con un aumento en el reclutamiento de las células granulocíticas y con una mayor producción de citocinas asociadas a la respuesta Th17, señalando a STAT1 como una molécula clave en las etapas tempranas del cáncer de colon asociado a colitis.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. CÁNCER DE COLON Y RECTO

#### 2.1.1. Epidemiología

El cáncer colorrectal (CRC) es una de las neoplasias más comunes, siendo la tercera más frecuente en hombres con 746,000 casos anualmente y la segunda en mujeres con 614,000 casos, con una mortalidad de 373,639 (Figura 1) y 320,294 (Figura 2) personas a nivel mundial respectivamente, de las cuales al menos el 55% de los casos ocurren en regiones más desarrolladas mientras que en regiones menos desarrolladas la incidencia y la mortalidad es más baja (Globocan, 2012). En México, se presentan anualmente 74,685 muertes por cáncer, perteneciendo el 5.4% a CRC, siendo considerado el primer lugar en incidencia de los tumores del tubo digestivo (Villalobos *et al.*, 2014).

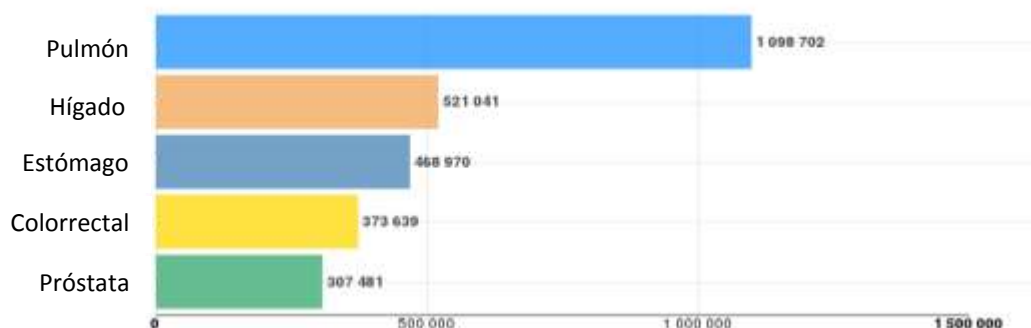


Figura 2. Número estimado de muertes por cáncer en hombres a nivel mundial. Globocan, 2012.

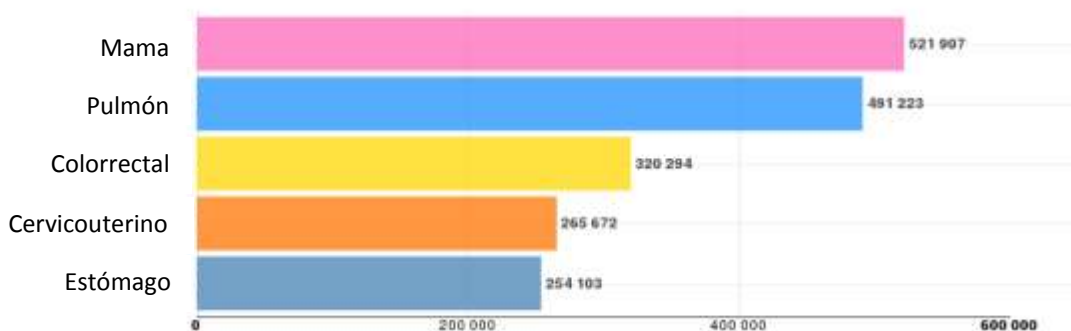


Figura 1. Número estimado de muertes por cáncer en mujeres a nivel mundial. Globocan, 2012.

### **2.1.2. Etiopatogenia**

La etiología del CRC es compleja, incluyendo la interrelación de factores ambientales tales como el estilo de vida y los factores genéticos. Existen diferentes tipos de CRC generados por alteraciones genéticas que son definidos con base a las condiciones clínicas, patológicas y genéticas. Entre ellos se encuentran el Síndrome de Lynch (cáncer colorrectal hereditario no poliposo), Adenomatoso Poliposo Familiar (FAP), FAP atenuado, Poliposis Asociada a MUTYH (MAP), síndrome de Peutz-Jeghers (PJS), Síndrome de Poliposis Juvenil (JPS) y Poliposis Hiperplásica (HPP) siendo éstos la causa del 30% de todos los CRC desarrollados (Jasperson *et al.*, 2010).

Las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD) crónicas, como la Colitis Ulcerativa (UC) y la Enfermedad de Crohn (CD) son un importante factor etiológico en el desarrollo del CRC ya que pueden aumentar la incidencia y la mortalidad asociadas a este padecimiento. El cáncer precedido por alguna IBD es conocido como Cáncer de Colon Asociado a Colitis (CAC). Algunos estudios estiman que la probabilidad de desarrollar CAC después de 10, 20, 25, 30 y 35 años de diagnosticar UC es del 2%, 8%, 14%, 18% y 30% respectivamente (J. Eaden *et al.*, 2001; Rogler, 2013). Estudios realizados en pacientes con CD no muestran gran significancia en incrementar el riesgo de desarrollar CAC (Freeman, 2008; Triantafillidis *et al.*, 2009), además se sabe que el CAC es responsable de aproximadamente el 15% de las muertes generadas por IBD (Lasr, *et al.*, 2016).

## **2.2. CÁNCER DE COLON ASOCIADO A INFLAMACIÓN CRÓNICA**

Se ha sugerido que la patogénesis molecular del epitelio inflamatorio podría jugar un papel crítico en el desarrollo del CAC. Diversos autores han sugerido que los eventos moleculares desencadenados en pacientes con IBD que llegan a desarrollar CAC ocurren de manera similar a los ya descritos en CRC esporádico, incluyendo mutaciones en el gen Adenomatoso Poliposo Coli (APC), activación del oncogen Kristen Ras (KRAS), ciclooxigenasa-2 (COX-2), pérdida de la función de *TP53* y *CDKN2A*, aneuploidias, inestabilidad de microsatélites (MSI), y la hipermetilación del DNA (Axelrad *et al.*, 2016;



Choi *et al.*, 2017). En los últimos años se han producido importantes avances en la comprensión de la base molecular de este tumor y su progresión de adenoma a carcinoma, por lo que se sabe que en el CAC varias vías de señalización se encuentran desreguladas, en particular aquellas que tienen que ver con crecimiento, proliferación, apoptosis, sobrevivencia celular, ciclo celular y sistema inmunológico (Pandurangan y Esa, 2014; O'Connor *et al.*, 2010).

La respuesta inmune puede jugar un papel crítico en la iniciación y progresión de la carcinogénesis. El daño al tejido de la mucosa derivado de infecciones o agentes químicos puede provocar una respuesta inmune crónica. Se sabe que el microambiente inflamatorio durante las IBDs consiste en una interacción entre células inmunes, células epiteliales, células estromales, citocinas y quimiocinas (Axelrad *et al.*, 2016). Dicha interacción tiene como finalidad la regeneración del tejido, si la respuesta inmune falla en resolver el daño, un microambiente rico en citocinas y factores de crecimiento similar provoca una proliferación prolongada en un intento de reparación, resultando en la acumulación de errores genéticos y proliferación continua inapropiada (Mariani *et al.*, 2014), estimulando así mecanismos esenciales en células madre como la activación de las vías (Wnt/ $\beta$ -catenina), Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ /NF $\kappa$ B), Ciclo-oxigenasa 2 (COX-2/PGE<sub>2</sub>), interleucina 23 (IL-23/Th17) e interleucina 6 – Transductor de señales y Activador de la Transcripción 3 (IL-6/STAT-3) (Romano *et al.*, 2016; Luo y Zhang, 2017).

Esta interacción llevada entre los mediadores solubles del microambiente y las diferentes respuestas de las poblaciones celulares del sistema inmunológico juegan un papel dual entre la inflamación y el desarrollo del CAC. Por ejemplo, células inmunes innatas como células dendríticas, células supresoras de origen mieloide (MDSC), neutrófilos, células asesinas naturales (NK) y macrófagos así como células del sistema inmune adaptativo como linfocitos T cooperadores (Th1, Th2 y Th17), linfocitos T citotóxicos (CD8+) y células NKT han mostrado ejercer funciones supresoras de tumores durante el CAC (Monteleone *et al.*, 2012; Formica *et al.*, 2014). Por el contrario, células T reguladoras (Treg), linfocitos Th2, Th17, células NKT y células de tipo mieloide como células dendríticas, MDSC, neutrófilos y macrófagos también pueden favorecer el desarrollo del CAC (Monteleone *et al.*, 2012;

Formica *et al.*, 2014). Por lo tanto, la interacción entre el microambiente inflamatorio y la respuesta inmune puede jugar un papel primordial en la inflamación y el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis (**Figura 3**).

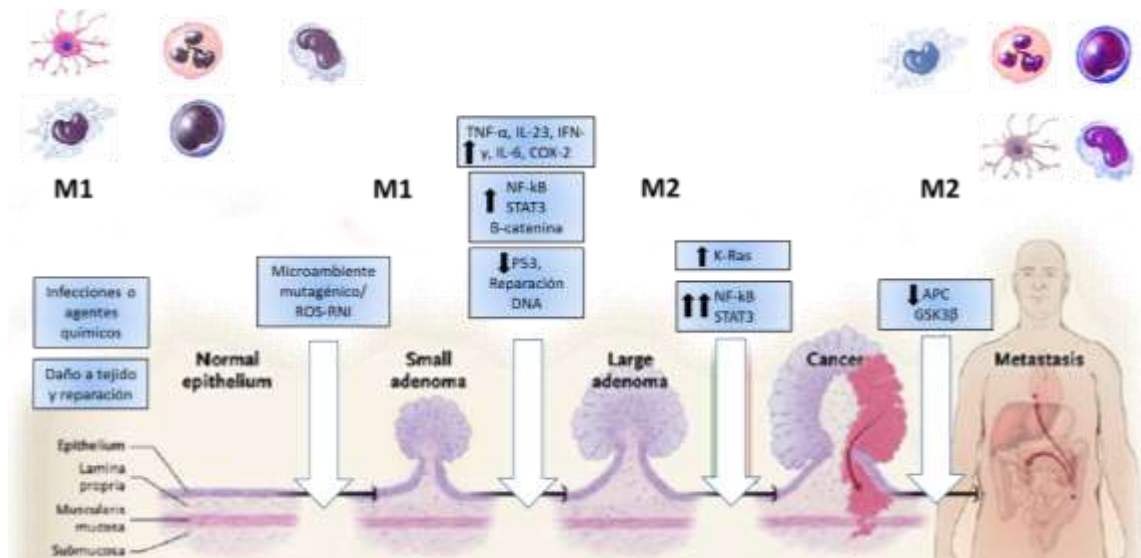


Figura 3. Microambiente inflamatorio y genes involucrados en el crecimiento y desarrollo del CAC. Modificado de Markowitz y Bertagnoli, 2009.

## 2.3. MACRÓFAGOS ASOCIADOS A TUMORES DURANTE EL CARCINOMA COLORRECTAL

### 2.3.1. Origen de los macrófagos

El sistema fagocítico mononuclear (MPS) comprende a los progenitores monocíticos en médula ósea, monocitos circulantes y macrófagos diferenciados en tejidos periféricos. De acuerdo a éste sistema, los macrófagos completamente diferenciados (F4/80<sup>low</sup>) pierden el potencial proliferativo y son repoblados por monocitos circulantes (Ly6C<sup>+</sup>) producidos por progenitores mieloides derivados de médula ósea. Sin embargo, actualmente se sabe que existe una población primitiva de macrófagos capaces de renovarse a sí mismos, que surge antes del desarrollo de la hematopoyesis definitiva, sin necesidad de surgir de un monocito intermediario. Estos macrófagos son originados durante la embriogénesis, provienen de las islas de la sangre y del endotelio hemogénico del saco vitelino extra-embriónico e hígado.

Éstos macrófagos primitivos residentes de tejido pueden ser distinguidos de los macrófagos originados de circulación ya que ellos llegan a expresar altos niveles del receptor acoplado a proteínas G F4/80 (Wynn *et al.*, 2013; Lavin *et al.*, 2015; Ginhoux y Guilliams, 2016).

### **2.3.2. Macrófagos clásicamente activados (M1)**

Los monocitos son considerados por ser precursores de células del sistema fagocítico mononuclear que comprende a los monocitos, células dendríticas (DCs) y macrófagos. Los macrófagos representan del 10 al 20% de todas las células mononucleares encontradas en la lámina propia intestinal. Los macrófagos de tipo I (M1) o clásicamente activados, son macrófagos involucrados en la inmunidad innata, pueden inhibir la proliferación celular y causar daño potencial a tejido y han sido caracterizados por expresar altos niveles de MHC-II, marcadores como CCR7, CD68 y moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86. Además, son capaces de producir grandes cantidades de citocinas proinflamatorias, que están implicadas en los mecanismos contra patógenos intracelulares y células tumorales por secreción de varios agentes, tales como factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucinas 1 $\beta$ , 6, 12, 18, 23, (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23), óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), especies reactivas de oxígeno y/o nitrógeno (ROS/RNS) (Mariani *et al.*, 2014 y Chávez *et al.*, 2015) y quimiocinas como CCL3, CCL4, CXCL9 y CXCL10. Además, promueven la inmunidad adaptativa a través del incremento de la expresión de MHC-II y moléculas coestimuladoras y se caracterizan por expresar IL-12<sup>high</sup>, IL-23<sup>high</sup> e IL-10<sup>low</sup> (Xuan *et al.*, 2015). Por otro lado, la activación de macrófagos M1 ocurre cuando la célula recibe estímulos por IFN- $\gamma$ , producido principalmente por células de tipo Th1, células T citotóxicas y células NK. Sin embargo, también pueden ser activados por lipopolisacáridos (LPS) presentes en la membrana de bacterias Gram negativas y por el factor estimulante de colonias granulo-monocíticas (GM-CSF) (Chávez *et al.*, 2015 y Kapoor *et al.*, 2015).

### **2.3.3. Macrófagos alternativamente activados (M2)**

Los macrófagos de tipo II (M2) o alternativamente activados son originados por varias señales que incluyen CSF-1, IL-4 e IL-13 (M2a), LPS y Ácido lipoteicoico (LTA)

(M2b) y TGF- $\beta$ , IL-10 y glucocorticoides (M2c). Están involucrados en la respuesta contra parásitos extracelulares y hongos, moderan la respuesta inflamatoria, eliminan células dañadas, promueven la proliferación celular y angiogénesis para reparar los tejidos, expresan grandes cantidades de arginasa citosólica (Arg-1), molécula de unión a resistina  $\alpha$  (FIZZ-1), producen quimiocinas como CCL2, CCL17, CCL18, CCL22 y CCL24, y liberan citocinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- $\beta$  relacionadas con la progresión tumoral (Mariani *et al.*, 2014; Pernot *et al.*, 2014; Chávez *et al.*, 2015). Fenotípicamente son caracterizados por ser IL-12<sup>low</sup>, IL-23<sup>low</sup>, IL-10<sup>high</sup> además de expresar altos niveles del receptor de manosa de macrófagos (MMR) también llamado CD206 y el scavenger receptor transmembranal también conocido como CD163 (Xuan *et al.*, 2015).

#### **2.3.4. Macrófagos asociados a tumores (TAMs)**

Los macrófagos son el principal componente de los infiltrados leucocitarios en el estroma de varios tumores y son reguladores clave entre la inflamación y el cáncer. Poco es conocido acerca del origen de los macrófagos asociados a tumores TAMs, algunos estudios han demostrado que cuando el tamaño del tumor es pequeño, los macrófagos residentes de tejido circundante son reclutados dentro y alrededor del tumor mediante la secreción de moléculas quimio-atrayentes y factores de crecimiento (CSF-1/M-CSF, GM-CSF, VEGF y CCL2/MCP-1) derivadas de células tumorales. Sin embargo, cuando el tumor llega a desarrollarse por completo, monocitos circulantes llegan a infiltrarse dentro del tejido tumoral mediante la liberación de CCL2 por parte de las células tumorales y llegan a madurar a TAMs. Además, existe evidencia que sugiere los macrófagos derivados de monocitos y los macrófagos residentes de tejido pueden coexistir dentro del estroma tumoral. Sin embargo, no se sabe si estas observaciones podrían ser específicas de un tipo de tumor en particular o podría ser un paradigma general para explicar el origen de los TAMs (Biswas *et al.*, 2013; Komohara *et al.*, 2015; Yang y Zhang, 2017).

Los TAMs son capaces de ejercer una gran diversidad de funciones que contribuyen a la progresión del cáncer. Por ejemplo, producen daño al DNA, promueven la transformación oncogénica y la sobrevivencia de las células transformadas a través de la liberación de ROS/RNS, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  favoreciendo el desarrollo de cáncer asociado

a inflamación (Biswas *et al.*, 2013). Además, son productores clave de muchos mediadores que promueven y mantienen el crecimiento tumoral a través de la producción de factores de crecimiento. Así mismo, promueven la invasión tumoral mediante el remodelamiento de la matriz extracelular a través de la síntesis de proteasas (Catepsinas, MMP-2, MMP-9) y mediadores solubles (TGF- $\beta$ ), favorecen la angiogénesis y linfangiogénesis a través de la síntesis de MMP-9 y factores solubles (VEGFs, PDGF, CXCL8). Además, ejercen funciones inmunorreguladoras debido a que suprimen la respuesta antitumoral mientras promueven la anergia en células T y la respuesta T reguladora a través de la síntesis de mediadores solubles tales como IL-10, IDO, iNOS, TGF- $\beta$  y CCL22, así como contacto célula a célula a través de la expresión del ligando de muerte celular programada (PD-L1/B7-H1) y el antígeno de linfocito T citotóxico 4 (CTLA4). Adicionalmente, son capaces de promover la metástasis a través de la liberación de quimiocinas (CCL2), proteasas (MMPs), catepsinas y el activador plasminogénico de tipo urinario (uPA) (Galdiero *et al.*, 2013; Biswas *et al.*, 2013; Yang y Xuetao, 2015; Ugel *et al.*, 2015; Komohara *et al.*, 2015) (**Figura 4**).

El papel que desempeñan los TAMs puede ser controversial al determinar el estado clínico del paciente, una alta frecuencia de TAMs se ha asociado con un mal pronóstico en muchos tipos de cáncer (melanoma, mama, riñón, vejiga y colon), sin embargo, no es así en todos los tumores (estómago y colon) (Edin *et al.*, 2012). El balance entre las poblaciones de macrófagos M1 y M2 puede ser un componente clave en determinar la transición de inflamación a tumorigénesis en el CAC (Low *et al.*, 2014) Se ha sugerido que los macrófagos M1 son abundantes en sitios de inflamación crónica y donde se inician los tumores y comienzan a desarrollarse. Además, es posible que los macrófagos cambien al fenotipo M2 cuando el tumor llega a invadir, vascularizar y a desarrollarse (mama, próstata, linfoma, colon) (Mariani *et al.*, 2014 y Pernet *et al.*, 2014). Sin embargo, existe evidencia experimental que propone que los TAMs comparten un fenotipo entre la polarización M1 y M2, sugiriendo la existencia de un fenotipo cambiante “M3” (Chávez *et al.*, 2015; Malyshev y Malyshev, 2015).

El fenotipo M3 rompe con el concepto universal que dice que los macrófagos clásicos son generados en respuesta a factores de reprogramación M1 (RF-M1) generando una respuesta proinflamatoria, así como los macrófagos alternativamente activados son

generados en respuesta a factores de reprogramación M2 (RF-M2) induciendo una respuesta antiinflamatoria. El tercer fenotipo de macrófagos en respuesta a RF-M1 induce un incremento en la producción de las citocinas antiinflamatorias y se reprograma así mismo al fenotipo M2 (fenotipo M1/2) y por otra parte, en respuesta a RF-M2 induce un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias reprogramándose así mismo al fenotipo M1 (fenotipo M2/1) (Malyshev y Malyshev, 2015).

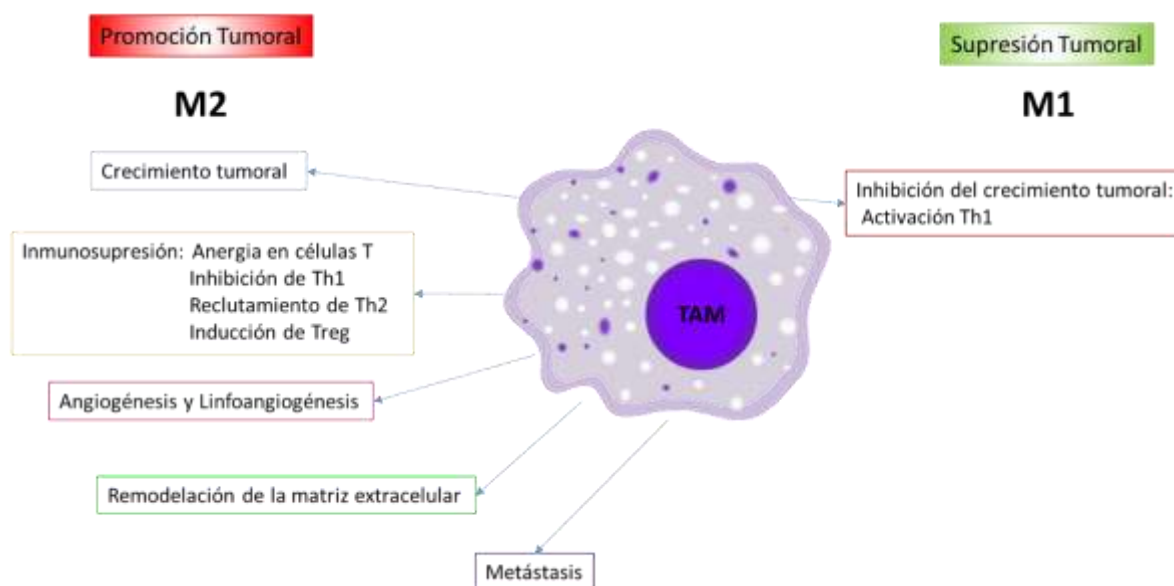


Figura 4. Mecanismos y funciones de los macrófagos asociados a tumores (TAM).

### 2.3.5. TAMs durante el cáncer de colon y recto (CRC)

Las funciones de los TAMs durante el cáncer colorrectal son controversiales. Los macrófagos durante las IBD se han asociado con un incremento en el riesgo de desarrollar CAC. Diversos estudios retrospectivos reportan datos conflictivos entre la correlación de los macrófagos y el pronóstico de los pacientes. Sin embargo, al contrario de otros tipos de cáncer, un incremento en el infiltrado de macrófagos en el tumor se asocia con un mejor pronóstico.

Dentro de los estudios realizados en humanos utilizando biopsias de pacientes con CRC se encuentran los realizados por Edin *et al* en 2012, ellos observaron que durante el desarrollo de CRC en humanos (485 biopsias), una infiltración de macrófagos M1 (iNOS+) es acompañada con un infiltrado de macrófagos M2 (CD163+), sin embargo el alto infiltrado tumoral de macrófagos M1 fue correlacionado con un mejor pronóstico que aquellos pacientes con un poco infiltrado de M1. Por otro lado, Shabo y colaboradores en 2014 reportaron un alto infiltrado de macrófagos CD163+ en el estroma de tumores de CRC humanos (75 pacientes) siendo mayor en aquellos tumores de etapas avanzadas (III y IV) en donde las células cancerígenas eran positivas para CD163, lo cual fue correlacionado con un acortamiento en el promedio de sobrevivencia del paciente. Así mismo, Badawi *et al* en 2015 realizaron un estudio en biopsias de pacientes con CRC y pólipos adenomatosos benignos, observando un mayor infiltrado de macrófagos CD68+ en tejido carcinogénico así como una mayor hipervascularidad que fue correlacionado con el alto infiltrado de macrófagos. Además, Chenguang y colegas (2015) observaron un alto porcentaje de monocitos circulantes CD14+CD169+, CD14+CD169+CD163+, CD14+CD169+CD206+ y macrófagos infiltrados en tumores (TIMs) CD14+CD169+, IL-10+CD14+CD169+ en pacientes con CRC en comparación con los sanos y lo correlacionaron con altos niveles de IL-10 en plasma; además de observar una alta correlación en el porcentaje de células CD14+CD169+ presentes en tejido colónico y sangre durante las etapas avanzadas de CRC.

Sin embargo, algunos autores han demostrado que la presencia de TAMs dentro del tejido tumoral es correlacionado con un mejor pronóstico del paciente. Funada y colaboradores en 2003 mediante la examinación de 97 adenocarcinomas de colon y recto, observaron que los pacientes con bajos niveles de infiltrado de macrófagos CD68+ mostraban una invasión significativamente más alta en comparación con los pacientes con un mayor nivel de infiltrado de macrófagos. Además, los pacientes con mayor infiltrado de células CD68+ mostraron una menor invasión vascular, así como menor metástasis a nódulos linfáticos. Así mismo, Forssell *et al.*, 2007 mediante el análisis de 446 especímenes de CRC observaron que la alta densidad de macrófagos CD68+ confería un aumento significativo en el promedio de sobrevivencia; además reportaron que las propiedades tumoricidas de éstos macrófagos era dependiente del contacto directo célula tumoral-macrófago.

No obstante, existen evidencias realizadas en roedores que demuestran la importancia de la heterogeneidad de los macrófagos involucrados en el desarrollo del carcinoma colorrectal. Wan *et al* en 2013 observaron la dinámica de macrófagos M1/M2 peritoneales en ratones machos Crj: CD-1 (ICR) durante la carcinogénesis colorrectal inducida con AOM/DSS, concluyendo que citocinas asociadas a inflamación (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10) y factores asociados a migración e invasión (G-CSF, GM-CSF, CXCR4, VEGF, ICAM-1) son aumentados significativamente por macrófagos M2 en diferentes etapas del desarrollo del CAC (displasia, carcinoma y metástasis), mientras que en macrófagos M1 solo se ven aumentados en las etapas de carcinoma y metástasis (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , G-CSF, GM-CSF, CXCR4, ICAM1). El mismo grupo de investigadores en 2015 evaluó la dinámica de macrófagos M1/M2 colorrectales en ratones machos Crj: CD-1 (ICR) durante la carcinogénesis colorrectal inducida con AOM/DSS, observando un alto porcentaje de macrófagos totales CD68+ en hiperplasia inflamatoria, displasia y carcinoma; existiendo una disminución en el porcentaje de macrófagos M1 (CD11b+CD68+F4/80+CD16/32+) después de la semana 10 post-inducción mientras que en los macrófagos M2 (CD11b+CD68+F4/80+CD206+) observaron un aumento entre las semanas 10 y 16, sugiriendo que la expresión de macrófagos M2 es principalmente correlacionado con etapas tempranas del desarrollo del CAC. Así mismo observaron en macrófagos M1 una alta expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6), (IL-12, TNF- $\alpha$ ), (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-10) durante la hiperplasia inflamatoria, displasia y metástasis respectivamente, mientras que en macrófagos M2 la expresión de éstas citocinas fue expresada principalmente en metástasis (Wan *et al* en 2015).

Por otra parte, Nakanishi *et al* en 2011 observaron en ratones *Apc<sup>min/+</sup>* un mayor infiltrado de macrófagos F4/80+ en pólipos grandes de intestino delgado en comparación con pólipos pequeños, así mismo observaron una menor expresión de genes asociados a M1 (iNOS, CXCL10) en ambos pólipos en comparación con tejido sano, mientras que la expresión de genes asociados a M2 (Arginasa 1, Ym-1, MMR, Trem2) fue más alta. Además, observaron que mediante la inhibición de COX-2 con celecoxib existe un cambio en el fenotipo de TAMs de M2 a M1 posiblemente influenciado por un aumento en la producción



de IFN- $\gamma$ , correlacionando estos datos con una reducción en el número de pólipos en ratones *Apc<sup>min/+</sup>*. De manera similar, un estudio llevado por McClellan y colaboradores en 2012 realizado en ratones machos *Apc<sup>min/+</sup>/MCP-1<sup>-/-</sup>* asociaron una disminución en el infiltrado de macrófagos F4/80+ en tejido de pólipo y tejido circundante intestinal, así mismo observaron una disminución en la expresión de marcadores asociados a M1 (IL-12 e IL-23) y M2 (CD206, IL-13, TGF- $\beta$  y CCL17), además de contrarrestar la expresión de IL-1 $\beta$  e IL-6 en tejido intestinal y TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en tejido de pólipo, así como prevenir el decremento en la expresión de SOCS1.

En conjunto, éstos estudios demuestran la controversia generada acerca del papel ejercido por los TAMs durante el desarrollo del cáncer de colon, además de exponer la coexistencia entre las poblaciones M1 y M2, así como la diversidad de funciones ejercidas por éstas poblaciones durante las diferentes etapas del CRC. Por lo tanto entender los mecanismos que regulan el reclutamiento así como las funciones ejercidas por los TAMs durante el carcinoma colorrectal asociado a colitis es de suma importancia.

La vía que regula a los macrófagos no ha sido entendida completamente, sin embargo se sabe que existen factores transcripcionales y reguladores postranscripcionales capaces de regular la polarización M1/M2; los factores de transcripción NF-kB, AP-1, C/EBP $\alpha$ , PU.1, IRFs (factores regulatorios de interferón) y (transductor de señales y activador de la transcripción 1) STAT1 promueven la activación M1, mientras que STAT3/6, IRF4, PPAR $\gamma$ , y C/EBP $\beta$  promueven la polarización M2 (Zhuo *et al.*, 2014).

## **2.4. TRANSDUCTOR DE SEÑALES Y ACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN 1 (STAT1) Y SU RELACIÓN CON EL CAC**

### **2.4.1. Vía de señalización JAK/STAT1**

STAT1 es un transductor de señales de varios polipéptidos ligandos (91kDa) con la habilidad de actuar como factor de transcripción modulando la expresión de genes efectores que están particularmente bajo su control. Estas proteínas están localizadas de forma inactiva

en el citoplasma. Su activación, como una consecuencia de la activación de receptores mediados por ligandos es promovida por las Janus Tirosin Kinasa (JAKs), que están constitutivamente asociadas con los receptores apropiados. La señalización del ligando resulta en la dimerización u oligomerización del receptor y subsecuente activación de las JAKs. Una vez que ha sido activado, la proteína JAK fosforila los residuos de tirosina en la región citoplasmática del receptor para proporcionar sitios de unión para el reclutamiento de moléculas capaces de reconocer el dominio de unión de fosfotirosina. Estas regiones de tirosina del receptor son reconocidas por los dominios SH2 de las STATs, así median el reclutamiento de las STATs al complejo del receptor y su fosforilación en una tirosina conservada por las JAKs activadas. En algunas STATs, los residuos de serina son también fosforilados, influenciando la magnitud de la transcripción; estudios recientes han revelado la importancia de la fosforilación de la serina 727 de STAT1 en la mediación de una vía apoptótica en las células. Después de liberarse del receptor, las STATs activadas se dimerizan y se translocan dentro del núcleo donde se unen a elementos de respuesta del DNA específicos en los promotores de genes blanco y así inducen la expresión de genes específicos (Adámková *et al.*, 2007). STAT1 puede formar homodímeros que se unen a secuencias activadas por interferón gamma (GAS); o heterodímeros con STAT2 que se unen a elementos de respuesta estimulados por IFN (ISREs) y miembros de la familia IRF que también pueden unirse a secuencias de ISREs (Chávez *et al.*, 2015). Además, STAT1 es un mediador de señales que controla funciones de muerte celular en el contexto de señales dependientes de IFN, donde está involucrado en vías de señalización pro-apoptóticas y anti-proliferativas (Kim y Lee, 2007). El proceso de activación STAT es transitorio y su desactivación tiene lugar tanto en citoplasma y núcleo por mediación de diversas moléculas tales como proteínas inhibitoras de las STATs activadas (PIAS), supresores de señalización de citosinas (SOCS), y las fosfatasas 1 y 1B (Adámková L. *et al.*, 2007) (**Figura 5**).

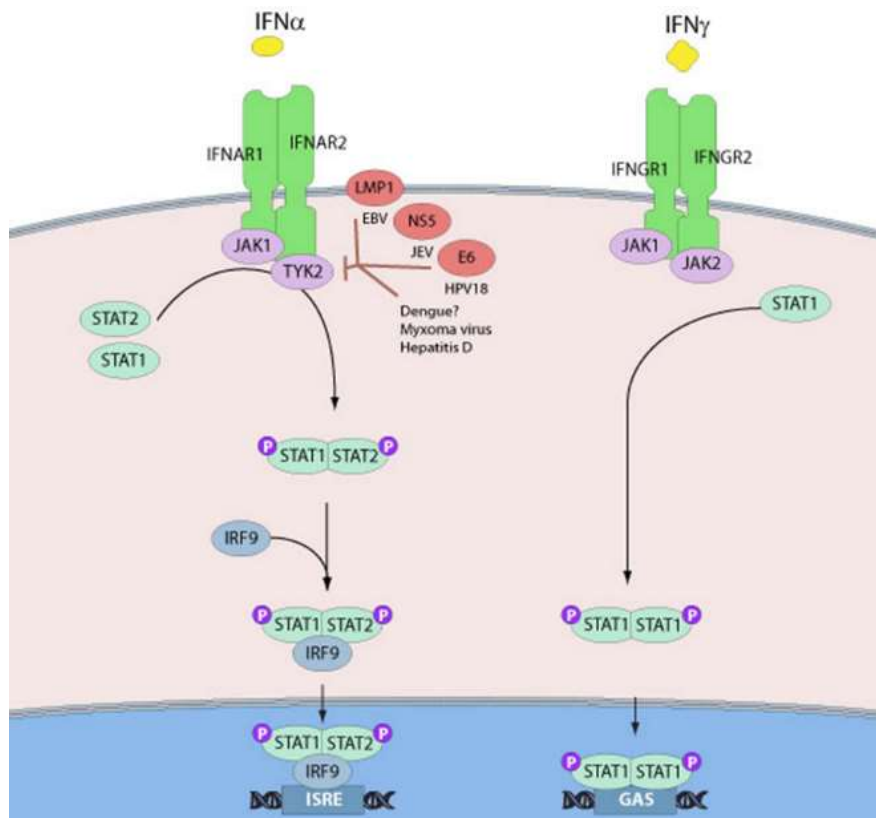


Figura 5. Vías de señalización JAK/STAT1 mediadas por IFN.

#### 2.4.2. STAT1 y sus funciones supresoras y promotoras de tumores

En general STAT1 ha sido considerado por ejercer funciones supresoras de tumores, sin embargo, existen evidencias que sugieren que STAT1 promueve el desarrollo de tumores. Las propiedades supresoras de tumores han sido deducidas debido a que la viabilidad o activación de ésta molécula es reducida o indetectable durante la progresión de varios tumores en humanos; además, una alta expresión de STAT1 ha sido correlacionado con un buen pronóstico del paciente en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer colorrectal, carcinoma hepatocelular, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de mama y melanoma (Meissl *et al.*, 2015). Por el contrario, algunos estudios han demostrado que existe una correlación entre niveles elevados de STAT1 citoplasmático y STAT1 activado (pSTAT1) con un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mama, sarcoma de tejidos blandos (Meissl *et al.*, 2015).

### 2.4.3. STAT1 y su relación con el cáncer de colon y recto

Diversos estudios han demostrado que STAT1 parece cumplir un rol fundamental en el desarrollo del cáncer de colon. Un estudio realizado con 462 biopsias de pacientes con CRC invasivo primario efectuó un análisis de correlación entre la expresión del receptor de  $\text{IFN}\gamma$  (IFNGR1), células T intratumorales (ITTC), STAT1 y los criterios clínico-patológicos; ellos observaron que la expresión de STAT1 citoplasmático fue encontrado en el 85.1% de los tumores mientras que STAT1 nuclear (nSTAT1) representó solo el 17.7%. Así mismo determinaron que existía una fuerte relación entre la expresión de nSTAT1, el grado histológico además de asociarlo con una mayor sobrevivencia. Por otra parte, se determinó que los mayores niveles de expresión del IFNGR1 se encontraban en tumores poco diferenciados y que los tumores nSTAT1+ presentaban un mayor infiltrado de ITTC, lo cual también fue asociado con una mayor sobrevivencia, (D. Simpson *et al.*, 2010). Por otra parte, Gordziel y colaboradores en 2013 utilizando muestras de pacientes con CRC en estadios II y III, analizaron la expresión de STAT1 nuclear/citosólica y observaron que la longevidad de los pacientes se correlacionaba con mayores niveles de expresión de STAT1 nuclear, existiendo una media de sobrevivencia de 30 meses más en los tumores con alta actividad de STAT1. De manera similar Nivarthi *et al.*, analizaron la expresión de STAT1/STAT3 nuclear en muestras de pacientes con CRC y observaron que la expresión de STAT1 nuclear “high” / STAT3 nuclear “low” se correlacionaba fuertemente con un aumento de vida del paciente (media de sobrevivencia de 120 meses), mientras que la baja expresión nuclear de STAT1 y STAT3 se correlacionada con un acortamiento en la longevidad (media de sobrevivencia de 87 meses). En un estudio utilizando fibroblastos intestinales normales (18Co) se demostró que éstas células son capaces de inhibir el crecimiento de células tumorales (HCT116) a través de la activación de la vía de señalización de STAT1, cuya propiedad es interferida con el tratamiento de  $\text{TNF-}\alpha$ ; así mismo, observaron que miofibroblastos intestinales activados obtenidos de pacientes con IBDs capaces de producir  $\text{TNF-}\alpha$ , no eran capaces de activar la vía de señalización de STAT1 en las células tumorales, demostrando que los miofibroblastos activados perdían la capacidad de inhibir el crecimiento de las células tumorales; adicionalmente se observó que la inhibición de STAT1 en las células tumorales repercutía en la interacción entre éstas y los fibroblastos, confirmando la importancia de STAT1 en la

inflamación y el CAC (Kaler *et al.*, 2014). Sin embargo, aunque el papel de STAT1 en la tumorigénesis aparenta ser complejo, estos hallazgos demuestran que STAT1 puede actuar como un inhibidor de la progresión tumoral mediante la restricción del crecimiento del tumoral.

Por otra parte, en el desarrollo tumoral, y en el caso de procesos inflamatorios crónicos en donde existe una alta demanda de macrófagos, se ha visto que los monocitos circulantes convencionales, que se caracterizan por la expresión de moléculas Gr1+/Ly6C+ con origen en médula ósea, contribuyen de manera importante a la población de TAMs (Movahedi *et al.*, 2010). En el ratón, se han descrito diferentes tipos de monocitos con base en los niveles de expresión de Ly6C en su superficie, de manera que pueden ser clasificados como Ly6C<sup>high</sup>CCR2+ o Ly6C<sup>Low</sup>CCR2-, los cuales muestran diferentes funciones y patrones de migración. STAT1 puede controlar la transcripción del gen que codifica para la citocina hematopoyética M-CSF, favoreciendo el infiltrado de macrófagos en el tumor así como la proliferación in situ de estas células (Tymszuk *et al.*, 2014). Además, la deficiencia en STAT1 causa una disminución en el número de células MHCIIloF4/80hi en el tumor, así como una baja en la expresión de genes relacionados con el fenotipo de activación del macrófago M2 (Tymszuk *et al.*, 2014). Estas evidencias demuestran que STAT1 parece ser esencial para regular las poblaciones de TAMs. Sin embargo, el rol de esta molécula en el mantenimiento y diferenciación de los macrófagos tumorales hacia los fenotipos de activación inflamatoria o anti-inflamatoria durante el cáncer de colon asociado a colitis es desconocido.

## **2.5. MODELO EXPERIMENTAL DE CÁNCER DE COLON ASOCIADO A COLITIS (AOM/DSS)**

Actualmente existe una gran variedad de modelos murinos que proveen de importantes herramientas para investigar el desarrollo y patogénesis del CRC, éstos modelos ayudan a entender las alteraciones genotípicas y fenotípicas secuenciales que ocurren en las células alteradas y en la homeostasis del hospedero que pueden llegar a ser observadas en el humano; aunque los modelos animales no pueden sustituir casos clínicos en el humano, éstos

modelos pueden ser usados para generar estrategias con fines terapéuticos o preventivos al desarrollo de la enfermedad. Dentro de los carcinogénicos químicos más usados en modelos murinos para generar lesiones similares a las observadas en humano se encuentran: aminas heterocíclicas, aminas aromáticas, componentes alquilnitrosamidas y azoxymetano (De Robertis, *et al.*, 2011).

La utilización de Azoxymetano (AOM) y Dextran Sulfato de Sodio (DSS) para culminar en el desarrollo cáncer de colon asociado a colitis descrito por Tanaka y colaboradores en 2003, es un excelente modelo reproducible que se basa en el daño al DNA por inducción química mediada por AOM, seguido de repetidos estímulos de inflamación colónica generados por DSS, para simular los fenómenos patofisiológicos observados durante el CAC en el humano.

El AOM (Metil-metilimino-oxidoazano,  $\text{CH}_3\text{N}=\text{N}(\rightarrow\text{O})\text{CH}_3$ ) es un pro carcinogénico que es metabolizado en hígado y/o intestino (Megaraj *et al.*, 2014) por el citocromo p450 isoforma CYP2E1, convirtiéndolo en metilazoximetanol (MAM), una molécula inestable que al paso de 12 horas puede descomponerse o simultáneamente puede ser activada por bacterias de la flora intestinal para generar formaldehído y una especie reactiva altamente alquilante, el ion metildiazonio. El metildiazonio, al ser liberado en la bilis puede entrar en contacto con el DNA del epitelio colónico adicionando grupos metil en la posición  $\text{O}_6$  o  $\text{N}_7$  de la guanina (O6-metil-deoxiguanosina y N7-metil-deoxiguanosina), resultando en la transición de purinas ( $\text{G} \rightarrow \text{A}$ ); la metilación en la posición  $\text{O}_6$  de la guanina a mostrado ser el evento promutagénico primario mediado por el AOM (Sohn *et al.*, 2001; Rosenberg *et al.*, 2009) (**Figura 6**).

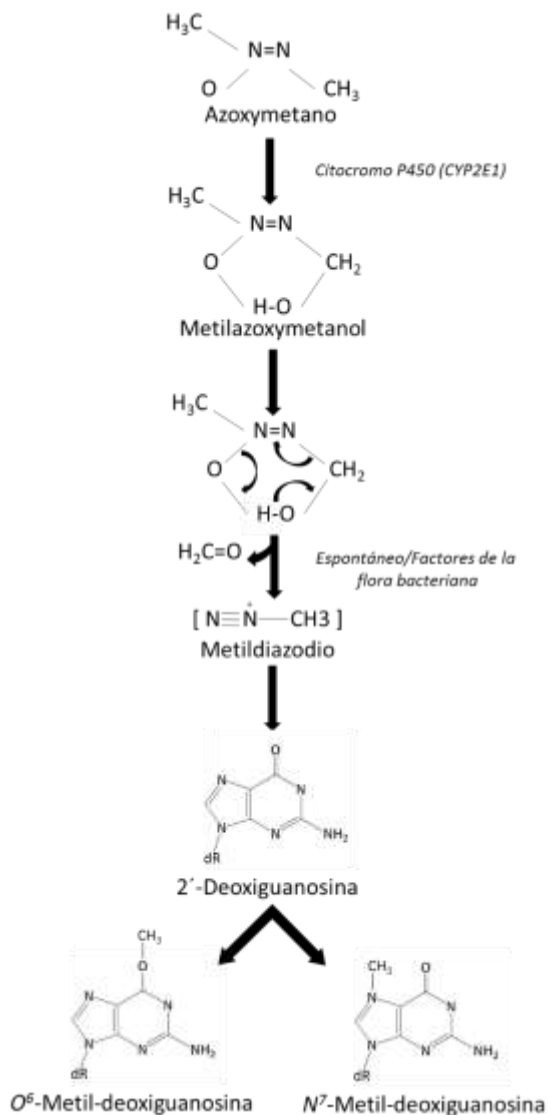


Figura 6. Metabolismo del Azoximetano (AOM) vía citocromo P450

El DSS es un polisacárido similar a la heparina con propiedades anticoagulantes que inflige daño al epitelio colónico induciendo colitis similar a las observadas en las IBDs (Chassaing *et al.*, 2015). El mecanismo de acción por el cual el DSS induce colitis no ha sido descrito completamente, algunas hipótesis mencionan que el DSS puede penetrar a la célula por difusión pasiva o por difusión activa mediante un receptor específico, sin embargo se ha reportado que la formación de complejos DSS-ácidos grasos de cadena media, es un mecanismo por el cual se induce colitis en ratones (Laroui *et al.*, 2012) (**Figura 7**).

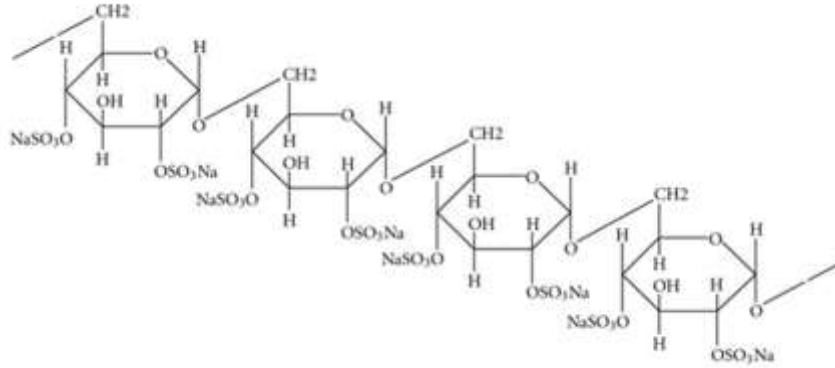


Figura 7. Estructura química del Dextran Sulfato de Sodio (DSS), (Tanaka, 2012).

### 3. HIPÓTESIS

La ausencia de STAT1 favorecerá el desarrollo tumoral durante el cáncer de colon y recto asociado a colitis a través de promover el reclutamiento y la activación de monocitos-macrófagos con fenotipo permisivo hacia el crecimiento tumoral.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1. General

Evaluar el papel de STAT1 en el reclutamiento de monocitos y su diferenciación a macrófagos asociados a tumores durante la progresión del cáncer de colon asociado a colitis.

#### 4.2. Particulares:

- Estandarizar el modelo experimental que utiliza Azoximetano y Dextran Sulfato de Sodio (AOM/DSS) como inductor del cáncer en ratones silvestres y deficientes en STAT1.
- Evaluar cambios en el peso corporal y signos asociados al desarrollo del CAC.



- Determinar los cambios histopatológicos durante el desarrollo del CAC experimental en dependencia de STAT1.
- Determinar el perfil de activación de los macrófagos en el intestino, el bazo y los nódulos linfáticos mesentéricos durante el desarrollo del CAC en dependencia de STAT1.
- Analizar cambios en la expresión y en la producción de citocinas, así como marcadores de macrófagos M1 y M2 en el intestino.
- Analizar el reclutamiento de monocitos periféricos en las diferentes etapas del desarrollo del CAC en animales silvestres y STAT1<sup>-/-</sup>.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material Biológico

Se utilizaron 21 ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad de la cepa BALB/c y ratones deficientes en el gen que codifica para la proteína STAT1 con fondo genético BALB/c (STAT1<sup>-/-</sup>) reproducidos y mantenidos en el bioterio de la FES-Iztacala, UNAM. Los ratones STAT1 KO se caracterizan por poseer dentro de su genoma un neo casete que reemplaza los exones 3 y 5 y parte del exón 2 del gen codificante para STAT1, eliminando la función del gen. Los ratones se dividieron en los siguientes grupos de trabajo (**Tabla 1**):

	<b>Grupo</b>	<b>Número de ratones por ciclo de inducción (20, 40 y 68)</b>	<b>Subtotal</b>
<i>Cepa</i>	Balb/C Control	3	12
	Balb/C CAC	4	12
	STAT1 <sup>-/-</sup> Control	3	12
	STAT1 <sup>-/-</sup> CAC	4	12

*Tabla 1. Organización de los animales para la formación de los grupos de trabajo utilizados en el modelo de inducción del CAC*

## 5.2.Extracción de DNA por digestión con proteinasa “k” y genotipo de animales knockout (KO) y wild tipe (WT)

Con la finalidad de cerciorarse de que efectivamente los animales KO con fondo Balb/C eran deficientes de STAT1 se decidió extraer DNA de tejido mediante una digestión enzimática para comprobar mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR) la deficiencia o presencia de ésta molécula. Con la ayuda de material quirúrgico se tomó un fragmento de cola de aproximadamente 1cm y se colocó en un tubo eperndorf de 1.5mL al cual se le añadieron 500µL de buffer de lisis de proteinasa K (100mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% DSS) pH8 y 10µL de proteinasa K 20mg/mL los cuales se homogenizaron con la ayuda de un vortex. Posteriormente se incubó la muestra a 56°C durante 2 horas para la digestión del tejido, transcurrido el tiempo, cada muestra se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. , se recuperó el sobrenadante (fase acuosa) y se colocó en un tubo nuevo. Para precipitar el DNA se agregaron 500µL de isopropanol frío (-20°C) y se homogenizó la mezcla cuidadosamente por inversión; una vez homogenizado se centrifugó nuevamente a 12,000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se obtuvo la pastilla de DNA decantando el sobrenadante; posteriormente se agregaron 500µL de etanol al 75% frío (-20°C) con la finalidad de lavar la pastilla y se resuspendió la misma por inversión. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min a 4°C y se decantó el sobrenadante; finalmente se dejó secar la pastilla invirtiendo los tubos durante 1 hora (hasta eliminar los restos de etanol) y se resuspendió el material genético con 200µL de H2O Milli-Q.

El DNA se cuantificó con ayuda del *Epoch™ Multi-Volume multi-sample Spectrophotometer System* y se verificó la integridad del mismo mediante una electroforesis en gel de agarosa y se procedió a hacer la PCR utilizando primers específicos (**Tabla 4**). El resultado obtenido se interpretó de acuerdo a la **Figura 8**.

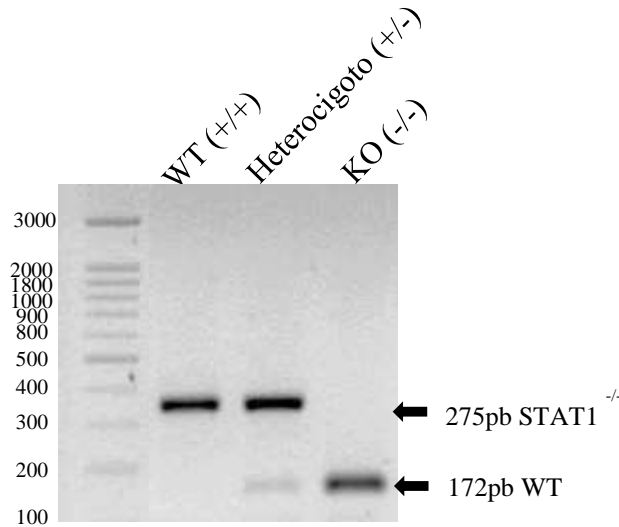


Figura 8. Interpretación del genotipo de los animales silvestres (WT) y deficientes en STAT1 (KO)

### 5.3. Inducción del cáncer de colon asociado a colitis (CAC)

Se administró vía intraperitoneal azoximetano (AOM) como iniciador del cáncer a 12 ratones Balb/C y STAT1<sup>-/-</sup> a una concentración de [12.5mg/Kg]. Cinco días después se les administró dextran sulfato de sodio (DSS) durante 7 días al 2% diluido en agua para beber estéril, seguido de un periodo de descanso con el suministro de agua potable estéril por 15 días. El periodo de tratamiento y descanso con DSS se realizó durante tres ciclos (Figura 9), de manera que la culminación de CAC finalizó al día 68 (Tanaka *et al.*, 2003).

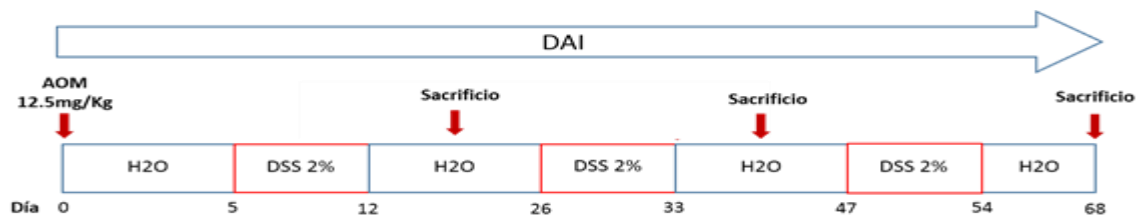


Figura 9. Representación de inducción del modelo del CAC y valoración del índice de daño de la enfermedad.

### 5.4. Valoración de Índice de daño de la enfermedad (DAI)

A lo largo del tratamiento se evaluó el índice de daño de la enfermedad (DAI) siguiendo los criterios establecidos por Murthy y colaboradores, 1993. El DAI fue obtenido mediante la medición (2 veces por semana) de tres factores importantes: Pérdida de peso,

consistencia de las heces y sangrado rectal, a los cuales de acuerdo a lo observado se les asignó un valor del 0 al 4 (**Tabla 2**). La pérdida de peso fue definida como la diferencia entre el peso inicial y el peso final estimado en porcentaje, la consistencia de las heces fue valorada como la formación de una pastilla fecal o la presencia de fluido fecal continuo (diarrea), el sangrado rectal fue evaluado como la presencia o ausencia de sangre visible en las heces y/o en el recto. El DAI fue calculado mediante la siguiente fórmula: (resultado de pérdida de peso + resultado de consistencia de las heces + resultado de sangrado rectal)/4 (Murthy *et al.*, 1993).

<b>Puntuación</b>	<b>Pérdida de peso (%)</b>	<b>Consistencia de las heces (diarrea)</b>	<b>Sangrado rectal</b>
<b>0</b>	Sin pérdida	Normal	Sin sangrado
<b>1</b>	1-5	Ligeramente blanda	Sangre oculta en las heces
<b>2</b>	5-10	Muy blanda	Sangre visible en heces
<b>3</b>	10-15	Diarrea ligera	Sangrado rectal ligero
<b>4</b>	>15	Diarrea aguda	Sangrado rectal grave

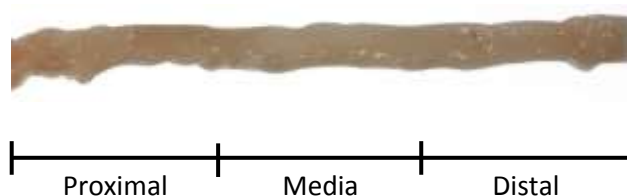
*Tabla 2. Puntuación asignada para la valoración del índice de daño de la enfermedad (DAI).*

## **5.5. Sacrificio y Evaluación del CAC**

Para evaluar el desarrollo del CAC, los animales se sacrificaron en los días 20 y 40 (etapa temprana del desarrollo del CAC) y en el día 68 (etapa tardía) después del inicio del tratamiento con AOM. Los roedores se mantuvieron en una cámara de climatización con el fin de dilatar los vasos sanguíneos, para posteriormente tomar una muestra de sangre periférica obtenida de la cola. Posteriormente se sacrificaron (14 ratones por ciclo) utilizando una cámara de CO<sub>2</sub>.

Para la obtención del bazo y colon, se mantuvo el ratón dentro de una campana de flujo laminar. Una vez extraído el colon, se colocó en solución salina al 0.9% y se procedió al lavado del mismo. Se realizó un corte longitudinal (**Figura 10**) del colon con la finalidad de observar la presencia y/o ausencia de pólipos/tumores así como la cantidad, tamaño y

ubicación de los mismos. Una vez realizado el análisis macroscópico, se colocaron biopsias de aproximadamente 1cm obtenidas de la región media y/o distal del colon (**Figura 10**) en etanol al 100% con el objetivo de realizar pruebas histopatológicas; así mismo, se colocaron biopsias de la región distal de 1cm o extirpado de pólipo/tumor en trizol (Tiocianato de Guanidinio y Fenol) con la finalidad de extraer mRNA; cada colon extraído se mantuvo en hielo durante todo el proceso de examinación.



*Figura 10. Corte longitudinal de colon de ratón, en la imagen se muestran 3 regiones establecidas (Proximal, media, distal).*

## **5.6. PCR y determinación de la expresión de citocinas en el colon**

Con la finalidad de evaluar cambios en la expresión de genes de interés a nivel de tejido se decidió obtener el RNA total para que a partir del mRNA se procediera a la síntesis de DNA complementario (cDNA) y con base en éste, evaluar los cambios en la expresión de genes mediante una RT-PCR. Para ello se trituró el tejido conservado en trizol a  $-70^{\circ}\text{C}$  con ayuda de un homogeneizador de tejido, manteniendo siempre la muestra en hielo, y realizando un lavado exhaustivo del homogeneizador antes de triturar cada muestra. Una vez triturado el tejido, se procedió a centrifugar a 12,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo de 1.5mL; posteriormente se agregaron 200 $\mu\text{L}$  de cloroformo frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) por cada mL de trizol utilizado y se homogenizó con ayuda de un vortex durante 30 segundos, en seguida la muestra ya homogenizada se dejó reposar durante 10 minutos para después centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . La fase acuosa (RNA) se separó cuidadosamente y se colocó en un tubo nuevo, inmediatamente después se le agregó a cada muestra un volumen de isopropanol frío ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) equivalente al obtenido en la fase acuosa y se mezcló manualmente por inversión para posteriormente dejarlo precipitar toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . El RNA se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , y la

pastilla se lavó con un gradiente de etanol al 100%, 90% y 75% respectivamente, adicionando 800µL de etanol, resuspendiendo la pastilla manualmente por inversión, centrifugando a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y decantando el sobrenadante para cada lavado. Finalmente se prosiguió al secado de la pastilla para eliminar el exceso de etanol durante 1 hora y se resuspendió la misma en 30µL de H<sub>2</sub>O MilliQ con DEPC (Dietilpirocarbonato) al 0.01%. El RNA se cuantificó con ayuda del *Epoch™ Multi-Volume multi-sample Spectrophotometer System* y se verificó su integridad mediante una electroforesis en gel de agarosa. La síntesis de cDNA se realizó usando el kit (M-MLV RT, INVITROGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor.

La reacción de PCR se llevó a cabo usando el kit (Amplificasa Taq DNA polimerasa, BioTechMol) en un volumen final de 25µL utilizando 2µg de cDNA o 100ng de DNA de tejido según el caso con la ayuda de un termociclador de ascenso y descenso rápido de temperatura bajo las condiciones que se indican en la **Tabla 3**.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	No. De ciclos
Desnaturalización inicial	94	1 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	35
Alineación	Tm° específica	30 seg	
Extensión	72	30 seg	
Extensión final	72	7 min	1

Tabla 3. Condiciones utilizadas en las etapas de la PCR.

Se evaluó la expresión de genes asociados al perfil de macrófagos M1 (iNOS, TNF-α) y M2 (Arginasa-1, Fizz-1), y la citocina IL-17. Se usó como gen constitutivo GAPDH. Las secuencias de los primers, las condiciones utilizadas durante la reacción así como el tamaño del amplicon se muestran en la **Tabla 4**.

Gen	Temperatura de alineación (T <sub>m</sub> )	Amplicon (pb)		Secuencia 5' --- 3'
GAPDH	56°C	201	F	CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC
			R	CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC
iNOS	62°C	449	F	CTG GAG GAG CTC CTG CCT CAT G
			R	GCA GCA TCC CCT CTG ATG GTG
TNF- $\alpha$	59°C	307	F	GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C
			R	ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG
Arginasa-1	54°C	250	F	CAG AAG AAT GGA AGA GTC AG
			R	CAG ATA TGC AGG GAG TCA CC
Fizz-1	65°C	290	F	GGT CCC AGT GCA TAT GGA TGA GAC CAT AG
			R	CAC CTC TTC ACT CGA GGG ACA GTT GGC AGC
IL-17A	58°C	288	F	TGG CGG CTA CAG TGA AGG CA
			R	ACA ATC GAG GCC ACG CAG GT
STAT1	52°C	172	WT-R	CTG ATC CAG GCA GGC GTT
			Común F	TAA TGT TTC ATA GTT GGA TAT CAT
Neo STAT1	52°C	275	Mutante-R	GAG ATA ATT CAC AAA ATC AGA GAG

Tabla 4. Secuencias de los primers utilizados para el gen constitutivo (GAPDH), genes de interés (iNOS, TNF- $\alpha$ , Arginasa-1, Fizz-1 e IL-17A) y genotipo de STAT1. Temperaturas de alineación (T<sub>m</sub>) y Tamaño del producto (pb).

## 5.7. Electroforesis en gel de agarosa para ácidos nucleicos

Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1% disueltos en Tris-Borato-EDTA (TBE) para evaluar la integridad de los ácidos nucleicos (DNA/RNA), y geles al 1.5% para productos de PCR con la finalidad de analizar los amplicones correspondientes; como agente revelador se utilizó Bromuro de Etidio (BrEt) a una concentración de 0.5 $\mu$ g/mL, posteriormente se procedió a efectuar la electroforesis a 100V durante 45 minutos y finalmente el gel fue revelado con ayuda de un foto-documentador “Gel Doc <sup>TM</sup> EZ Gel Documentation System” usando luz Ultra Violeta (UV). Las imágenes fueron analizadas con ayuda del software “Image J”.

## 5.8. Análisis histológico

Biopsias de las regiones media/distal del colon de 1cm se fijaron en etanol al 100% durante 24 horas a 4°C. Posteriormente se procedió al lavado de la muestra y deshidratación de la misma embebiéndolas en tres baños de etanol al 100% durante 1 hora c/u y se sumergieron en 3 baños de Xilol al 100% durante 1 hora c/u para ser incluidos en parafina. Se realizaron cortes de 4µm de grosor.

Para la tinción con Hematoxilina y Eosina (H-E) se desparafinaron las laminillas incubándolas a 56°C dentro de una estufa durante 30 minutos, posteriormente se continuó con el proceso sumergiéndolas en dos baños de xilol al 100% durante 5 minutos c/u, a continuación se prosiguió con el método de rehidratación del tejido, sumergiéndolo en un tren de gradientes de etanol (100%, 96%, 90%, 80% y 70%) durante 3 minutos c/u, para finalizar con la rehidratación, las muestras se sometieron a un baño de H<sub>2</sub>O destilada durante 3 minutos, en seguida se tiñeron los núcleos celulares con hematoxilina de Harris durante 2 minutos y se procedió con el lavado con agua corriente hasta eliminar los excesos del colorante; nuevamente se sumergieron en agua destilada durante unos segundos para poder proceder con el viraje de la hematoxilina (morado a azul) mediante el uso de H<sub>2</sub>O amoniacal al 2% durante 15 segundos, inmediatamente se procedió a lavar nuevamente con H<sub>2</sub>O destilada durante unos segundos y se continuó con la tinción mediante el empleo de eosina sumergiendo los tejidos durante 1 minuto, nuevamente se lavaron los tejidos en agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante y se procedió con la deshidratación de los tejidos utilizando ésta vez un tren de gradiente creciente de etanol (70%, 80%, 90% 96% y 100%) durante 3 minutos cada uno; al finalizar la deshidratación se realizaron dos últimos baños de xilol al 100% durante 5 minutos c/u para obtener un aclaramiento del tejido, finalmente con el objetivo de conservar el tejido, se montaron las laminillas utilizando resina con un índice de refracción de cero y se les colocó cuidadosamente un cubreobjetos teniendo cuidado de no dejar burbujas entre el portaobjetos y cubreobjetos.



## 5.9. Tinción Inmunohistoquímica (IHC)

Para la identificación de macrófagos totales (células F4/80+) y las subpoblaciones M1/M2 (células iNOS+/Arginasa-1+ respectivamente) a nivel de tejido, se llevó a cabo la tinción de Inmunohistoquímica; ésta técnica se basa en la identificación de moléculas (proteínas) mediante el empleo de anticuerpos específicos, los cuales posteriormente son identificados con anticuerpos secundarios acoplados a una enzima (“horseradish peroxidasa” o “HRP”), que a su vez al reaccionar con el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) tornará el sustrato incoloro, revelando la presencia y ubicación de la molécula blanco.

Una vez obtenidas las laminillas con el tejido, se procedió a desparafinar los tejidos mediante la incubación en una estufa a  $56^{\circ}C$  durante 30 min, procurando no sobrepasar la temperatura así como el tiempo de incubación para evitar el daño a los epítomos de las proteínas. Posteriormente se continuó con el proceso de diafinización del tejido mediante 2 inmersiones independientes en xilol al 100% durante 3 minutos c/u, para después continuar con la rehidratación de los mismos sumergiéndolos en un baño de alcohol al 100%, 96% y agua destilada durante 3 minutos c/u respectivamente.

Al finalizar la rehidratación, se continuó con la recuperación antigénica del tejido; para esto se coloraron las laminillas en un coplin con 50mL de buffer de citratos (DIVA), y se incubaron durante 30 min en una olla de presión; pasado el tiempo de recuperación antigénica se dejó enfriar el coplin con las laminillas a temperatura ambiente para evitar el choque térmico y dañar el tejido. Posteriormente se lavaron con PBS-TWEEN al 0.05% y se bloqueó la peroxidasa endógena del tejido sometiéndolas a una incubación con  $H_2O_2$  al 3% disuelto en Metanol durante 15 minutos, se lavaron nuevamente con PBS-TWEEN al 0.05% y se bloquearon las muestras con PBS-BSA al 1% durante 1 hora, al finalizar nuevamente se lavaron con PBS-TWEEN y se procedió a la incubación con el anticuerpo primario anti-ratón F4/80 (Bioscience), iNOS (GeneTex) y Arginasa-1 (Santa Cruz) a una dilución de 1:300, 1:200 y 1:200 respectivamente, diluido en PBS-BSA 1% durante toda la noche a  $4^{\circ}C$ .

Transcurrida la incubación, se lavaron nuevamente con PBS-TWEEN y se agregó su respectivo anticuerpo secundario a una dilución de 1:500, incubándolo durante 3<sup>o</sup> minutos, al finalizar la incubación se lavaron las muestras con PBS-TWEEN al 0.05% y enseguida se revelaron utilizando diaminobencidina (DAB) disuelta en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 15 minutos, nuevamente las muestras se lavaron con PBS-TWEEN y se procedió a realizar la contra tinción. Se colocaron las laminillas en H<sub>2</sub>O destilada durante 3 minutos e inmediatamente se tiñeron con Hematoxilina de Harris durante 2 minutos, se lavaron con agua corriente y agua destilada respectivamente y se viró la tinción con H<sub>2</sub>O amoniacal al 3% durante 15 segundos se lavaron las muestras con agua destilada y se continuó con el proceso de deshidratación mediante la inmersión de las muestras en Alcohol al 90%, 96%, 100% (15 baños c/u) y 2 inmersiones independientes de Xilol al 100% (15 baños c/u), al terminar se procedió al montaje de las laminillas de resina del mismo modo explicado en la técnica de H-E. Tres laminillas por grupo fueron analizadas, las fotografías fueron adquiridas con ayuda del software “*AxioCam MRc y ZEN lite 2011*” (2 campos por laminilla) y analizadas utilizando el software “*Image J – Plugins IHC Profiler*”.

### **5.10. Cultivo celular**

Se obtuvieron células de bazo de los animales de los diferentes grupos las cuales fueron sembradas en placas de 96 pozos (300,000 células por pozo) estimuladas con anti CD3 (BioLegend) a una concentración de 2µg/mL; transcurridas 48 horas de incubación a 37°C, los sobrenadantes fueron obtenidos y almacenados individualmente a -20°C hasta su posterior uso.

### **5.11. CBA (Cytometric Bead Array)**

Se analizó la producción de citocinas (IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-10) en sobrenadantes de células de bazo estimuladas con anti CD3 a las 48 horas de cultivo, utilizando el kit (CBA Mouse Th1//Th2/Th17, Biolegend) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se realizó la preparación de las citocinas recombinantes Th1/Th2/Th17 en diluciones seriadas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256) para la

obtención de la curva estándar. Posteriormente se procedió a mezclar de las citocinas Th1/Th2/Th17 y las muestras de interés con las perlas de captura acopladas a los anticuerpos específicos, para que enseguida se procediera a la tinción de las muestras con el anticuerpo de detección; finalmente se procedió a la adquisición de las muestras con la ayuda del citómetro “*BD FACSAria™ III*”. El análisis de datos fue realizado mediante el uso del software “*FlowJo V10*”.

### **5.12. Citometría de flujo**

Durante el sacrificio se hizo la obtención de sangre periférica (50  $\mu$ L) los cuales se mezclaron en un mismo volumen de EDTA (0.5M) para evitar la coagulación de la muestra; así mismo se obtuvieron células de bazo ( $1 \times 10^6$  células) y se colocaron en un tubo ependorf, las células fueron previamente hemolisadas y llevadas a un volumen de 250 $\mu$ L en buffer de FACS (0.5% BSA en PBS). Posteriormente se procedió al bloqueo de las regiones Fc de las células con ayuda de un anticuerpo CD16/CD32 incubándolas durante 15 minutos a 4°C; enseguida se lavaron las células con buffer de FACS y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos; al finalizar el centrifugado de las células se retiró el sobrenadante y se re suspendieron las muestras para que enseguida se agregaran los anticuerpos específicos correspondientes a cada muestra dirigidos a los antígenos de membrana CD11b, Ly6C, Ly6G, F4/80, PD-L2 y MMR (anti-ratón, BioLegend) respectivamente, los anticuerpos se mezclaron perfectamente con ayuda de un vortex y se incubaron a 4°C durante 30 minutos en completa oscuridad. Para finalizar, las células nuevamente fueron lavadas con buffer de FACS y centrifugadas a 1500 rpm y se re suspendieron en un volumen final de 350 $\mu$ L. Inmediatamente las células fueron adquiridas en el citómetro “*BD FACSAria™ III*” y analizadas utilizando el software “*FlowJo V10*”.

### **5.13. Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados aplicando un análisis de ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey con múltiples comparaciones con una significancia de ( $P < 0.05$ , 95%) mediante la ayuda del software “*GraphPad Prism 6*”.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Genotipo de animales STAT1<sup>-/-</sup>

Para corroborar que los animales utilizados durante el desarrollo del proyecto eran realmente deficientes en STAT1 se realizó el genotipo de la cepa STAT1 KO con fondo genético BALB/c antes de cada uno de los experimentos. Como se describió en los materiales y métodos, se utilizaron primers específicos para amplificar el gen completo o el que presenta deficiencia en STAT1. Los animales considerados como STAT1<sup>-/-</sup> únicamente amplificaron las regiones del Neo casete insertado en el gen codificante para STAT1, mientras que los animales WT o silvestres amplificaron la secuencia codificante para la proteína STAT1 (**Figura 11**).

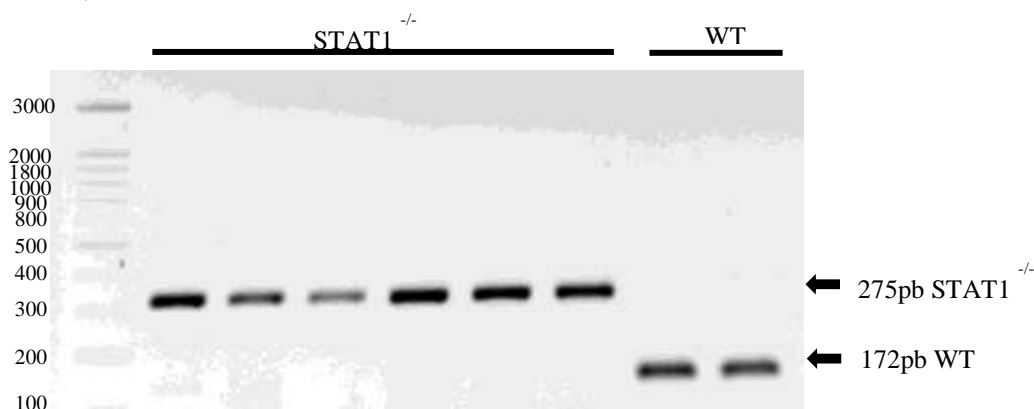


Figura 11. Genotipo de animales silvestres (WT) y deficientes en STAT1 (STAT1<sup>-/-</sup>).

### 6.2. La deficiencia de STAT1 favorece el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis

Con la finalidad de entender el papel que desempeña STAT1 desde las etapas tempranas hasta las etapas tardías del CAC se empleó el modelo que utiliza AOM/DSS reportado previamente (Tanaka *et al.*, 2003) en donde después de 68 días de iniciar el tratamiento se obtienen adenocarcinomas bien desarrollados. Se evaluó el desarrollo de la enfermedad durante los días 20, 40 (etapas tempranas) y 68 (etapas tardías) en animales silvestres y STAT1<sup>-/-</sup>. Los ratones silvestres presentaron diarrea y sangrado rectal a partir del día 40 hasta el 68 (**Figura 12A**). Por el contrario, la deficiencia de STAT1 favoreció una

aparición temprana de los signos y síntomas asociados a la enfermedad presentándose diarrea y sangrado rectal desde etapas tempranas (día 20 y 40) hasta etapas tardías (día 68), observándose siempre más agravado en los animales  $STAT1^{-/-}$  en comparación con el grupo WT (**Figura 12A**).

Se realizó la evaluación del índice de daño de la enfermedad establecido por Murthy y colaboradores (1993), el cual consiste en la supervisión constante de los ratones a lo largo del tratamiento, considerando cambios en el peso corporal expresado en porcentaje, diarrea y sangrado rectal. Como se muestra en la **Figura 12B** los animales  $STAT1^{-/-}$  presentan los mayores niveles de daño en las semanas de tratamiento con DSS (3, 6 y 8), en comparación a los ratones silvestres. Se llevó a cabo un registro de mortalidad de los grupos tratados con AOM/DSS, en el grupo WT no se registró deceso alguno a lo largo del tratamiento mientras que en el grupo  $STAT1^{-/-}$  el 10% de los animales ya había perecido desde el día 6, aumentando el número a un 20% para el día 52, sobreviviendo solamente el 60% del total del grupo al finalizar el tratamiento (**Figura 12C**).

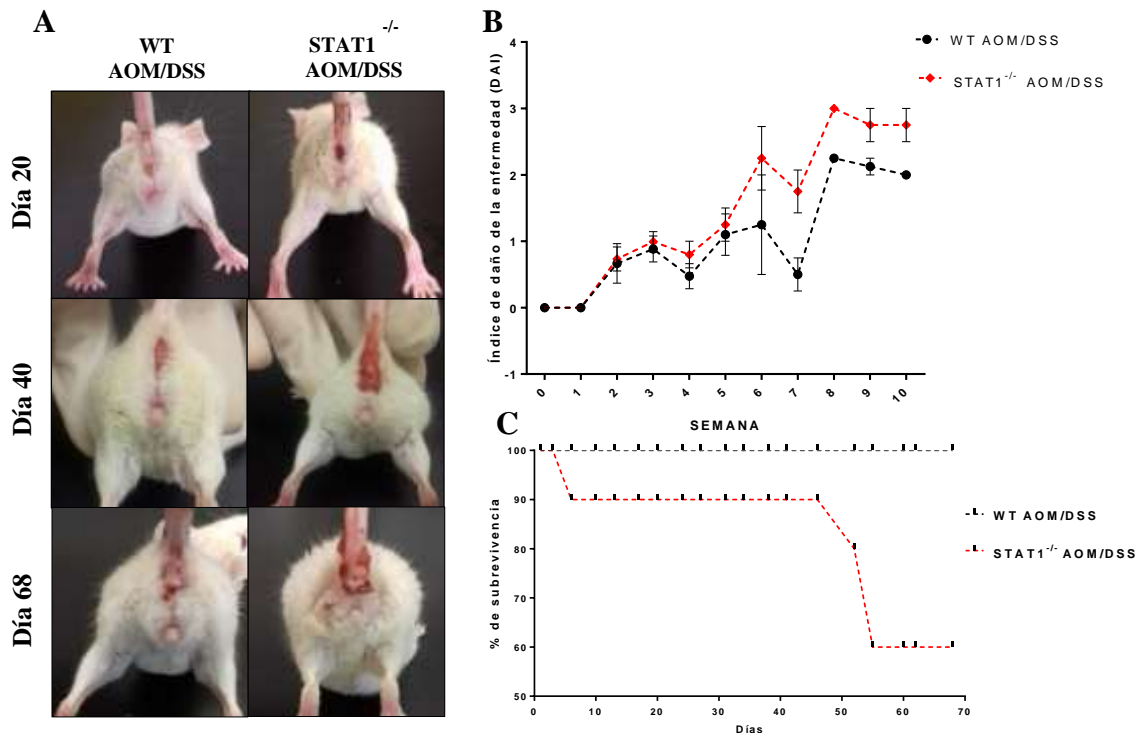


Figura 12. Registro del índice de daño de la enfermedad (DAI) (A y B) y Mortalidad de los animales tratados con AOM/DSS a lo largo del desarrollo del CAC (C). Las barras sobre el gráfico representan la media  $\pm$  error estándar con una  $n=4$  en cada uno de los grupos tratados y de 3 experimentos independientes.

Al evaluar el registro de peso corporal durante el curso de tratamiento con AOM/DSS, se registró una pérdida de peso significativa a las 3, 6 y 8 semanas de tratamiento en ambos grupos, que coincide con el ciclo de administración del DSS. (**Figura 13A**) y con el sangrado y la diarrea observados en los grupos que recibieron el tratamiento.

La evaluación macroscópica del colon se efectuó durante los tres sacrificios. Al analizar el porcentaje de animales libres de tumores (**Figura 13B**), se observó que el 100% de los animales WT no habían desarrollado tumor alguno hasta el día 20, sin embargo para el día 40 y 68 el 77% y 100% de los animales respectivamente, ya habían desarrollado tumores. Con respecto a los animales deficientes de STAT1, de manera interesante la presencia de pólipos/tumores se observó desde las etapas más tempranas (día 20) en un 25% de la población y para el día 40 y 68 el 100% de los animales que sobrevivió había desarrollado tumores.

Al concluir el tratamiento con AOM/DSS (día 68), se pudo observar a nivel macroscópico tumores bien desarrollados los cuales se ubicaron principalmente en la zona media y distal del colon (**Figura 13C**) estando presentes en los dos grupos que recibieron el tratamiento. Al evaluar la carga y el tamaño tumoral en etapas avanzadas no se observaron diferencias significativas entre los animales silvestres y deficientes en STAT1 (**Figura 13D**). Sin embargo, el tamaño de los tumores fue de menor tamaño en los animales silvestres en comparación con los deficientes en STAT1 (**Figura 13E**).

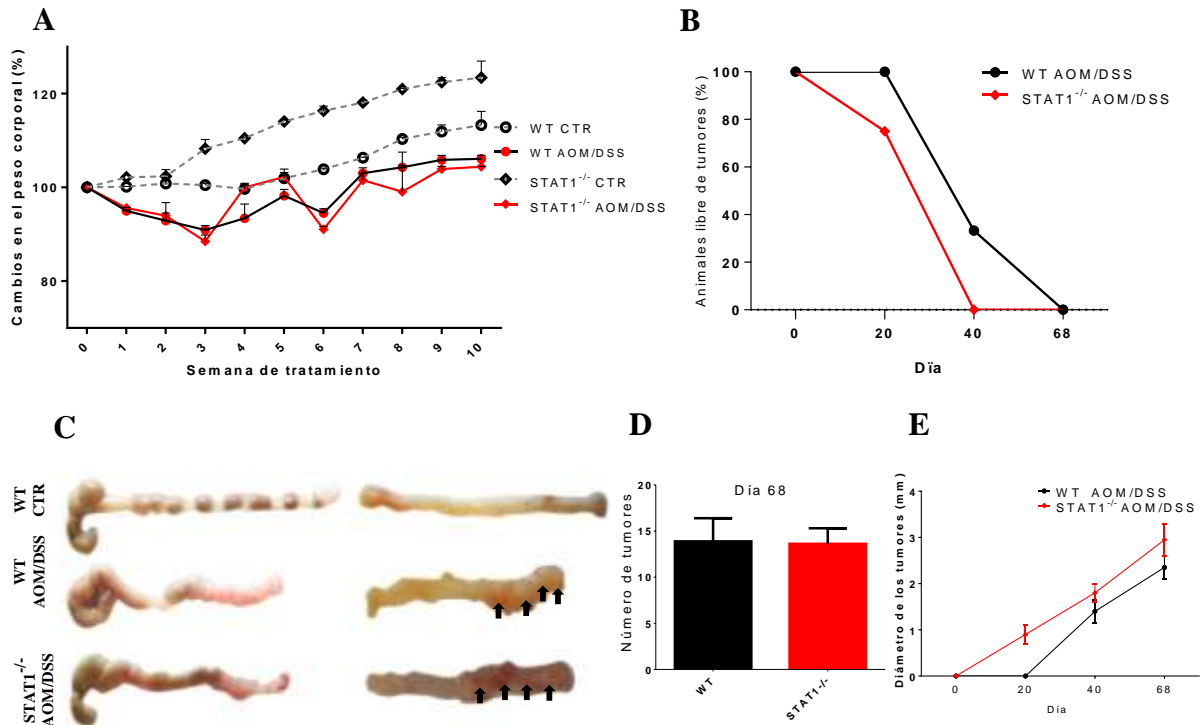


Figura 13. Registro del cambio en el peso corporal (A) y animales libres de tumores a lo largo del desarrollo del CAC (B). Características macroscópicas del colon (C), número (D) y tamaño (E) de los tumores durante el día 68 del CAC. Las barras sobre el gráfico representan la media  $\pm$  error estándar con una  $n=4$  en cada uno de los grupos tratados y de 3 experimentos independientes.

### 6.3. Los animales deficientes en STAT1 presentan un infiltrado inflamatorio importante y un mayor grado de lesión desde etapas tempranas en el desarrollo tumoral

El cáncer de colon asociado a colitis a menudo es caracterizado por presentar alteraciones morfológicas tempranas llamadas “focos de criptas aberrantes” (AFC), caracterizadas por ser criptas de calibre alargado y epitelio espesado con contenido reducido de mucina, además de ser los precursores de neoplasia epitelial (International Agency for Research on Cancer, 2017) llegando a observar lesiones displásicas que pueden ser planas o elevadas y un alto infiltrado inflamatorio (Fleming *et al.*, 2012).

Al realizar el análisis histopatológico se observó que ambos grupos controles presentaban una arquitectura con apariencia normal, sin poseer alguna alteración morfológica

en las criptas, infiltrado inflamatorio o lesiones displásicas, sin embargo en el grupo control de STAT1<sup>-/-</sup> se logra apreciar un ligero engrosamiento del tejido (**Figura 14**).

Algunos reportes como el elaborado por Wan *et al* (2015) se han encargado de describir los cambios secuenciales histopatológicos del CAC en el modelo de AOM/DSS. En la **Figura 14**, se puede apreciar que el grupo WT o silvestre que recibió el tratamiento con AOM/DSS presenta una hiperplasia inflamatoria al día 20, caracterizada por un engrosamiento de la mucosa y submucosa, poseer un ligero infiltrado inflamatorio además de poder percibir la formación de focos de criptas aberrantes. Para el día 40, las lesiones evolucionaron con una mayor acumulación de AFC, un alto grado inflamatorio y la formación de proyecciones polipoides hacia el lumen intestinal. Al finalizar el tratamiento (día 68) se apreció una pérdida total en la arquitectura del colon presentando las características histopatológicas de un adenocarcinoma, como es la persistencia del infiltrado inflamatorio crónico, proyecciones polipoides que abarcan desde el lumen intestinal hasta la mucosa y submucosa, hipercromasia y pleomorfismo nuclear de las células epiteliales, e incremento de la mitosis.

El análisis de las alteraciones histopatológicas en el grupo STAT1<sup>-/-</sup> tratado con AOM/DSS mostró que las lesiones se presentaban de una manera más agresiva desde etapas tempranas (día 20) en comparación con el grupo WT AOM/DSS, apreciándose un importante grado inflamatorio y un mayor número de focos de criptas aberrantes. Al examinar la progresión de la enfermedad al día 40 se observó que la arquitectura del colon se había perdido completamente apreciándose un grado de displasia más avanzado al observado en el grupo WT tratado (displasia tardía) coincidiendo con el índice de daño de la enfermedad y el deceso de los animales en esta etapa. Para el día 68, la formación de proyecciones polipoides que abarcaban mucosa y submucosa acompañadas de un engrosamiento del tejido así como un infiltrado inflamatorio crónico eran más evidentes que en el grupo WT AOM/DSS, constituyendo adenocarcinomas bien desarrollados (**Figura 14**).



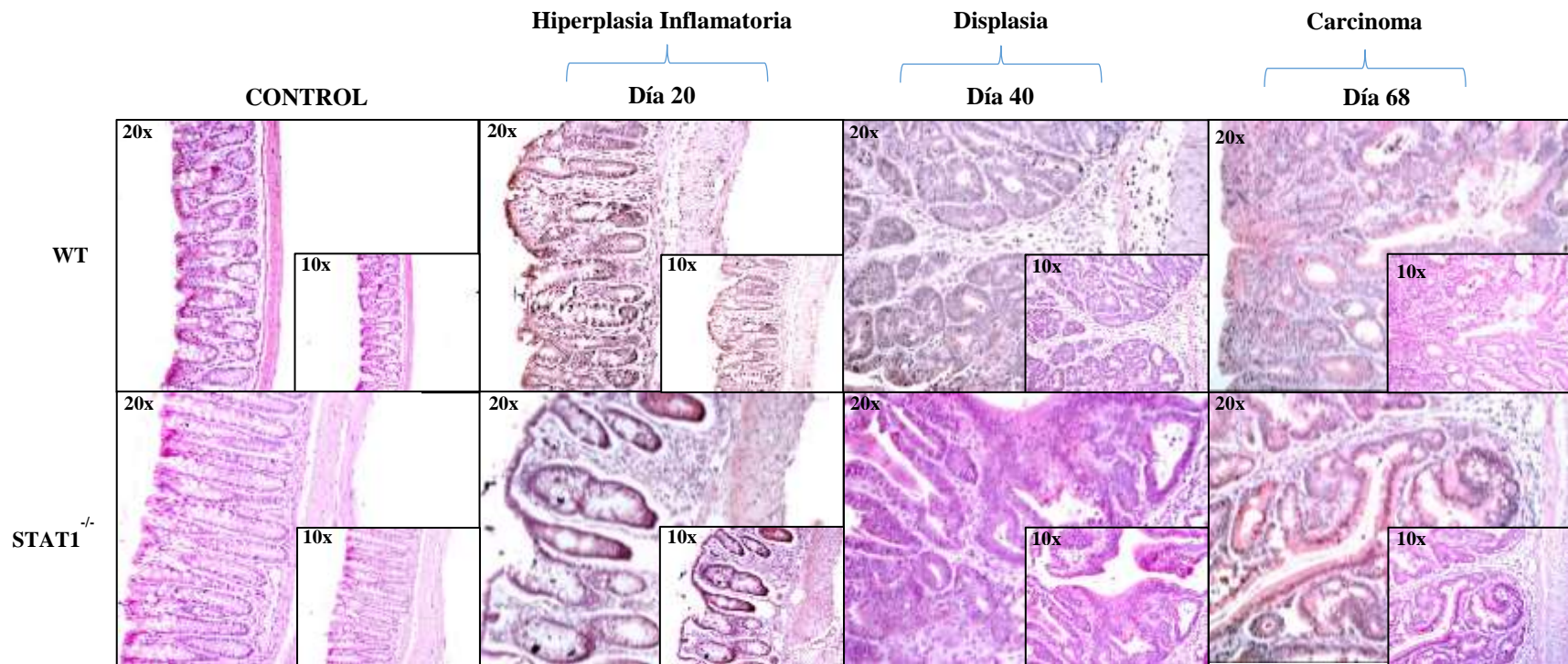


Figura 14. Análisis histopatológico del colon de los animales sanos (control) y de los animales tratados con AOM/DSS, los diferentes ciclos del CAC (día 20, 40 y 68) fueron caracterizados según el estadio de la enfermedad (hiperplasia inflamatoria, displasia y carcinoma) respectivamente.

#### **6.4. Los animales deficientes en STAT1 presentan un menor infiltrado de células F4/80+ en la mucosa intestinal durante el desarrollo del CAC**

Los macrófagos asociados a tumores (TAMs) han sido distinguidos por ser componentes cruciales de los infiltrados leucocitarios en el estroma de varios tumores, además de ser reconocidos por ser reguladores clave entre la inflamación y el cáncer (Galdiero *et al.*, 2013). Con el objetivo de evaluar la cinética de los infiltrados de las células F4/80+ durante el desarrollo del CAC experimental y analizar si esta se ve alterada por la deficiencia de STAT1, se realizó una inmunohistoquímica en el tejido intestinal (**Figura 15**). De manera interesante se observó un incremento significativo y gradual en el porcentaje total de células F480+ en la mucosa de los animales silvestres que recibieron el tratamiento en comparación con el grupo control (**Figura 15**). Este incremento se detectó desde las etapas más tempranas del desarrollo tumoral (día 20) ( $0.8 \pm 0.1$  vs  $2.5 \pm 0.3$ ), día 40 ( $0.8 \pm 0.1$  vs  $3.9 \pm 0.6$ ) y fue mucho más evidente en las etapas avanzadas (día 68) en donde el porcentaje de macrófagos en la mucosa fue 8 veces mayor en los ratones WT con tratamiento ( $0.8 \pm 0.1$  vs  $8.7 \pm 0.7$ ). Así mismo, se determinó que las células F4/80+ se encontraban localizadas principalmente en el estroma tumoral.

Por el contrario, la presencia de células F4/80+ en el grupo STAT1<sup>-/-</sup> que recibió el tratamiento no incrementó significativamente en los días 20 y 40. Únicamente al día 68 se observó un aumento en el porcentaje de estas células. Sin embargo, en esta etapa, el porcentaje de macrófagos fue significativamente menor en los ratones STAT1<sup>-/-</sup> en comparación con los ratones silvestres (3.4 vs 8.7). Además, de manera similar al grupo WT AOM/DSS, la localización de los macrófagos fue dentro del estroma tumoral (**Figura 15**).

#### **6.5. La deficiencia de STAT1 provoca un decremento en el porcentaje de células iNOS+ en la mucosa intestinal durante las etapas tempranas del CAC**

Los macrófagos de tipo M1 o clásicamente activados, son macrófagos caracterizados principalmente por la producción de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), además, algunos autores han reportado que los macrófagos M1 son abundantes en sitios de

inflamación crónica y donde se inician los tumores y comienzan a desarrollarse. Con el objetivo de tener una aproximación en la frecuencia de las subpoblaciones de macrófagos M1/M2 presentes en las diferentes etapas del CAC se evaluó la expresión de iNOS por inmunohistoquímica en la mucosa intestinal. La expresión de iNOS fue detectada en niveles similares para los grupos WT y STAT1<sup>-/-</sup> control, y se distribuyó principalmente en la zona de las criptas. En el grupo WT tratado con AOM/DSS se determinó un incremento significativo en el número de células iNOS<sup>+</sup> en las etapas tempranas (día 20 y 40) del desarrollo tumoral en comparación con el grupo control (Día 20: 12.6±1.7 vs 27.9±0.8), (Día 40: 12.6±1.7 vs 19.8±0.9). Por el contrario, en etapas avanzadas (día 68) no se observaron diferencias significativas. Se determinó que la expresión de iNOS en las etapas de displasia y carcinoma (día 40 y 68 respectivamente) se localizó en las células infiltrantes así como en las células tumorales (**Figura 16**).

Por el contrario, el porcentaje de células iNOS<sup>+</sup> no se incrementó de manera importante en los ratones STAT1<sup>-/-</sup> al día 20 ni 68 (**Figura 16**). Únicamente se detectó un incremento significativo al día 40 al comparar ratones STAT1<sup>-/-</sup> tratados vs ratones STAT1<sup>-/-</sup> CTR (13.1±1.3 vs 20.0±1.1). No obstante, ésta proteína se localizó principalmente dentro de los infiltrados leucocitarios (**Figura 16**). Al analizar la expresión de iNOS en las etapas más avanzadas del CAC, se registró que ésta molécula fue ubicada tanto en células tumorales como en el infiltrado inflamatorio.

#### **6.6. La deficiencia de STAT1 favorece el infiltrado de células Arginasa-1+ en la mucosa intestinal desde etapas tempranas del desarrollo del CAC**

Los macrófagos de tipo M2 o alternativamente activados son macrófagos caracterizados por la producción de Arginasa-1 y a menudo ésta subpoblación de macrófagos ha sido asociada con el desarrollo, vascularización e invasión tumoral en diversos tipos de cáncer (Mariani *et al.*, 2014). La expresión de arginasa-1 fue hallada en niveles muy similares en los ratones sanos de ambos grupos (**Figura 17**). Durante las etapas más tempranas del CAC (día 20), no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células arginasa-1+ en el grupo WT AOM/DSS con respecto a su grupo control (7.0±0.1 vs 7.7±0.2).

Por el contrario, se determinó un aumento significativo en el porcentaje de estas células en los ratones STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS en comparación con el grupo WT AOM/DSS (7.7±0.2 vs 19.1±3.7) demostrando una expresión temprana de esta molécula en dependencia de STAT1. El análisis al día 40 y 68, mostró un incremento significativo en el porcentaje de células arginasa-1+ en el grupo WT AOM/DSS respecto a su grupo control (Día 40: 7.7±0.2 vs 21.9±2.4, Día 68: 7.7±0.2 vs 16.8±1.6). De manera similar la expresión de arginasa-1 se mantuvo elevada en los ratones STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS a lo largo del tratamiento. Por otra parte, cabe mencionar que la localización de arginasa-1 se presenció en los infiltrados celulares así como en las células tumorales (**Figura 17**).

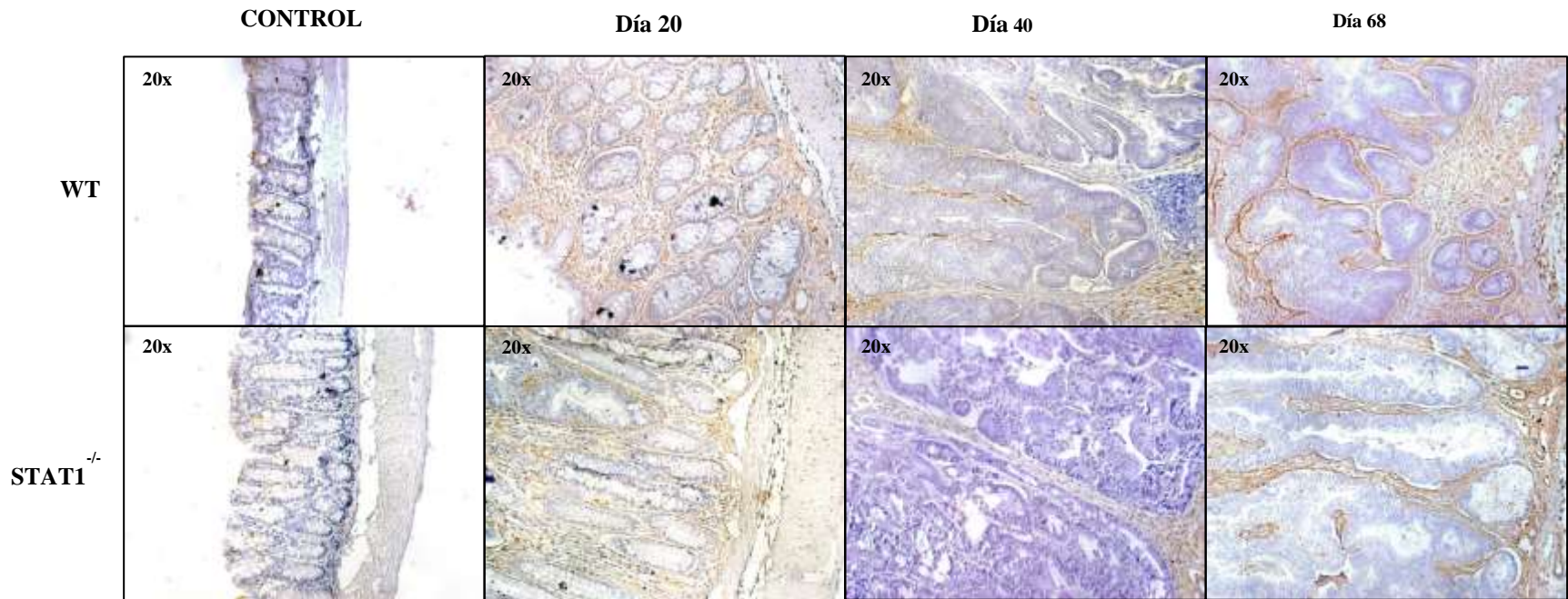
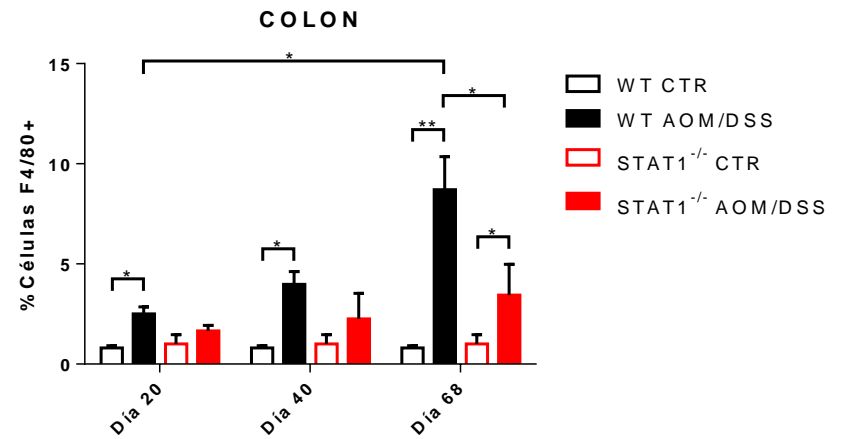


Figura 15. Tinción inmunohistoquímica del infiltrado de macrófagos (F4/80+) dentro del tejido colónico en los animales sanos (control) y los animales tratados con AOM/DSS (día 20, 40 y 68). La cuantificación de las células positivas (%) se realizó como se describe en los materiales y métodos. Las barras sobre el gráfico representan la media  $\pm$  error estándar con una  $n=4$  en cada uno de los grupos tratados y de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico fue determinado utilizando una prueba de ANOVA con prueba de Tukey  $P<0.05$  (\*),  $P<0.01$  (\*\*).





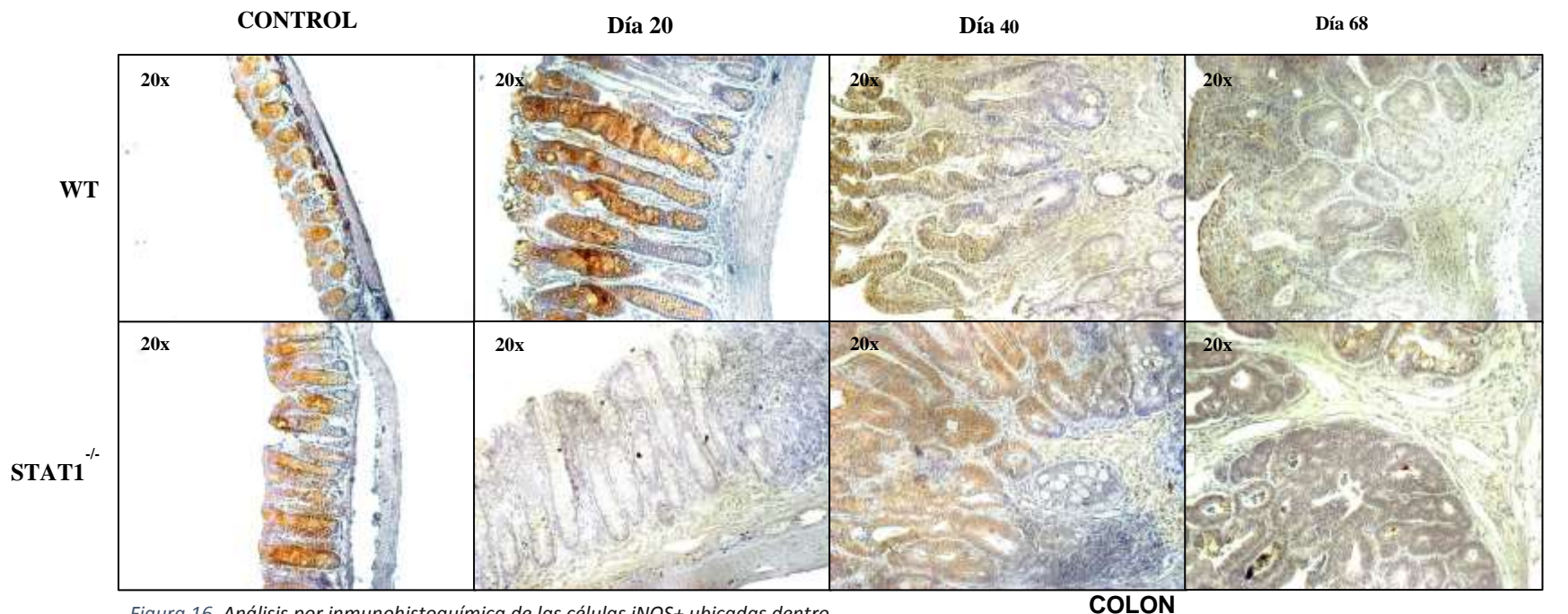
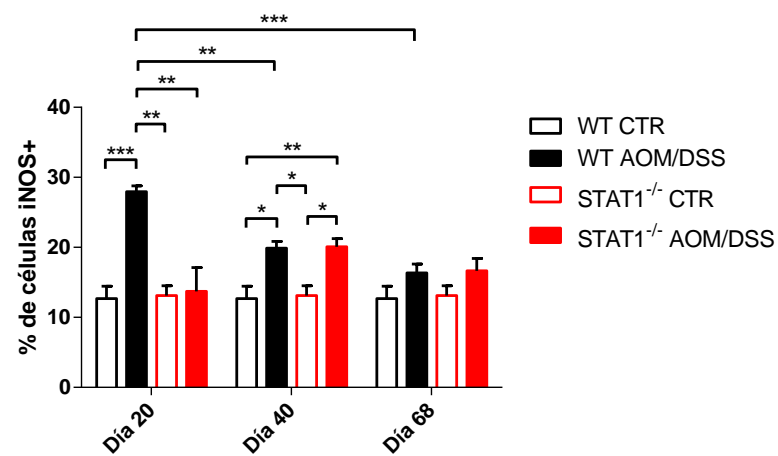


Figura 16. Análisis por inmunohistoquímica de las células iNOS<sup>+</sup> ubicadas dentro del colon en animales sanos (control) y animales bajo tratamiento con AOM/DSS (día 20, 40 y 68). La cuantificación de las células positivas (%) se realizó como se describe en los materiales y métodos. Las barras sobre el gráfico representan la media  $\pm$  error estándar con una n=4 en cada uno de los grupos tratados y de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico fue determinado utilizando una prueba de ANOVA con prueba de Tukey  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)



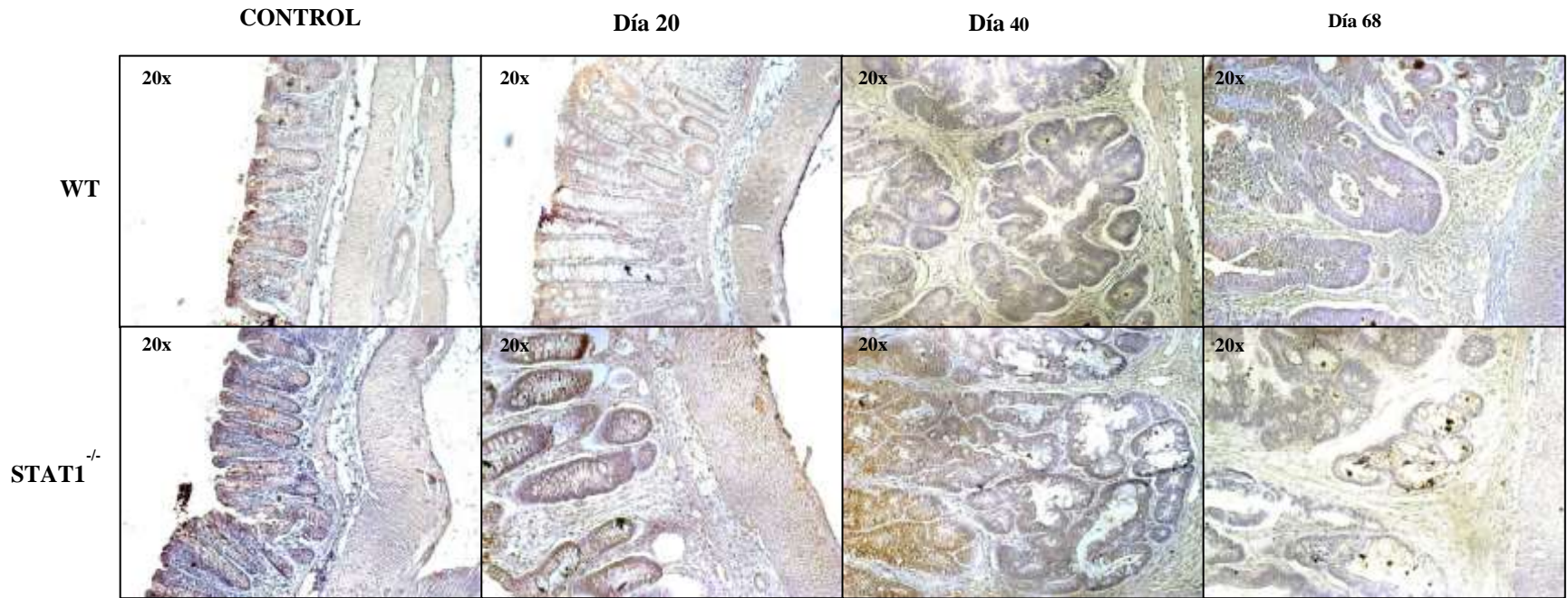
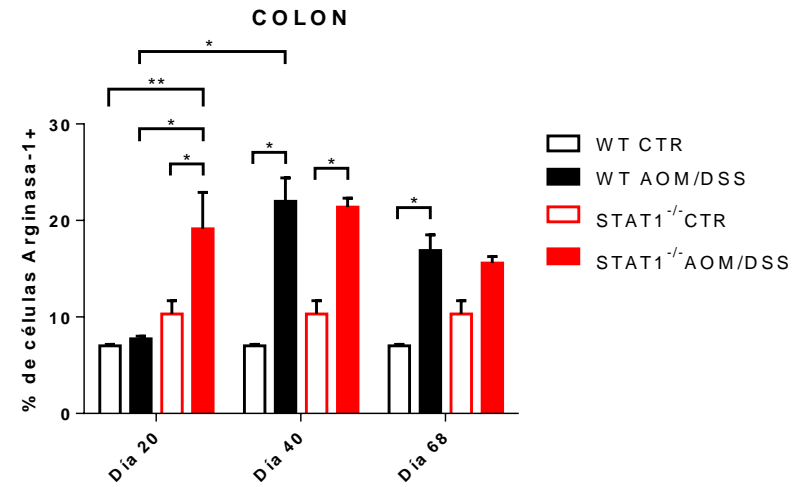


Figura 17. Tinción inmunohistoquímica del infiltrado de células Arginasa-1+ dentro del tejido colónico en los animales sanos (control) y los animales tratados con AOM/DSS (día 20, 40 y 68). La cuantificación de las células positivas (%) se realizó como se describe en los materiales y métodos. Las barras sobre el gráfico representan la media  $\pm$  error estándar con una  $n=4$  en cada uno de los grupos tratados y de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico fue determinado utilizando una prueba de ANOVA con prueba de Tukey  $P<0.05$  (\*),  $P<0.01$  (\*\*).



## 6.7. La ausencia de STAT1 altera los niveles de expresión de genes asociados a macrófagos M1 en la mucosa intestinal durante el desarrollo del CAC

Para obtener un análisis más detallado del perfil de activación de las subpoblaciones de macrófagos M1/M2 se evaluaron los cambios en los niveles expresión de iNOS, TNF- $\alpha$ , arginasa-1 y FIZZ-1 a nivel de mRNA en el tejido colónico.

El análisis de la expresión de iNOS en el grupo WT AOM/DSS mostró un incremento significativo desde las etapas tempranas (día 20 y 40) que permaneció elevado hasta las etapas tardías del CAC en comparación al grupo control (Día 20:  $1.0 \pm 0.04$  vs  $3.4 \pm 1.1$ , Día 40:  $1.0 \pm 0.04$  vs  $4.0 \pm 0.3$ , Día 68:  $1.0 \pm 0.04$  vs  $3.0 \pm 0.2$ ). Por el contrario, en el grupo STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS la expresión de iNOS permaneció disminuida al día 20 ( $1.5 \pm 0.3$  vs  $0.8 \pm 0.06$ ) y 68 ( $1.5 \pm 0.3$  vs  $1.2 \pm 0.02$ ) pero aumentó significativamente únicamente al día 40 en comparación con su grupo control ( $1.5 \pm 0.3$  vs  $4.3 \pm 0.4$ ) (**Figura 18A**). Por otra parte, la expresión de TNF- $\alpha$  se incrementó significativamente durante todo el desarrollo de la enfermedad en el grupo WT tratado (Día 20:  $1.0 \pm 0.2$  vs  $5.7 \pm 1.8$ , Día 40:  $1.0 \pm 0.2$  vs  $11.7 \pm 1.0$ , Día 68:  $1.0 \pm 0.2$  vs  $2.9 \pm 0.7$ ), presentándose los mayores niveles de expresión en etapas tempranas (día 40). Del mismo modo, los ratones STAT1<sup>-/-</sup> presentaron los mayores niveles de expresión de TNF- $\alpha$  en etapas tempranas del CAC (día 40) (Día 40:  $3.7 \pm 0.8$  vs  $11.5 \pm 3.5$ , Día 68:  $3.7 \pm 0.8$  vs  $7.3 \pm 0.8$ ) manteniendo el aumento significativo hasta el día 68 (**Figura 18B**).



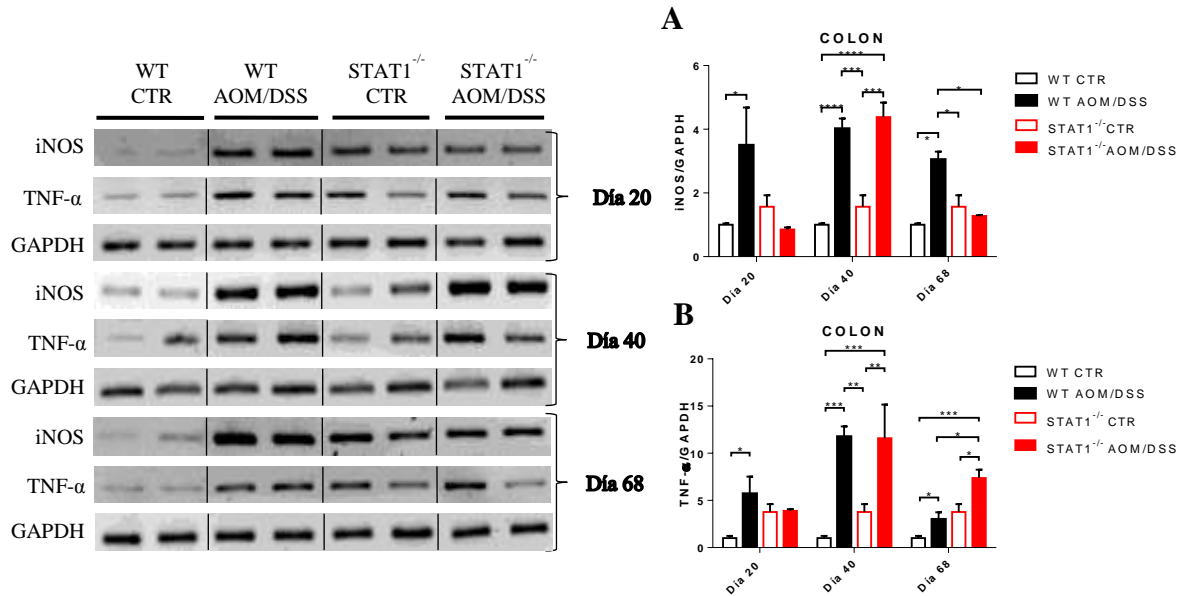


Figura 18. Análisis de los cambios en la expresión de genes asociados a macrófagos M1 (iNOS y TNF- $\alpha$ ) en el tejido intestinal. Los datos se muestran como expresión relativa normalizado contra el gen constitutivo GAPDH. Las barras sobre el gráfico representan la media  $\pm$  error estándar con una n=4 en cada uno de los grupos tratados y de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico fue determinado utilizando una prueba de ANOVA con prueba de Tukey  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)

### 6.8. La ausencia de STAT1 altera los niveles de expresión de genes asociados a macrófagos M2 en la mucosa intestinal durante el desarrollo del CAC

Se detectaron altos niveles de expresión de Arginasa-1 desde etapas tempranas (día 20 y 40) hasta etapas tardías del CAC (día 68) para ambos grupos (WT AOM/DSS y STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS) en comparación con sus grupos control (**Figura 19A**). Por el contrario, la expresión del gen FIZZ-1 asociado también a macrófagos de perfil alternativo, disminuyó de manera significativa tanto para los ratones WT AOM/DSS (Día 20:  $1.0 \pm 0.02$  vs  $0.1 \pm 0.04$ , Día 40:  $1.0 \pm 0.02$  vs  $0.1 \pm 0.1$ , Día 68:  $1.0 \pm 0.02$  vs  $1.9 \pm 0.06$ ) como para los ratones STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS (Día 20:  $0.4 \pm 0.1$  vs  $0.02 \pm 0.005$ , Día 40:  $0.4 \pm 0.1$  vs  $0.1 \pm 0.08$ , Día 68:  $0.4 \pm 0.1$  vs  $0.01 \pm 0.0001$ ) durante todo el desarrollo de la enfermedad en comparación a su respectivo grupo control (**figura 19B**).

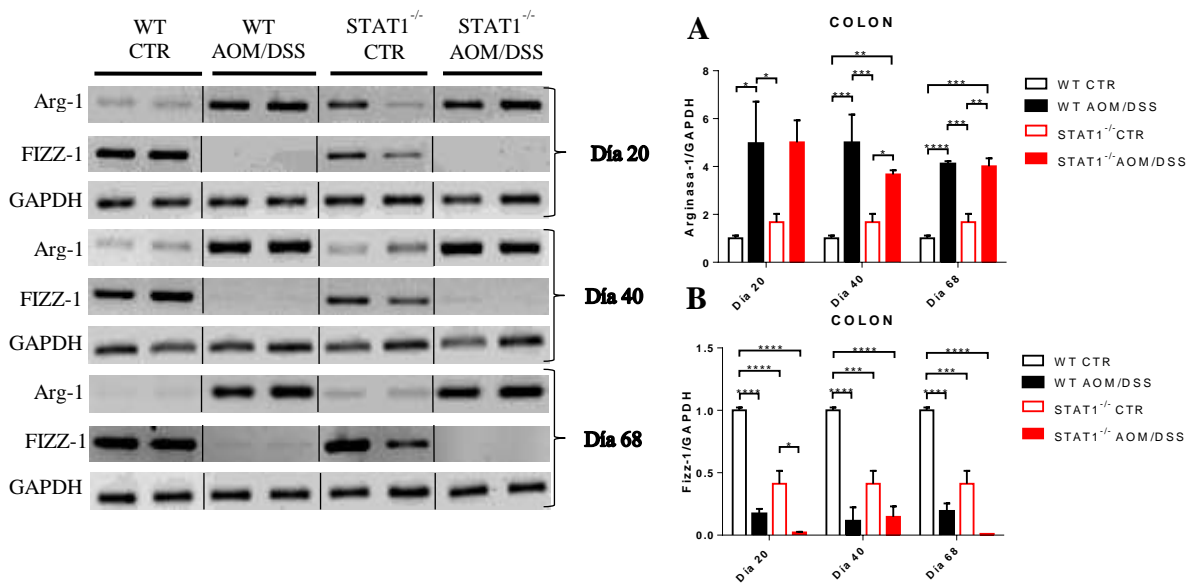


Figura 19. Análisis de los cambios en la expresión de genes asociados a macrófagos M2 (Arginasa-1 y FIZZ-1) en el tejido intestinal. Los datos se muestran como expresión relativa normalizado contra el gen constitutivo GAPDH. Las barras sobre el gráfico representan la media  $\pm$  error estándar con una  $n=4$  en cada uno de los grupos tratados y de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico fue determinado utilizando una prueba de ANOVA con prueba de Tukey  $P<0.05$  (\*),  $P<0.01$  (\*\*),  $P<0.001$  (\*\*\*),  $P<0.0001$  (\*\*\*\*).

## 6.9. La deficiencia de STAT1 favorece la producción de la citocina pro-inflamatoria IL-17-a en etapas tempranas y tardías del CAC

IL-17A es una citocina involucrada de manera importante en la tumorigénesis colorrectal. Al evaluar los niveles de expresión de esta citocina en el colon durante el desarrollo del CAC, se observó un incremento en el grupo WT AOM/DSS respecto a su grupo control. Sin embargo, las diferencias en los niveles de expresión fueron significativas únicamente en etapas tardías (Día 68:  $0.9 \pm 2.05$ ). Por otro lado, se determinó que los animales STAT1<sup>-/-</sup> sanos y los que recibieron el tratamiento presentaron un incremento importante en la producción de esta citocina a lo largo del experimento sugiriendo que la ausencia de STAT1 puede favorecer una sobreexpresión de IL-17A (Figura 20A).

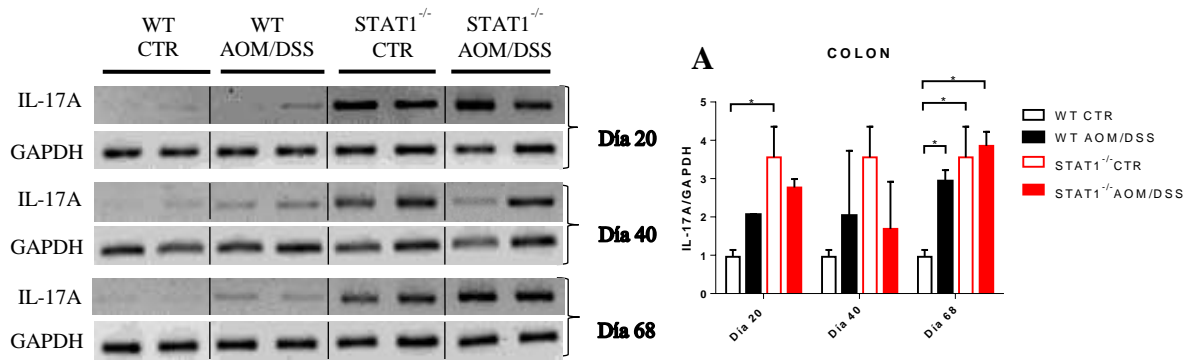


Figura 20. Análisis de los cambios en la expresión de IL-17A en el tejido intestinal. Los datos se muestran como expresión relativa normalizado contra el gen constitutivo GAPDH. Las barras sobre el gráfico representan la media  $\pm$  error estándar con una  $n=4$  en cada uno de los grupos tratados y de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico fue determinado utilizando una prueba de ANOVA con prueba de Tukey  $P<0.05$  (\*).

## 6.10. La deficiencia de STAT1 altera la producción de citocinas durante el desarrollo del CAC

Se evaluaron los niveles de producción de las citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-10 en sobrenadantes de células de bazo estimuladas por 48h con anti-CD3 con el objetivo de caracterizar la respuesta inmune durante el transcurso del CAC en dependencia de STAT1. Se observó un aumento significativo en los niveles de IFN- $\gamma$  en el grupo WT AOM/DSS desde etapas temprana hasta etapas tardías del CAC en comparación a su grupo control. En el grupo STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS se detectaron niveles similares a su grupo control en las etapas tempranas (día 20 y 40) aumentando de manera significativa únicamente al día 68 (**Figura 21A**). Así mismo los niveles de IFN- $\gamma$  fueron significativamente superiores en los animales STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS vs el grupo WT AOM/DSS al día 68 (9623.3 $\pm$ 753.0 vs 3691.9 $\pm$ 857.3). De manera similar, la producción de TNF- $\alpha$  se incrementó a lo largo del desarrollo del CAC en el grupo WT AOM/DSS obteniendo los mayores niveles de producción al día 20 (2.2 $\pm$ 0.3 vs 627.8 $\pm$ 64.85), por el contrario, los ratones STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS mantuvieron niveles bajos de producción al día 20 y 40, mientras que al día 68 los valores de esta citocina se elevaron significativamente (294.0 $\pm$ 30.3 vs 733.5 $\pm$ 45.1) (**Figura 21B**). Por otro lado, la producción de IL-6 se incrementó de manera significativa para los grupos que recibieron el tratamiento durante las etapas más tempranas del desarrollo del CAC (día 20). Sin embargo, al día 40 los niveles de producción

de esta citocina disminuyeron drásticamente para ambos grupos, existiendo diferencias significativas solamente para el grupo WT AOM/DSS con respecto a su grupo control ( $2.8 \pm 0.4$  vs  $71.2 \pm 17.4$ ), no obstante, los niveles de producción de esta citocina se incrementaron significativamente en el grupo STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS en las etapas avanzadas del tratamiento (Día 68:  $79.8 \pm 24.9$  vs  $378.8 \pm 28.5$ ) (**Figura 21C**).

Al analizar los niveles de producción de las citocinas relacionadas con la respuesta Th17, se observó un incremento en la producción de IL-17A e IL-17F en los animales WT AOM/DSS durante el día 40. Por el contrario, los ratones del grupo STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS mostraron niveles elevados de estas citocinas durante todo el transcurso del experimento alcanzando los niveles más elevados durante las etapas tardías (día 68). De manera interesante, los ratones STAT1 CTR también mostraron una producción elevada de IL-17A e IL-17F de manera basal (**Figura 21D y 21E**) Con respecto a la citocina IL-22, se registraron altos niveles de producción en el grupo WT solamente al día 40 ( $22.7 \pm 9.7$  vs  $1825.6 \pm 197.8$ ), por el contrario en los ratones STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS, se observaron niveles altamente significativos a los días 20 y 68 (Día 20:  $694.4 \pm 111.1$  vs  $1661.0 \pm 548.5$ , Día 68:  $694.4 \pm 111.1$  vs  $1690 \pm 124.0$ ) (**Figura 21F**). Por otro lado, se analizaron las cantidades producidas de la citocina anti-inflamatoria/inmuno-reguladora IL-10, registrándose bajos niveles a los días 20 y 40 en los ratones WT AOM/DSS, sin embargo, durante las etapas tardías (día 68) se registró un aumento exacerbado de esta citocina en comparación con los demás grupos ( $8.3 \pm 0.1$  vs  $474.5 \pm 56.5$ ). Además un incremento significativo fue registrado en el grupo STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS únicamente al día 20 ( $82.4 \pm 71.9$  vs  $293.0 \pm 58.8$ ). (**Figura 21G**).

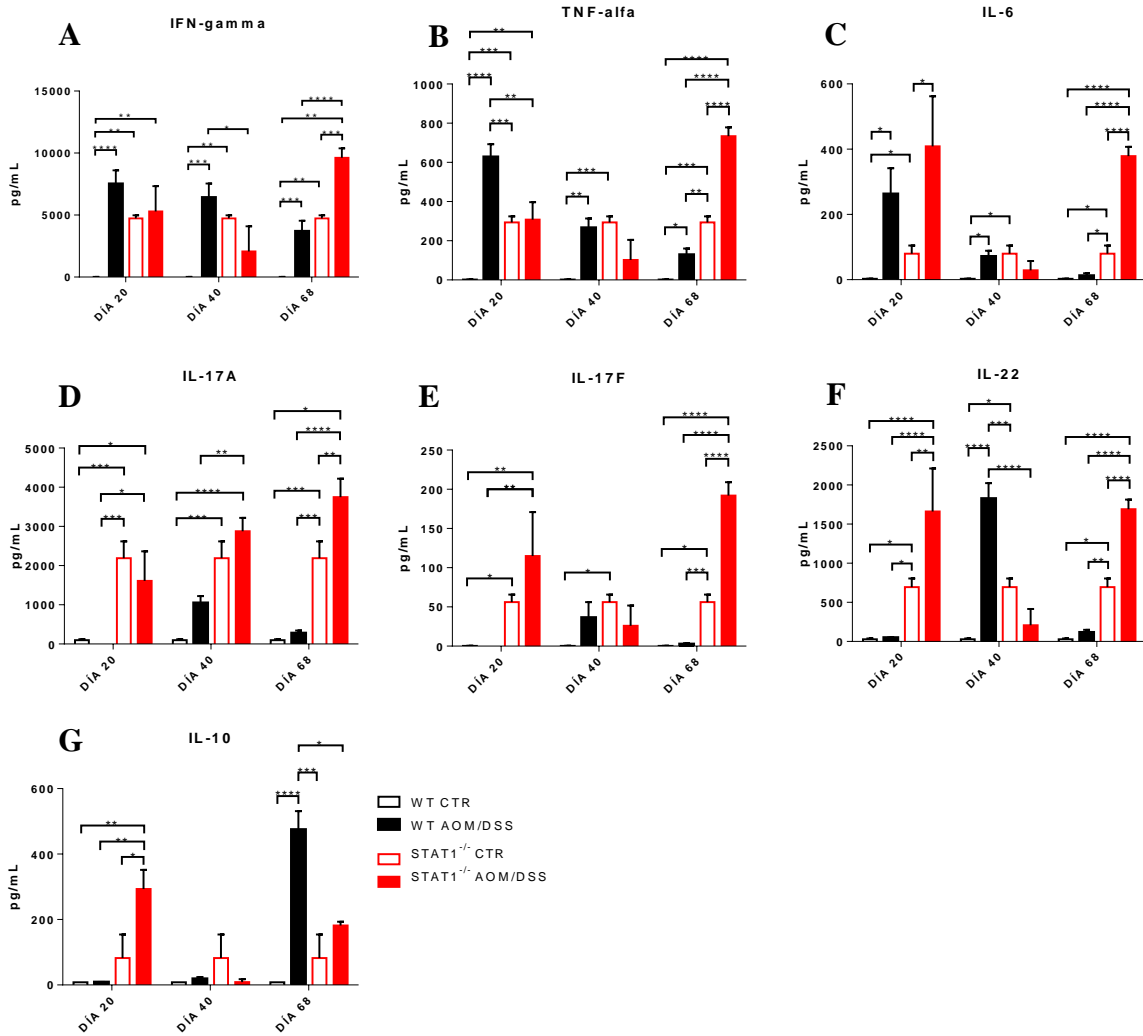


Figura 21. Análisis de la producción de citocinas (pg/mL) relacionadas a respuestas Th1 (A y B), Th2 (C y G) y Th17 (D, F y G) en sobrenadantes de células de bazo estimuladas con anti-CD3 durante 48 hrs durante el transcurso de la enfermedad. Las barras sobre el gráfico representan la media  $\pm$  error estándar con una n=4 en cada uno de los grupos tratados y de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico fue determinado utilizando una prueba de ANOVA con prueba de Tukey  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*),  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*).

### 6.11. La deficiencia de STAT1 alteró la acumulación de macrófagos totales en el bazo durante el desarrollo del CAC

Diversos autores han reportado la acumulación de células de origen mieloide (monocitos, macrófagos y neutrófilos) en el bazo durante la inflamación crónica intestinal (Griseri *et al.*, 2012) y el cáncer experimental en modelos animales (Cortez *et al.*, 2012). Así mismo se ha reportado que éstas células pueden llegar a salir del bazo para migrar al estroma

tumoral y contribuir a la población de TAMs (Cortez *et al.*, 2013). El análisis por citometría de flujo de macrófagos presentes en bazo reveló la acumulación de éstas células (F4/80+) durante las etapas tempranas (día 40) y tardías (día 68) del CAC en los ratones WT AOM/DSS. Por el contrario, los animales deficientes en STAT1 no mostraron un aumento significativo en el porcentaje de éstas células a lo largo del desarrollo de la enfermedad en comparación con su grupo control (**Figura 22A**). Por otro lado, se analizó la contribución de macrófagos de perfil alternativo utilizando los marcadores PD-L2 y MMR desde etapas tempranas hasta etapas tardías. Únicamente se observaron diferencias en la población F4/80+MMR+ al día 68, con un incremento significativo de esta población en el grupo WT AOM/DSS respecto al grupo STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS (16.1±3.2 vs 5.7±0.6) (**Figura 22B**).

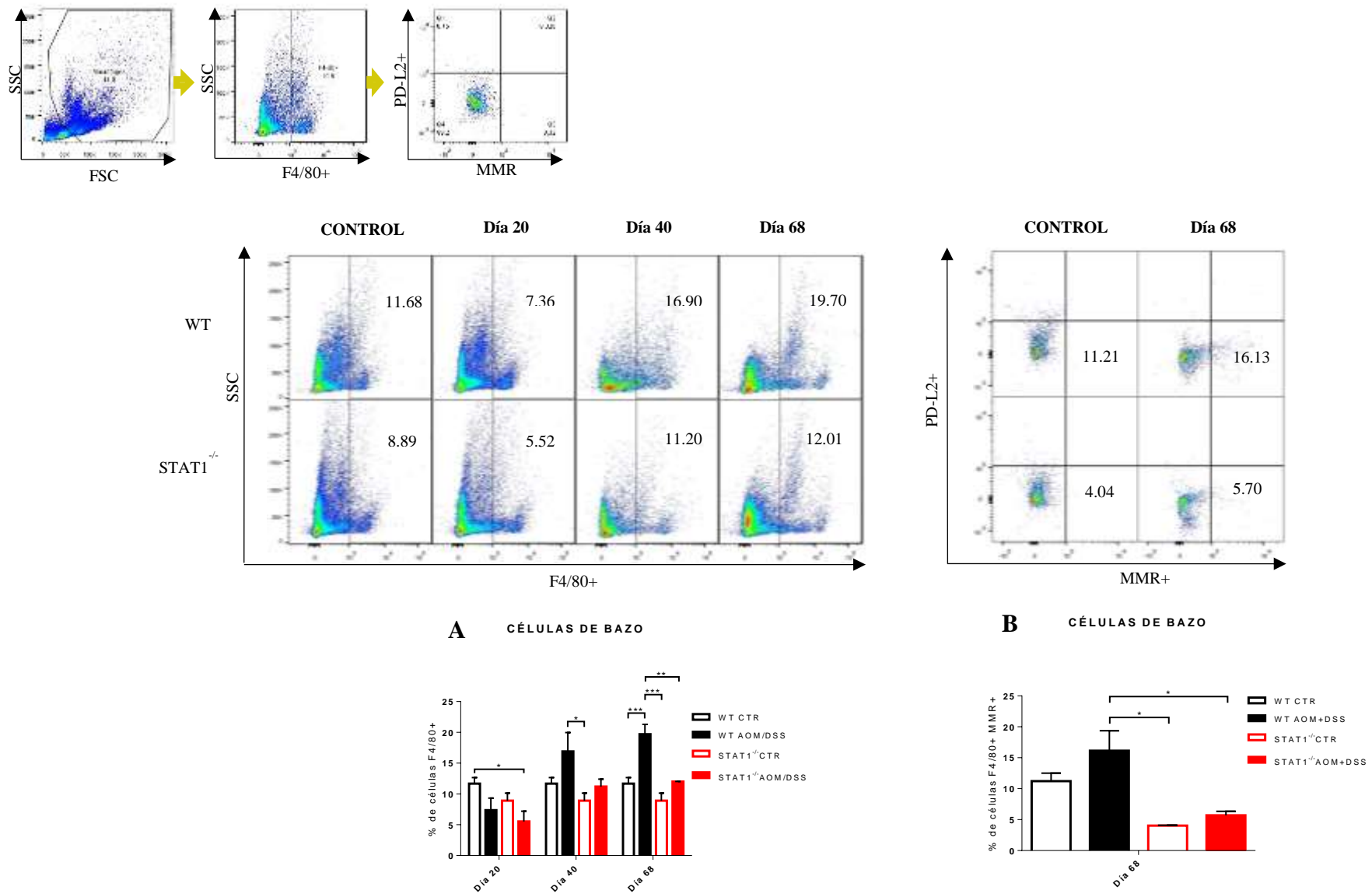


Figura 22. Evaluación por citometría de flujo del reclutamiento de macrófagos totales (F4/80+) y macrófagos alternativamente activados (PD-L2+, MMR+) a nivel de bazo, durante el desarrollo del CAC. Las barras sobre el gráfico representan la media  $\pm$  error estándar con una n=4 en cada uno de los grupos tratados y de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico fue determinado utilizando una prueba de ANOVA con prueba de Tukey  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)

## 6.12. La deficiencia de STAT1 afecta la población de células monocíticas durante el desarrollo del CAC a nivel sistémico

En ratones, los antecesores hematopoyéticos de los macrófagos son una población inmadura de células mieloides llamadas monocitos, caracterizados por la expresión de los antígenos CD11b y Ly6C. La expresión diferencial del marcador de monocito inflamatorio (Ly6C) definirá las subpoblaciones M1/M2 de los macrófagos (Yang *et al.*, 2014). De manera similar existe otra población inmadura de tipo mieloides conocida como células supresoras derivadas mieloides monocíticas (M-MDSC) caracterizadas de igual manera por la co-expresión de los antígenos CD11b y Ly6C (Tripathi y Carson., 2014). Estas células han sido identificadas en médula ósea, hígado, sangre, bazo y el estroma de varios tumores, y han sido caracterizadas por su capacidad de suprimir el sistema inmune innato y adaptativo (Parker *et al.*, 2015), además, numerosos reportes han evidenciado que las MDSCs contribuyen a la evasión inmune del cáncer (Gabrilovich *et al.*, 2012).

En el presente estudio se analizaron las poblaciones celulares CD11b+Ly6C<sup>+</sup> (high y low) y CD11b+Ly6C<sup>-</sup> a nivel sistémico. El análisis por citometría de flujo reveló un incremento gradual y significativo en el porcentaje de las células CD11b+Ly6C<sup>high</sup> a nivel circulante en los ratones WT AOM/DSS a lo largo del tratamiento., .Por el contrario, los animales deficientes en STAT1 tanto los controles como los que recibieron el tratamiento mostraron bajos porcentajes de esta población celular desde las etapas tempranas hasta las etapas tardías del CAC (**Figura 23A**). Al analizar los cambios en la población CD11b+Ly6C<sup>low</sup>, no se observó un aumento importante en el grupo WT AOM/DSS en comparación con su grupo control, no obstante, los ratones STAT1<sup>-/-</sup> CTR y STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS mostraron niveles inferiores en el porcentaje de estas células a nivel sanguíneo durante el desarrollo de la enfermedad (**Figura 23B**). Así mismo, se evaluó el porcentaje de la población celular CD11b+Ly6C<sup>-</sup> en sangre periférica observándose en el grupo WT AOM/DSS un incremento de éstas células solamente en las etapas tardías (día 68), .Por el contrario, los ratones STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS mostraron un incremento significativo de éstas células durante todo el transcurso del experimento señalando la importancia que tiene STAT1 en el reclutamiento de estas poblaciones (**Figura 23C**).



El análisis de las células CD11b+Ly6C+/ Ly6C- también fue efectuado a nivel de bazo. Las células CD11b+Ly6C<sup>high</sup> se mostraron significativamente menores en el grupo WT AOM/DSS durante las etapas tempranas (día 20 y 40) en comparación con su grupo control, incrementando aunque no de manera significativa hasta el día 68. Por otro lado, el grupo STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS no mostró cambios significativos en el porcentaje de estas células a lo largo del desarrollo del CAC (**Figura 23D**). Además, las células CD11b+Ly6C<sup>low</sup> mostraron bajos porcentajes en el grupo STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS de manera significativa durante el día 20 en comparación con el grupo WT AOM/DSS. Sin embargo, durante los días 40 y 68 no se observaron cambios notorios para ambos grupos tratados (**Figura 23E**). Del mismo modo, los animales STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS mostraron una acumulación importante de las células CD11b+Ly6C- durante el día 20, el cual fue disminuido durante los días 40 y 68 mientras que los animales WT AOM/DSS no mostraron cambios importantes durante el desarrollo de la enfermedad (**Figura 23F**).

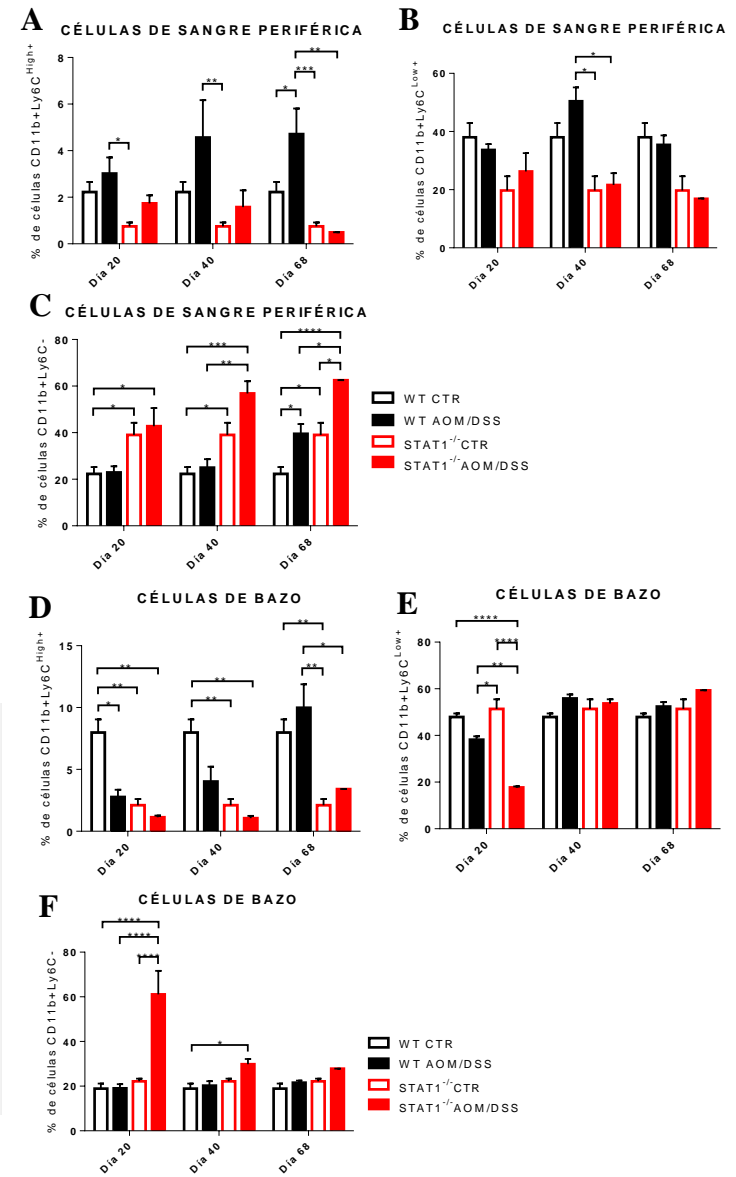
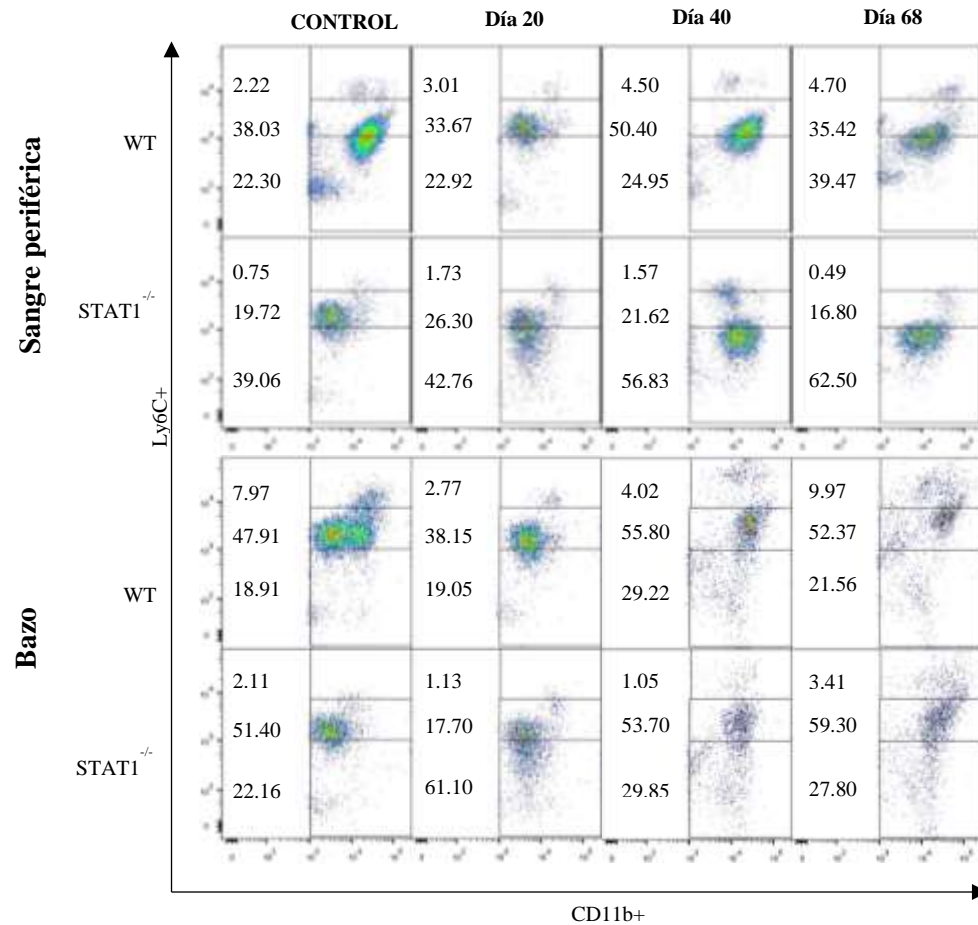
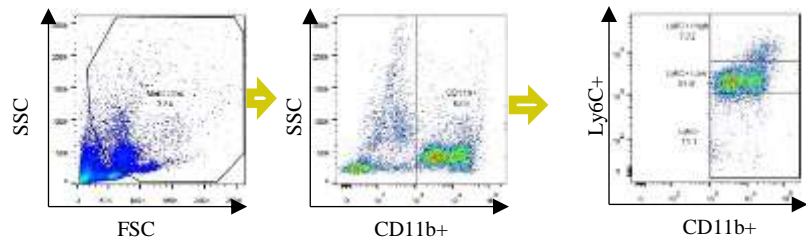


Figura 23. Análisis por citometría de flujo de reclutamiento de células mieloides monocíticas (CD11b+Ly6C<sup>High</sup>+, CD11b+Ly6C<sup>Low</sup>+ y CD11b+Ly6C<sup>-</sup>) nivel de bazo y sangre periférica durante el desarrollo del CAC. Las barras sobre el gráfico representan la media ± error estándar con una n=4 en cada uno de los grupos tratados y de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico fue determinado utilizando una prueba de ANOVA con prueba de Tukey P<0.05 (\*), P<0.01 (\*\*), P<0.001 (\*\*\*), P<0.0001(\*\*\*\*).

### **6.13. Los ratones deficientes de STAT1 presentan un aumento de las células CD11b+Ly6C-Ly6G+ en circulación durante el transcurso del CAC**

Los precursores mieloides además de diferenciarse en macrófagos pueden diferenciarse en células granulocíticas dependiendo de la presencia o ausencia de factores de crecimiento (Tripathi y Carson, 2014), además las células mieloides supresoras pueden dividirse en la categoría granulocítica (G-MDSC) las cuales son definidas por los marcadores de membrana CD11b+Ly6C-Ly6G+ (Gabrilovich *et al.*, 2012; Parker *et al.*, 2015). Se analizaron las poblaciones celulares CD11b+Ly6C-Ly6G+ y CD11b+Ly6C+Ly6G+ en sangre periférica.

No se observaron cambios en el porcentaje de las células CD11b+Ly6C-Ly6G+ en los animales WT AOM/DSS respecto a su grupo control a lo largo del experimento, Por el contrario, los resultados mostraron que existe un aumento significativo en esta población celular en el grupo STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS al día 40 y 68 (**figura 24A**). Por otro lado, al analizar la población CD11b+Ly6C+Ly6G+, se registraron mayores porcentajes de estas células en el grupo WT AOM/DSS desde las etapas tempranas hasta las etapas tardías en comparación con el grupo STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS (**Figura 24B**).

Al evaluar la distribución de las células CD11b+Ly6C-Ly6G+ a nivel de bazo se observó un incremento significativo en las etapas tempranas (día 20) del CAC en el grupo STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS respecto al grupo WT AOM/DSS, sugiriendo que la ausencia de STAT1 en etapas tempranas favorece un aumento en los porcentajes de esta población (**Figura 24C**). Por el contrario, al analizar la población CD11b+Ly6C+Ly6G+ se observó una disminución significativa de estas células en los animales STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS respecto al grupo WT AOM/DSS al día 20. Los porcentajes de esta población permanecieron similares en ambos grupos durante el resto del tratamiento. (**Figura 24D**).

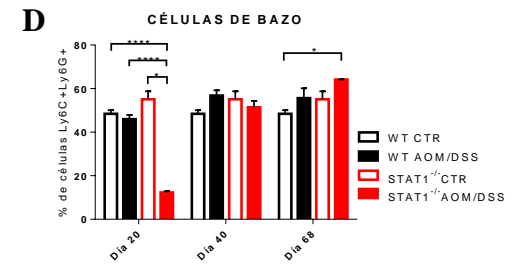
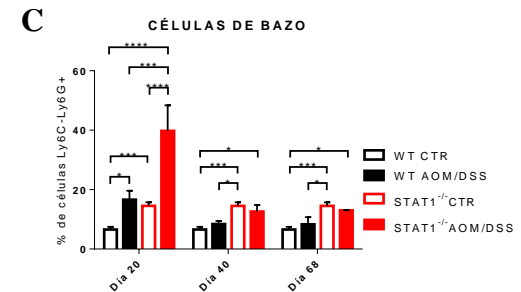
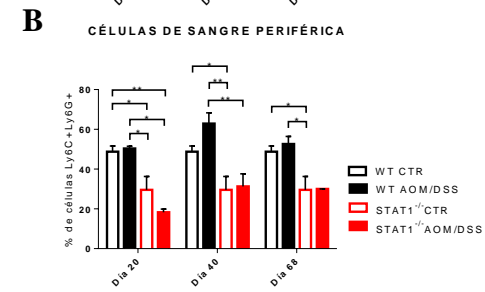
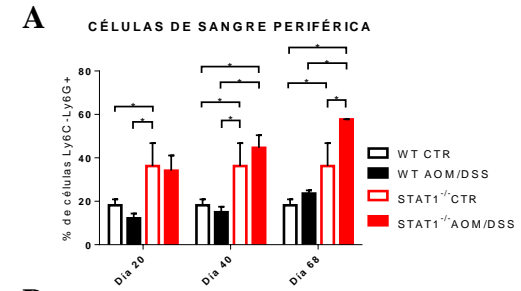
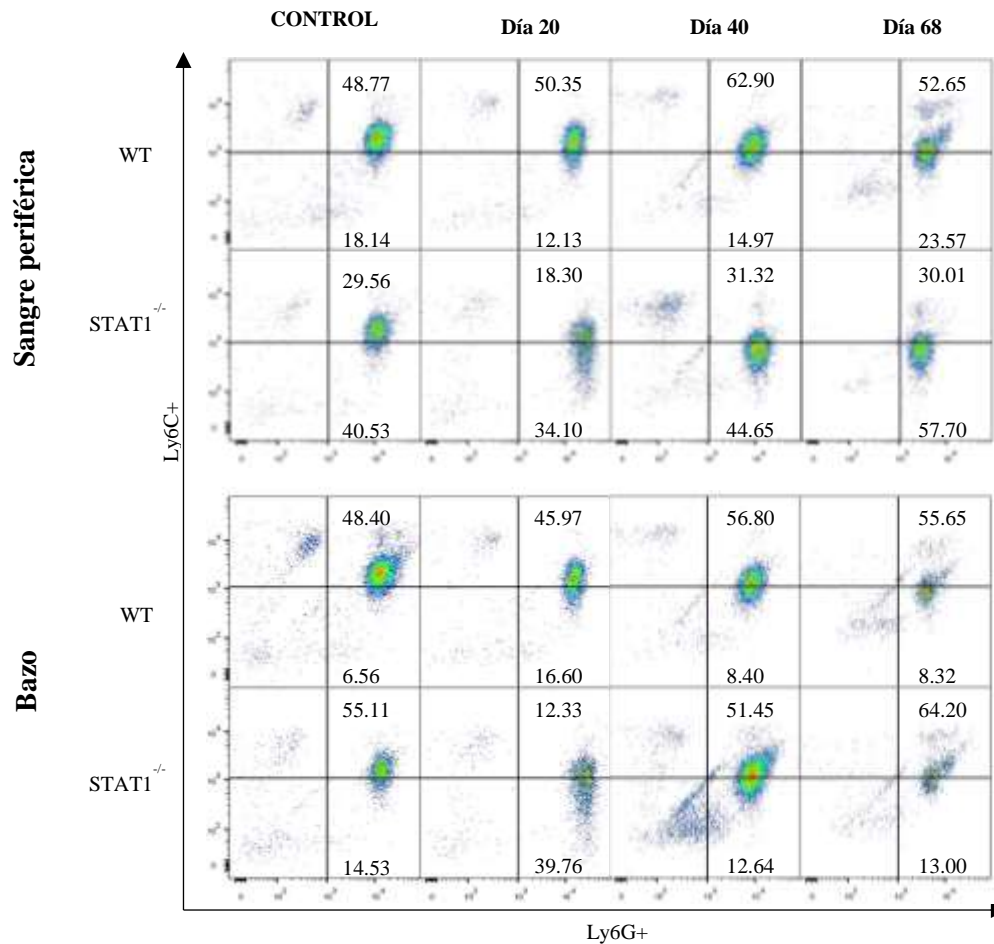
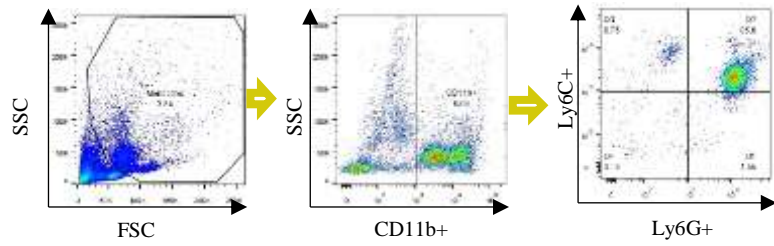


Figura 24. Análisis por citometría de flujo de reclutamiento de células mieloides granulocíticas (CD11b+Ly6C-Ly6G<sup>+</sup> y CD11b+Ly6C+Ly6G<sup>-</sup>) nivel de bazo y sangre periférica durante el desarrollo del CAC. Las barras sobre el gráfico representan la media  $\pm$  error estándar con una n=4 en cada uno de los grupos tratados y de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico fue determinado utilizando una prueba de ANOVA con prueba de Tukey  $P < 0.05$  (\*)  $P < 0.01$  (\*\*)  $P < 0.001$  (\*\*\*)  $P < 0.0001$  (\*\*\*\*)

## 7. DISCUSIÓN

En el cáncer de colon asociado a colitis (CAC) varias vías de señalización se encuentran desreguladas, en particular aquellas que tienen que ver con crecimiento celular, proliferación celular, apoptosis, sobrevivencia celular, ciclo celular y sistema inmunológico (Pandurangan y Esa, 2014; O'Connor *et al.*, 2010). Por lo tanto, el estudio de la molécula STAT1 resulta de gran importancia ya que es un mediador de señales pro-apoptóticas, anti-proliferativas (Kim y Lee, 2007), sistema inmunológico y cáncer (K. Meissl *et al.*, 2015). En el presente estudio al emplear el modelo experimental de CAC que utiliza AOM/DSS en ratones STAT1<sup>-/-</sup>, se observó que la deficiencia de STAT1 favoreció el desarrollo de los signos asociados a la enfermedad observándose diarrea intensa, sangrado rectal y una disminución considerable en el peso corporal durante todo el tratamiento con AOM/DSS presentando los valores más altos en el índice de daño de la enfermedad (DAI). Además en el grupo STAT1<sup>-/-</sup> que recibió el tratamiento se presentaron decesos desde las etapas tempranas (día 20 y 40) hasta etapas tardías (día 68) y se presenció un desarrollo de tumores más temprano en comparación con los ratones WT sugiriendo que esta molécula es clave para contener el desarrollo tumoral.

Los datos mencionados anteriormente se muestran muy similares a los obtenidos por Kaplan y colaboradores (1998). Ellos observaron que ratones deficientes en STAT1 desarrollaban tumores epidermoides de una manera más acelerada en comparación con los ratones WT, esto, mediante la inducción química con metilcolantreno (MCA) además de usar el modelo de desarrollo de tumores espontáneos por la deficiencia del gen supresor de tumores p53. Aunado a lo anterior, numerosos autores han relacionado una alta expresión de STAT1 citoplásmico y STAT1 nuclear a nivel de tejido tumoral, con un buen pronóstico en pacientes con CRC debido a que la presencia y activación de ésta molécula aumentaba significativamente la media de sobrevivencia (D. Simpson *et al.*, 2010; Gordziel *et al.*, 2013; Nivarti *et al.*, 2016).

Por el contrario, Liddle y Frank utilizando un modelo de ratones con neoplasia intestinal múltiple (Min) deficientes y heterocigotos para STAT1, concluyeron que STAT1

no participa de manera importante en el desarrollo del CRC, esto debido a que el desarrollo y distribución de pólipos se observó de manera similar tanto en ratones STAT1<sup>-/-</sup> como en ratones STAT1<sup>+/-</sup> (Liddle y Frank, 2008)

Numerosas vías de señalización mediadas por STAT1 han sido reconocidas por mantener la homeostasis intestinal (Cho y Kelsall., 2014) Además se sabe que durante las enfermedades inflamatorias intestinales como la colitis ulcerativa (UC) y la enfermedad de Crohn (CD) así como el cáncer colorrectal (CRC), ésta vía se encuentra desregulada (Schreiber *et al.*, 2002; D. Simpson *et al.*, 2010; Gordziel *et al.*, 2013; Thoeni *et al.*, 2016; Nivarti *et al.*, 2016; Giles *et al.*, 2017). En el presente estudio se observó que las alteraciones histopatológicas durante el CAC en deficiencia de STAT1 ocurrían de manera más agresiva desde las etapas más tempranas (día 20) en comparación con los ratones WT, observándose un importante grado inflamatorio y un mayor número de focos de criptas aberrantes. Además, se apreció un grado de displasia más avanzado al culminar el tratamiento con AOM/DSS en donde la formación de proyecciones polipoides, engrosamiento del tejido así como el infiltrado inflamatorio crónico eran más evidentes que en el grupo WT.

Éstos datos concuerdan con los establecidos por Simpson y colegas en 2010, en donde al analizar biopsias de pacientes con CRC invasivo primario, observaron que existía una correlación significativa entre la activación de STAT1 con un menor grado de desarrollo tumoral a nivel histológico (Simpson *et al.*, 2010). Así mismo, Thoeni y colaboradores analizaron muestras de pacientes con mutaciones en el dominio de unión al DNA de STAT1, y observaron que existían signos clínicos e histológicos asociados a los de las IBDs, presenciándose infiltrados inflamatorios, así como cambios en la arquitectura intestinal (Thoeni *et al.*, 2016). En contraste, mediante el empleo del modelo de ratones con neoplasia intestinal múltiple (Min) deficientes en STAT1, Liddle y Frank (2008) concluyeron que los cambios histopatológicos durante el CRC ocurrían de manera similar a los ratones WT. Por otra parte, en un estudio donde se utilizaron ratones que únicamente expresan SOCS1 (un inhibidor importante en la señalización de STAT1) en células T y B con fondo SOCS1<sup>-/-</sup>, observaron el desarrollo espontáneo de carcinoma colorrectal, presenciándose una hiperactivación de STAT1 a nivel de colon, acompañado de un alto grado de displasia, alto

infiltrado inflamatorio y pérdida de células caliciformes (Hanada *et al.*, 2006). Los datos anteriores demuestran el papel complejo y crítico que desempeña STAT1 durante los diversos tipos de carcinogénesis colorrectal, que debido a la cantidad de actividades y funciones que controla, puede llegar a ser controversial.

El sistema inmunológico puede jugar un papel crítico en la iniciación y progresión de la carcinogénesis asociada a IBDs (Mariani *et al.*, 2014; Axelrad *et al.*, 2016). Los macrófagos asociados a tumores (TAMs) han sido reconocidos como una parte clave del circuito inflamatorio crónico además de ser mediadores que promueven el inicio, desarrollo y establecimiento tumoral a través de diversos mecanismos (Yang y Xuetao, 2015; Ugel *et al.*, 2015). El presente estudio es el primero en analizar los infiltrados de macrófagos totales y sus subpoblaciones durante el desarrollo del CAC experimental en dependencia de STAT1. Nosotros observamos un aumento significativo en el porcentaje de macrófagos F4/80+ a lo largo del tratamiento en el grupo WT, los cuales se ubicaban principalmente en el estroma tumoral. Además, en este mismo grupo el porcentaje de células iNOS+ a nivel de tejido fue significativamente más alto durante las etapas tempranas (día 20 y 40) ocurriendo lo contrario en deficiencia de STAT1, sugiriendo que la ausencia de esta molécula altera el reclutamiento de macrófagos en la mucosa intestinal.

Algunas evidencias mostradas en roedores han descrito el equilibrio entre las poblaciones M1 y M2 durante el carcinoma colorrectal. Un estudio empleando el modelo que utiliza AOM/DSS describió la dinámica de macrófagos M1/M2 colorrectales Wan *et al.*, 2015. En concordancia a nuestros datos, ellos reportaron un alto porcentaje de macrófagos totales CD68+ en hiperplasia inflamatoria, displasia y carcinoma, además, observaron que existe una disminución en el porcentaje de macrófagos M1 (F4/80+CD16/32+) después de la semana 10 post-inducción mientras que en los macrófagos M2 (F4/80+CD206+) aumentaron entre las semanas 10 y 16 post-inducción (Wan *et al.*, 2015).

Diversos estudios realizados con biopsias de pacientes se han dado a la tarea de caracterizar el infiltrado de macrófagos totales así como la dinámica entre el perfil M1 y M2, principalmente cuando el carcinoma ya está bien establecido. Shabo y colaboradores en 2014

reportaron un alto infiltrado de macrófagos CD163+ en el estroma de tumores de CRC humanos siendo mayor en aquellos tumores de etapas avanzadas (III y IV) (Shabo *et al.*, 2014); similarmente Badawi *et al* (2015) realizaron un estudio en biopsias de pacientes con CRC y pólipos adenomatosos benignos, observando un mayor infiltrado de macrófagos CD68+ en tejido carcinogénico. Por otra parte, de manera similar a nuestros datos, Edin y colegas utilizando biopsias de pacientes, observaron que una infiltración de macrófagos M1 (iNOS+) es acompañada con un infiltrado de macrófagos M2 (CD163+); mientras que Chenguang y colaboradores en 2015 reportaron que existe un alto porcentaje de macrófagos infiltrados en tumores (TIMs) CD14+CD169+ (M1), IL-10+CD14+CD169+ (M2) en pacientes con CRC, en comparación con personas sanas. Por otro lado, Gochman *et al* (2012) analizando biopsias de pacientes con IBDs y cáncer de colon mediante inmunohistoquímica, observaron niveles altos de expresión de iNOS a nivel de proteína en comparación con muestras de pacientes controles. Del mismo modo, un estudio realizado con biopsias de pacientes con carcinogénesis colorrectal en diversos grados demostró que existe una alta expresión de iNOS a nivel de proteína, localizada principalmente en el citoplasma de las células epiteliales tumorales (Cianchi *et al.*, 2003). Por otra parte, un estudio realizado por Poremska y colegas reportaron que la actividad de Arginasa en suero así como en tumores de pacientes con carcinoma colorrectal, fue elevado significativamente en comparación con pacientes sanos (Poremska *et al.*, 2001). Por lo tanto, el infiltrado de macrófagos es dinámico y va cambiando en las diferentes etapas de la progresión tumoral.

El porcentaje de TAMs así como el equilibrio entre las subpoblaciones M1 y M2 en deficiencia de STAT1 durante el inicio y desarrollo del CAC también fue analizada. El aumento de células F4/80+ en el grupo STAT1 AOM/DSS fue significativo únicamente durante las etapas tardías del CAC (día 68), ubicándose principalmente dentro del estroma tumoral. De manera interesante, el porcentaje de macrófagos totales así como las células iNOS+ en la mucosa intestinal disminuyeron en los animales deficientes en STAT1. Por el contrario, en estos ratones predominaron las células Arginasa-1+ sobre todo en las etapas del desarrollo tumoral. Estos datos sugieren que la ausencia de STAT1 evita una acumulación importante de macrófagos en el intestino. No obstante, otra población celular podría estar favoreciendo la aparición de un daño más temprano y extenso en este grupo.



Algunos estudios han correlacionado la presencia de macrófagos infiltrados en tumores con un buen pronóstico en pacientes con CRC. Funada y colaboradores observaron que pacientes con CRC con bajo infiltrado de macrófagos CD68+ mostraban una invasión significativamente más alta en comparación con los pacientes con un mayor nivel de infiltrado de macrófagos (Funada *et al.*, 2003). De manera similar, Forssell *et al.*, (2007) mediante el análisis de biopsias de CRC humano, demostraron que la alta densidad de macrófagos CD68+ confería un aumento significativo en el promedio de supervivencia, además éstos macrófagos poseían propiedades tumoricidas dependientes del contacto directo con la célula tumoral. Los estudios anteriormente mencionados pueden relacionarse con los bajos niveles de macrófagos observados en el grupo STAT1<sup>-/-</sup> y el desarrollo acelerado y agresivo del CAC a nivel histopatológico; además de exponer la controversia existente entre la relación y función de los macrófagos durante el carcinoma colorrectal (Erreni *et al.*, 2011).

El balance entre las poblaciones de macrófagos M1 y M2 puede ser un componente clave en determinar la transición de inflamación a tumorigénesis en el CAC (Low *et al.*, 2014). Un análisis más detallado de estas poblaciones de macrófagos fue llevado a cabo a nivel de mRNA a lo largo del desarrollo del CAC. La expresión de genes asociados a macrófagos M1 (iNOS y TNF- $\alpha$ ) a nivel de mRNA en el tejido colónico fue significativamente elevada desde las etapas tempranas hasta las etapas tardías del CAC en el grupo WT AOM/DSS en comparación con el tejido sano. El cáncer asociado a inflamación crónica es conducido por factores solubles, citocinas y quimiocinas, las cuales son producidas por células tumorales y células reclutadas al microambiente tumoral (Klampfer, 2011). La óxido nítrico sintasa inducible (iNOS-NOS2), es una enzima predominantemente expresada durante la inflamación y altas cantidades de óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) ha sido observada en procesos pato-fisiológicos como la inflamación crónica y cáncer (Janakiram y Rao, 2012). Por otro lado, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) es una citocina con funciones proinflamatorias producida por leucocitos infiltrantes y células madre, que además puede ejercer funciones protumorigénicas (Klampfer, 2011).

Los datos observados en el grupo WT AOM/DSS concuerdan con los reportados por Cianchi y colaboradores quienes al analizar la expresión de iNOS a nivel de mRNA en tejido

tumoral de CRC, observaron mayores niveles de expresión en comparación con los detectados en mucosa normal (Cianchi *et al.*, 2003). De manera similar, un estudio utilizando células madre de cáncer (CSCs) de colon, reportó que aquellas células capaces de producir altas cantidades de NO<sup>•</sup> poseían una mayor habilidad tumorigénica en comparación con aquellas que producían pocas cantidades de NO<sup>•</sup> (Puglisi *et al.*, 2015). Por otro lado Popivanova y colegas, durante el desarrollo del CAC inducido por AOM/DSS en animales WT, observaron un incremento en la expresión de TNF- $\alpha$  a nivel de mRNA en el tejido, principalmente en las semanas de estímulo inflamatorio con DSS. Así mismo, Wan *et al* (2015), reportaron que los mayores niveles de producción de TNF- $\alpha$  a nivel de mRNA por parte de macrófagos M1 y M2 obtenidos de carcinoma colorrectal inducido por el empleo de AOM/DSS, eran durante las etapas de hiperplasia inflamatoria y displasia en M1 y displasia y desarrollo del carcinoma en M2. Por otra parte, mayor expresión de mRNA de TNF- $\alpha$  en tumores de CRC en etapas III y IV fue observada en comparación a tumores en estadios tempranos (Al Obeed *et al.*, 2014).

Los genes asociados a M1 en deficiencia de STAT1 también fueron evaluados a nivel de mRNA durante el desarrollo del CAC. Los niveles de expresión de iNOS se incrementaron únicamente al día 40 en comparación con tejido sano, mientras que los mayores niveles de producción de TNF- $\alpha$  se observaron en etapas tempranas (día 40) hasta etapas tardías (día 68) del CAC en ausencia de STAT1. Algunos estudios como el elaborado por Stempelj y colaboradores han demostrado que la expresión de iNOS es dependiente de la vía JAK/STAT1 en células epiteliales de colon transfectadas con el oncogen K-Ras, observando que el silenciamiento de STAT1 interfiere con la expresión de iNOS inducida por IFN- $\gamma$  y LPS (Stempelj *et al.*, 2007). Por otro lado, Zhang *et al* (2016) reportó que la expresión de iNOS a nivel de mRNA durante la neoplasia colorrectal inducida por AOM/DSS se mostraba muy similar a los expresados en tejido sano. Igualmente, mediante el empleo de ratones *APC<sup>Min/+</sup>*, Nakanishi y colaboradores al evaluar la expresión de iNOS a nivel de mRNA, observaron que no existía un incremento significativo en comparación con el grupo sano (Nakanishi *et al.*, 2011).

En cuanto a la expresión de genes asociados a macrófagos alternativos, se determinó que la expresión de Arginasa-1 a nivel de mRNA fue significativamente más alta desde el inicio hasta culminar el desarrollo del CAC para ambos grupos (WT AOM/DSS y STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS) en comparación con el tejido sano. Por el contrario, la expresión de FIZZ-1 fue significativamente menor tanto para los ratones WT como para los ratones STAT1<sup>-/-</sup> durante todo el desarrollo de la enfermedad. La arginasa-1 es una enzima que puede llegar a inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias y NO<sup>•</sup>; además de promover la reparación de tejido y fibrogénesis mediado por macrófagos, así como ejercer funciones inmunosupresoras por parte de las MDSC (Rath *et al.*, 2014). Por otro parte, FIZZ-1 (found in inflammatory zone 1) también conocida como RELM- $\alpha$  (resistin-like molecule  $\alpha$ ) o HIMF (hypoxia-induced mitogenic factor), es una proteína producida por macrófagos y células epiteliales de colon y pulmón, a menudo se ha relacionado con procesos fibrogénicos y se ha reportado que puede llegar a inhibir la inflamación, sin embargo también se ha llegado a relacionar con funciones proinflamatorias, además de poder ejercer funciones antiapoptóticas (Gordon y Martinez, 2010; Wynn y Barron, 2010).

Los resultados obtenidos por Zhang y colegas, se muestran similares a los reportados en este estudio; ellos mencionan que existe un incremento significativo en la expresión de arginasa-1 a nivel de mRNA durante la carcinogénesis inducida por AOM/DSS en comparación con los animales controles (Zhang *et al.*, 2016), sin embargo en nuestro estudio, la deficiencia de STAT1 favorece aún más la expresión y producción de Arginasa-1 a nivel local. Además, mediante el empleo de ratones APC<sup>Min/+</sup>, Nakanishi *et al* (2011) encontraron un ligero aumento en la producción de arginasa-1 a nivel mRNA en el tejido intestinal al compararlo con tejido sano.

Una de las respuestas del sistema inmune adaptativo altamente activa que contribuyen a la patogenia de las IBDs y en consecuencia al CAC, es la respuesta tipo Th17 (Catana *et al.*, 2015; Kim y Cheon, 2017). Los niveles de expresión de IL-17A a nivel de mRNA se incrementaron principalmente durante las etapas tardías del CAC en el grupo WT AOM/DSS a nivel de tejido, mientras que en deficiencia de STAT1 los niveles de ésta citocina incrementaron de manera importante desde las etapas más iniciales. Los resultados mostrados

concuerdan con los reportados por Cui y colegas, en donde ellos muestran que los niveles de expresión de IL-17A a nivel de mRNA *in situ*, incrementan gradualmente a través de la secuencia adenoma-carcinoma colorrectal. Así mismo, un estudio realizado en pacientes con diversos grados carcinogénicos colorrectales, demostró que la producción de IL-17A a nivel de tejido fue significativamente más alta en adenocarcinomas, en comparación con adenomas y colitis ulcerativa (Xie *et al.*, 2015). Además, mediante la inducción del CAC utilizando AOM/DSS en animales WT e IL-17A<sup>-/-</sup>, Hyun *et al* y Tong *et al*, demostraron que en ausencia de IL-17A el desarrollo del CAC disminuía significativamente en comparación con los animales WT. Finalmente, cabe mencionar que algunos autores han reportado que en ausencia de STAT1 la diferenciación tipo Th17 puede inducirse simultáneamente a través de la activación de STAT3 (Peters *et al.*, 2015), por lo tanto, el desarrollo más rápido y extenso de la tumorigénesis en el colon en los animales deficientes en STAT1 puede verse acelerado por una rápida respuesta de tipo Th17, sin embargo, se necesitan estudios adicionales para comprobar esta hipótesis.

La progresión tumoral en el CRC depende de la interacción de las células tumorales con diversos componentes del estroma tumoral, incluyendo células del sistema inmunológico; la habilidad de establecer un microambiente permisivo para su crecimiento y progresión es mediante la secreción de varios factores tales como citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que en conjunto conllevan al establecimiento tumoral (Klampfer, 2011; Mager *et al.*, 2016). Se evaluaron los niveles de producción de diversas citocinas relacionadas a respuestas Th1, Th2 y Th17 en sobrenadantes de células de bazo. Los niveles de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  fueron incrementados significativamente durante el inicio y establecimiento del CAC en el grupo WT, mientras que en deficiencia de STAT1 estas citocinas solo mostraron un incremento durante las etapas tardías. Además, la producción de IL-6 se incrementó de manera importante en el grupo STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS en las etapas tempranas del desarrollo tumoral lo que coincide con una mayor proliferación celular. Por otro lado, la producción de IL-17A e IL-17F fue detectada únicamente en los ratones STAT1<sup>-/-</sup> desde etapas tempranas a etapas tardías apuntando una vez más a que la respuesta Th17 puede verse favorecida en ausencia de STAT1. Así mismo, altos niveles de IL-22 fueron observados en el grupo STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS durante el transcurso del CAC. Por otro lado,

el grupo WT mostró una producción significativa de IL-10 durante las etapas tardías del CAC; en contraste, los mayores niveles de IL-10 en el grupo STAT1<sup>-/-</sup> fueron presenciados en etapas tempranas.

Los linfocitos y células dendríticas representan la principal fuente de IFN- $\gamma$  en el colon (Mager *et al.*, 2016). Kantola y colaboradores reportaron que bajos niveles de IFN- $\gamma$  en suero de pacientes con CRC es asociado con metástasis a nódulos linfáticos. Además, la deficiencia de IFN- $\gamma$  exacerba el desarrollo del CRC en ratones APC<sup>Min/+</sup> (Wang *et al.*, 2015); por lo tanto, los datos mencionados sugieren que IFN- $\gamma$  induce una respuesta antitumoral en el CRC. Sin embargo, estos datos son en adenocarcinomas bien desarrollados ya que como se demostró en este estudio, la expresión de IFN- $\gamma$  incrementa durante las etapas tempranas del desarrollo tumoral.

El papel de TNF- $\alpha$  ha sido reconocido por ejercer funciones claves durante el cáncer asociado a inflamación (Grivennikov y Karin, 2011). Altos niveles de TNF- $\alpha$  sistémico se correlacionó negativamente con apoptosis pero positivamente con la sobrevivencia de pacientes (Evans *et al.*, 2006). Además, niveles elevados de TNF- $\alpha$  en suero son encontrados en pacientes en etapa IV de CRC (Stanilov *et al.*, 2014), estos datos sugieren la importancia de TNF- $\alpha$  en el desarrollo del CRC. Se ha reportado que la Interleucina 6 (IL-6) juega un importante papel durante la inflamación, colitis crónica y CAC (Waldner *et al.*, 2012). Mayores niveles de IL-6 en suero de pacientes con CRC son encontrados en etapas III y IV además de ser asociados con un mal pronóstico y metástasis de hígado (Belluco *et al.*, 2000; Galizia *et al.*, 2002; Chung y Chang, 2003). Así mismo, Komoda y colegas observaron altas cantidades de IL-6 en tejido tumoral en comparación con tejido sano. Además, Grivennikov y colaboradores demostraron que la deficiencia de IL-6 (IL-6<sup>-/-</sup>) atenúa el desarrollo del CAC inducido con AOM/DSS; las evidencias anteriores demuestran la importancia de IL-6 en el desarrollo tumoral colorrectal. La ausencia de STAT1 podría favorecer a que las vías de señalización relacionadas con IL-6 se encuentren activadas favoreciendo una mayor proliferación celular y una aparición rápida de tumores en el colon.

Como se mencionó anteriormente, se sabe que la respuesta tipo Th17 está altamente involucrada en la patogenia del CAC. Tseng *et al* (2014), al implantar células de cáncer de colon (CT-26) observaron que los niveles de IL-17A en suero se correlacionaban positivamente con el número células tumorales circulantes (CTCs). En contraste, bajos niveles de IL-17F fueron expresados en tejidos de pacientes con CRC en comparación con los sanos; además la transfección de *IL-17F cDNA* en líneas celulares de cáncer de colon, inhibió su potencial tumorigénico. Así mismo animales *IL-17F<sup>-/-</sup>* mejoran el desarrollo tumoral mediante la inducción con AOM/DSS (Tong *et al.*, 2012). Por otro lado, se ha visto que los niveles de IL-22 en sangre periférica y tejido tumoral de CRC confieren resistencia a quimioterapias y se ha asociado con un mal pronóstico del paciente, además se ha demostrado que IL-22 mejora la proliferación de células de cáncer de colon (RKO) *in vitro* (Wu *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015). Por lo tanto, el incremento en la expresión de IL-17A e IL-17F en ausencia de STAT1 observado en este estudio podría acelerar la respuesta inflamatoria en las etapas tempranas del CAC.

Las enfermedades crónicas intestinales son caracterizadas por la pérdida del balance entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Klampfer, 2011). Algunos estudios han reportado que durante el CRC aumentan los niveles de IL-10 en suero, principalmente en etapas avanzadas (O'Hara *et al.*, 1998; Stanilov *et al.*, 2010). Además, altos niveles de IL-10 sistémico se ha correlacionado positivamente con el potencial proliferativo y apoptótico de las células tumorales (Evans, 2006). En contraste, Tanikawa y colaboradores (2012) demostraron que la deficiencia de IL-10 incrementa la incidencia y crecimiento tumoral durante el CAC inducido con AOM/DSS.

Los monocitos/macrófagos son células que se encuentran distribuidas en órganos linfo-reticulares incluyendo al bazo, dentro del bazo pueden inducir la activación de células T y células asesinas naturales (NK) (Komohara *et al.*, 2016). Además, se ha reportado la acumulación de células de origen mieloide en el bazo durante la inflamación crónica intestinal (Griseri *et al.*, 2012); así mismo, se sabe que éstas células pueden llegar a salir del bazo para migrar al estroma tumoral y contribuir a la población de TAMs (Cortez *et al.*, 2013). En el presente estudio se observó que durante el CAC existe una acumulación de

macrófagos a nivel de bazo en el grupo WT la cual se ve afectada en deficiencia de STAT1, además se mostró que al día 68 los macrófagos MMR+ aumentan significativamente en el grupo WT. Adicionalmente, durante las etapas tempranas del CAC se observó una disminución de las células CD11b+ en los animales WT. Por otra parte, los animales WT presentaron altos porcentajes de células CD11b+Ly6C<sup>high</sup> en sangre periférica durante el desarrollo del CAC; por el contrario, la deficiencia de STAT1 aumentó la población CD11b+Ly6C-. Por otro lado, a diferencia del grupo WT, los animales STAT1<sup>-/-</sup> mostraron mayores porcentajes de células CD11b+Ly6C-Ly6G+ circulantes durante el inicio y desarrollo del CAC. Estos datos sugieren que la ausencia de STAT1 en lugar de promover la acumulación de macrófagos inflamatorios, puede favorecer la acumulación de células granulocíticas Ly6G+.

Zhang y colegas demostraron que la deficiencia de CD11b contribuye a la inhibición del tráfico de células mieloides hacia el microambiente tumoral, culminando en la supresión tumoral en ratones *APC<sup>Min/+</sup>*. Por otro lado, durante el desarrollo del CAC mediante el uso de AOM/DSS, Katoh y colaboradores reportaron que existe una acumulación de macrófagos (CD11b+F4/80+) y neutrófilos (Ly6G+) en la mucosa del colon; sin embargo, en contraste a nuestros datos, no se observaron cambios a nivel sistémico. Además, durante el CRC en pacientes se observó el aumento de monocitos circulantes CD14+CD169+CD163+, CD14+CD169+CD206+ y macrófagos infiltrados en tumores (TIMs) IL-10+CD14+CD169+ el cual se correlacionó con etapas avanzadas de CRC (Chenguang *et al.*, 2015). Por lo tanto, resultaría interesante analizar cambios en la acumulación de neutrófilos en el colon de animales deficientes en STAT1 para así determinar si estos datos coinciden con lo que se observó a nivel sistémico, corroborando que los neutrófilos podrían ser los responsables del aumento en la tumorigénesis observada en los ratones STAT1<sup>-/-</sup>.

En resumen, la vía de señalización mediada por STAT1 está involucrada en el desarrollo del CAC, debido a que en su ausencia existe un desarrollo de la enfermedad exacerbado, mediado posiblemente por una respuesta inflamatoria de tipo Th17. Además, la activación y reclutamiento de monocitos/macrófagos se ve afectada en deficiencia de STAT1

lo que sugiere la participación de otras poblaciones celulares como los neutrófilos, capaces de ejercer una función importante en el desarrollo del CAC.

## 8. CONCLUSIONES

- La deficiencia de STAT1 exacerbó los signos asociados al desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis (CAC), como la diarrea, sangrado rectal, pérdida en el peso corporal y decesos tempranos.
- Los animales STAT1<sup>-/-</sup> AOM/DSS mostraron un desarrollo de la enfermedad más acelerado y agresivo, ya que presentaron el desarrollo de pólipos/tumores desde etapas muy tempranas ( día 20)
- Las alteraciones histopatológicas características del CAC, como alto infiltrado inflamatorio, formación de AFC y lesiones displásicas avanzadas, fueron más agravadas y presenciadas desde etapas tempranas del CAC en deficiencia de STAT1.
- Existe un menor infiltrado de macrófagos totales (F4/80+) en el tejido intestinal en deficiencia de STAT1, mientras que el grupo WT mostró una acumulación significativa de macrófagos durante el desarrollo del CAC.
- La presencia de células iNOS<sup>+</sup> a nivel de colon fue más elevada durante las etapas tempranas del CAC en el grupo WT. La localización de iNOS fue observada en los infiltrados leucocitarios y en las células tumorales del CAC para ambos grupos.
- Los animales deficientes en STAT1 mostraron mayores porcentajes de células Arginasa-1<sup>+</sup> al día 20 y 40; por el contrario, en el grupo WT fueron observados al día 40 y 68. La producción de Arginasa-1 fue localizada en los infiltrados leucocitarios y en las células tumorales del CAC para ambos grupos.
- La deficiencia de STAT1 altera los niveles de expresión de genes asociados a macrófagos M1 y M2 a nivel intestinal. La expresión de iNOS, TNF- $\alpha$  y Arginasa-1 a nivel de mRNA fue altamente elevado en los ratones WT durante todo el desarrollo del CAC, mientras que en el grupo KO aumentó la expresión de TNF- $\alpha$  y Arginasa-1 solo en etapas tardías.
- La expresión de IL-17A a nivel de mRNA fue favorecida en etapas tardías del CAC para ambos grupos.



- La producción de citocinas tipo Th1 por parte de células de bazo fue mayor en el grupo WT, sin embargo las citocinas tipo Th17 fueron incrementadas en el grupo deficiente de STAT1.
- Durante el CAC se observó una acumulación de macrófagos totales (F4/80+) en el bazo, la cual se vio afectada en ausencia de STAT1.
- Existe una disminución de las células CD11b+ a nivel de bazo y sangre periférica en los animales WT.
- Los porcentajes de la población mieloide monocítica CD11b+Ly6C<sup>high</sup> circulante incrementan significativamente en el grupo WT; mientras que los porcentajes de la población mieloide granulocítica CD11b+Ly6C-Ly6G+ se ven incrementados en deficiencia de STAT1.

## 9. LITERATURA CITADA

1. Adámková, L., Soucková, K., & Kovarik, J. (2007). Transcription Protein STAT1: Biology and Relation to Cancer. *Folia Biologica*, 1-6.
2. Al Obbed, O. A., Alkhayal, K. A., Sheikh, A. A., Zubaidi, A. M., Vaali-Mohammed, M.-A., Boushey, R., . . . Abdulla, M.-h. (2014). Increased expression of tumor necrosis factor-alfa is associated with advanced colorectal cancer stages. *World Journal of Gastroenterology*, 18390-18396.
3. Axelrad E., J., Lichtiger, S., & Yajnik, V. (2016). Inflammatory bowel disease and cancer: The role of inflammation, immunosuppression, and cancer treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 4795-4801.
4. Badawi, M. A., Abouefadl, D. M., El-Sharkawy, S. :, El-Aal, W. E., & Abbas, N. F. (2015). Tumor-Associated Macrophage (TAM) and Angiogenesis in Human Colon Carcinoma. *Maced J Med Sci.*, 209-214.
5. Belluco, C., Nitti, D., Frantz , M., Toopan, P., Basso, D., Plebani, M., . . . Jessup, M. J. (2000). Interleukin-6 Blood Level Is Associated With Circulating Carcinoembryonic Antigen and Prognosis in Patients With Colorectal Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 133-138.
6. Biswas, S. K., & Alberto, M. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*, 889–896.
7. Biswas, S. K., Allavena, P., & Mantovani, A. (2013). Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol*, 585–600.
8. Catana, C. S., Neagoe, I. B., Cozma, V., Magdas, C., Tabaran, F., & Dumitrascu, D. L. (2015). Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 5823-5830.
9. Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Kumar-Vijay, M. (2015). Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. *Curr Protoc Immunol*, 1-16.
10. Chávez-Galán, L., Olleros, M. L., Vesin, D., & García , I. (2015). Much more than M1 and M2 macrophages, there are also CD169+ and TCR+ macrophages. *Frontiers in Immunology*, 1-15.
11. Cho, H., & Kelsall, B. L. (2014). The role of type I interferons in intestinal infection, homeostasis and inflammation. *Immunol Rev*, 145-167.
12. Choi, C.-H. R., Bakir, I. A., Hart, A. L., & Graham, T. A. (2017). Clonal evolution of colorectal cancer in IBD. *Nature*, 218-229.
13. Chung, Y.-C., & Chang, Y.-F. (2003). Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 222–226.

14. Cianchi, F., Cortesini, C., Fantappiè, O., Messerini, L., Schiavone, N., Vannacci, A., . . . Masini, E. (2003). Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Human Colorectal Cancer. *American Journal of Pathology*, 793-801.
15. Cortez Retamozo, V., Etzrodt, M., Newton, A., Rauch, P. J., Chudnovskiy, A., Berger, C., . . . Pittet, M. J. (2012). Origins of tumor-associated macrophages and neutrophils. *PNAS*, 2491-2496.
16. Cortez Retamozo, V., Etzrodt, M., Newton, A., Ryan, R., Pucci, F., Sio, S., . . . Pittet, M. J. (2013). Angiotensin II drives the production of tumor-promoting macrophages. *Immunity*, 296-308.
17. Cui, G., Yuan, A., Goll, R., & Florholmen, J. (2012). IL-17A in the tumor microenvironment of the human colorectal adenoma–carcinoma sequence. *Scand J. Gastroenterology*, 1304-1312.
18. D. Simpson, J. A., Al-Attar, A., S. Watson, N. F., H. Scholefield, J., Ilyas, M., & G. Durrant, L. (2010). Intratumoral T cell infiltration, MHC class 1 and STAT1 as biomarkers of good prognosis in colorectal cancer. *Gut*, 926-933.
19. De Robertis, M., Massi, E., Poeta Luana, M., Crotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., . . . Fazio, M. V. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of the colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of carcinogenesis*.
20. Duk Hwan, K., & Jae hee, C. (2017). Pathogenesis of inflammatory bowel disease and recent advances in biologic therapies. *Immune Network*, 25-26.
21. Edin, S., Wikberg, M., Dahlin, A. M., Rutegard, J., Öberg, A., Oldenborg, A., & Palmqvist, R. (2012). The Distribution of Macrophages with a M1 or M2 Phenotype in Relation to Prognosis and the Molecular Characteristics of Colorectal Cancer. *PLoS ONE*, 1-12.
22. Erreni, M., Mantovani, M., & Allavena, P. (2011). Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in colorectal cancer. *Cancer Microenvironment*, 141-154.
23. Evans, C., Morrison, I., Heriot, A. G., Bartlett, J. B., Finlayson, C., Dalglish, A. G., & Kumar, D. (2006). The correlation between colorectal cancer rates of proliferation and apoptosis and systemic cytokine levels; plus their influence upon survival. *British Journal of Cancer*, 1412-1419.
24. Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal Gastrointestinal Oncology*, 153-160.
25. Forssell, J., Öberg, A., Henroksson, M. L., Stenling, R., Jung, A., & Palmqvist, R. (2007). High Macrophage Infiltration along the Tumor Front Correlates with Improved Survival in Colon Cancer. *Clin Cancer Res.*, 1472-1479.

26. Freeman, H. J. (2008). Colorectal cancer risk in Crohn's disease. *World Journal Gastroenterology*, 1810-1811.
27. Funada, Y., Noguchi, T., Kikuchi, R., Takeno, S., Uchida, Y., & Gabbert, H. E. (2003). Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncol Rep*, 309-313.
28. Gabrilovich, D. I., Rosenberg, S. O., & Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumors. *Nat Rev Immunol*, 253-268.
29. Galdiero, M. R., Bonavita, E., Barajon, I., Garlanda, C., Mantovani, A., & Jaillon, S. (2013). Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. *Immunobiology*, 1402– 1410.
30. Galizia, G., Orditura, M., Romano, C., Lieto, E., Castellano, P., Pelosio, L., . . . De vita, F. (2012). Prognostic Significance of Circulating IL-10 and IL-6 Serum Levels in Colon Cancer Patients Undergoing Surgery. *Clinical Immunology*, 169-178.
31. Giles, E., Sanders, T., McCarthy, N., Lung, Pathak, McDonald, T., . . . Stagg, A. (2017). Regulation of human intestinal T-cell responses by type 1 interferon-STAT1 signaling is disrupted in inflammatory bowel disease. *Mucosal Immunology*, 184-193.
32. Ginhoux, F., & Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*, 239-249.
33. Globocan. (10 de Mayo de 2012). *Globocan*. Obtenido de [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx?cancer=colorectal](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx?cancer=colorectal)
34. Gochman, E., Mahajna, J., Shenzer, P., Dahan, A., Blatt, A., Elyakim, R., & Reznick, A. Z. (2012). The expression of iNOS and nitrotyrosine in colitis and colon cancer in humans. *Acta Histochemica*, 827-835.
35. Gordon, S., & Martinez, F. O. (2010). Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity*, 593-604.
36. Gordziel, C., Bratsch, J., Moriggl, R., Knösel, T., & Friedrich, K. (2013). Both STAT1 and STAT3 are favourable prognostic determinants in colorectal carcinoma. *British Journal of Cancer*, 138-146.
37. Griseri, T., McKenzie, B. S., Schiering, C., & Powrie, F. (2012). Dysregulated hematopoietic stem and progenitor cell activity promotes interleukin-23-driven chronic intestinal inflammation. *Immunity*, 1116-1119.
38. Grivennikov, S. I., & Karin, M. (2011). Inflammatory cytokines in cancer: tumour necrosis factor and interleukin 6 take the stage. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 104-108.

39. Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.-Y., Vallabhapurapu, S., . . . Karin, M. (2009). IL-6 and STAT3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis associated cancer. *Cancer Cell*, 103-113.
40. Hanada, T., Kobayashi, T., Chinen, T., Saeki, k., Takaki, H., Koga, K., . . . Yoshimura, A. (2006). IFN $\gamma$ -dependent, spontaneous development of colorectal carcinomas in SOCS1-deficient mice. *The Journal of experimental Medicine*, 1391–1397.
41. Huang, Y.-H., Cao, Y.-F., Jiang, Z.-Y., Zhang, S., & Gao, F. (2015). Th22 cell accumulation is associated with colorectal cancer development. *World Journal of Gastroenterology*, 4216-4224.
42. Hyun, Y. S., Han, D. S., Lee, A. R., Eun, C. S., Youn, J., & Kim, H.-Y. (2012). Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis*, 931-936.
43. International Agency for Research on Cancer. (2017). *Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System*. México.
44. J. A., E., K. R., A., & J. F., M. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis. a meta-analysis. *Gut*, 526-535.
45. J. A., E., K. R., A., & J. F., M. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, 526-535.
46. Jasperson W., K., Touhy M., T., Neklason W. , D., & Burt W., R. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*, 01-02.
47. Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*, 2044-2058.
48. Kaler, P., Owusu Y., B., Augenlicht, L., & Klampfer, L. (2014). The role of STAT1 for crosstalk between fibroblast and colon cancer cells. *Oncology*, 1-9.
49. Kantola , T., Klintrup, K., Väyrynen, J. P., Bloigu, R., Karhu, T., herzing, K.-H., . . . Mäkinen, M. J. (2012). Stage-dependent alterations of the serum cytokine pattern in colorectal. *British Journal of Cancer*, 1729-1736.
50. Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon g-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Immunology*, 7556-7561.
51. Katoh, H., Wang, D., Daikoku, T., Sun, H., Dey, S. K., & DuBois, R. N. (2013). CXCR2-expressing myeloid-derived suppressor cells are essential to promote colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*, 631–644.
52. Kim, D. H., & Cheon, J. H. (2017). Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Recent Advances in Biologic Therapies. *Immune Network*, 25-40.

53. Kim, H. S., & Lee, M.-S. (2007). STAT1 as a key modulator of cell death. *Cellular Signalling*, 454-465.
54. Kim, H., & Lee, M. (2007). STAT1 as a key modulator of cell death. *Cell signal*.
55. Klampfer, L. (2011). Cytokines, inflammation and colon cancer. *Curr Cancer Drug Targets* , 451-464.
56. Komohara, Y., Fujiwara, Y., Ohnishi, K., & Takeya, M. (2015). Tumor-associated macrophages: Potential therapeutic targets for anti-cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1-6.
57. Komohara, Y., Ohnishi, K., & Takeya, M. (2016). Possible functions of CD169-positive sinus macrophages in lymph nodes in anti-tumor immune responses. *Cancer Science*, 290-295.
58. Laroui, H., Ingersoll, S. A., Liu, H. C., Baker, M. T., Ayyadurai, S., Charania, M. A., . . . Merlin, D. (2012). Dextran Sodium Sulfate (DSS) Induces Colitis in Mice by Forming Nano-Lipocomplexes with Medium-Chain Length Fatty Acids in the Colon. *PLoS ONE*, 1-12.
59. Lasry, Lasry, A., Zinger, A., & Ben-Neriah, Y. (2016). Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nature immunology*, 232-233.
60. Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A., & Merad, M. (2015). Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues . *Nat Rev Immunol*, 731–744.
61. Li, C., Luo, X., Lin, Y., Tang, X., Ling, L., Wang, L., & Jiang, Y. (2015). A Higher Frequency of CD14+CD169+ Monocytes/Macrophages in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS ONE*, 1-15.
62. Liddle J., F., & Frank A., D. (2008). STAT1 expression is not required for polyp formation in Min mice. *Molecular Carcinogenesis*, 75-79.
63. Liu, Y., & Cao, X. (2015). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Cellular and Molecular Immunology*, 1-4.
64. Low, D., Mino-Kenudson, M., & Mizoguchi, E. (2014). Recent advances in understanding colitis-associated tumorigenesis. *Inflamm Bowel Dis*, 2115-2123.
65. Luo, C., & Zhang, H. (2017). The Role of Proinflammatory Pathways in the Pathogenesis of Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Mediators of Inflammation*, 1-8.
66. Mager, L. F., Wasmer, M.-H., Rau, T. T., & Krebs, P. (2016). Cytokine-induced Modulation of Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, 1-19.
67. Malyshev, I., & Malyshev, Y. (2015). Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage "Switch" Phenotype. *BioMed Research International*, 1-22.

68. Mariani, F., Sena, P., & Roncucci, L. (2014). Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. *World Journal of Gastroenterology*, 9716-9731.
69. Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular Basis of Colorectal Cancer. *The new England Journal of Medicine*, 2449-2460.
70. Masakasu, Y. (2015). Molecular alterations of colorectal cancer with inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*.
71. McClellan, J. L., Davis, M. J., Steiner, J. L., Enos, R. T., Jung, S. H., Carson, J. A., . . . Muylphy, A. E. (2012). Linking tumor-associated macrophages, inflammation, and intestinal tumorigenesis: role of MCP-1. *Physiology and GI Cancer*, 1087–1095.
72. Megaraj, V., Ding, X., Fang, C., Kovalchuk, N., Zhu, Y., & Zhang, Q.-Y. (2014). Role of hepatic and intestinal p450 enzymes in the metabolic activation of the colon carcinogen azoxymethane in mice. *Chemical Research in Toxicology*, 656-661.
73. Meissl, K., Macho-Maschler, S., Müller, M., & Strobl, B. (2015). The good and the bad faces of STAT1 in solid tumors. *Cytokine* 89, 12-20.
74. Monteleone, G., Pallone, F., & Stolfi, C. (2012). The Dual Role of Inflammation in Colon Carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 11071-11084.
75. Movahedi, K., Laoui, D., Gisemans, C., Baeten, M., Stangé, G., Bossche, J., . . . Ginderachter, V. (2010). Different Tumor Microenvironments Contain Functionally Distinct Subsets of Macrophages Derived from Ly6C(high) Monocytes. *Microenvironment and Immunology*, 5728-5739.
76. Murthy, S., Cooper S., H., Shim, H., Shah S., R., Ibrahim A., S., & Sedergran J., D. (1993). Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Digestive Diseases and Sciences*, 1722-1734.
77. Nakanishi, Y., Nakatsuji, M., Seno, H., Ishizu, S., Akitake-Kawano, R., Kanda, K., . . . Chiba, T. (2011). COX-2 inhibition alters the phenotype of tumor-associated macrophages from M2 to M1 in ApcMin/+ mouse polyps. *Carcinogenesis*, 1333–1339.
78. Nivarthi, H., Gordziel, C., Themanns, M., Kramer, N., Eberl, M., Rabe, B., . . . Moriggl, R. (2016). The ratio of STAT1 to STAT3 is a determinant of colorectal cancer growth. *Oncotarget*, 51096-51106.
79. O' Connor, P. M., Lapointe, T. K., Beck, P. L., & Buret, A. G. (2010). Mechanism by which Inflammation May Increase Intestinal Cancer Risk in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis*, 1411-1420.
80. O' Connor, P. M., Lapointe, T. K., & Buret, A. G. (2010). Mechanisms by which inflammation may increase intestinal cancer risk in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 1411-1413.

81. O'Hara, R. J., Greenman, J., MacDonald, A. W., Gaskell, K. M., Topping, K. P., Duthie, G. S., . . . Monson, J. R. (1998). Advanced Colorectal Cancer Is Associated with Impaired Interleukin 12 and Enhanced Interleukin 10 Production. *Clinical Cancer Research*, 1943-1948.
82. Ong, S.-M., Tan, Y.-C., Beretta, O., Jiang, D., Yeap, W.-H., Tai, J. J., . . . Wong, S.-C. (2012). Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response. *European Journal of Immunology*, 89-100.
83. Pandurangan, A., & Esa, N. (2014). Luteolin a Bioflavonoid Inhibits Colorectal Cancer through Modulation of Multiple Signaling Pathways: A Review. *Asian Pac J. Cancer Prev*.
84. Parker, K. H., Beury, D. W., & Rosenberg, S. O. (2015). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *Adv Cancer Res.*, 95-139.
85. Pernet, S., Terme, M., Voron, T., Colussi, O., Marcheteau, E., Tartour, E., . . . Taieb, J. (2014). Colorectal cancer and immunity: What we know and perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, 3738-3750.
86. Peters, A., Fowler, K. D., Chalmin, F., Merkler, D., Kuchroo, V. K., & Pot, C. (2015). IL-27 Induces Th17 Differentiation in the Absence of STAT1 signaling. *The Journal of Immunology*, 4144-4153.
87. Popivanova, B. K., Kitamura, K., Wu, Y., Kondo, T., Kagaya, T., Kaneko, S., . . . Mukaida, N. (2008). Blocking TNF- $\alpha$  in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 460-470.
88. Porembaska, Z., Zabek, J., Grabon, W., Rahden-Staron, I., & Baranczyk-Kuzma, A. (2001). Arginase isoforms in human colorectal cancer. *Clinica Chimica Acta*, 157-165.
89. Puglisi, M. A., Cenciarelli, C., Tesori, V., Cappellari, M., Martini, M., Di Francesco, A. M., . . . Gasbarrini, A. (2015). High nitric oxide production, secondary to inducible nitric oxide synthase expression, is essential for regulation of the tumour-initiating properties of colon cancer stem cells. *The Journal of Pathology*, 479-490.
90. Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I., & Munder, M. (2014). Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Immunology*, 1-10.
91. Rogler, G. (2013). Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer letters*, 235.



92. Romano, M., De francesco, F., Zarantonello, L., Ruffolo, C., Ferraro, G. A., Zanus, G., . . . Cillo, U. (2016). From Inflammation to cancer in inflammatory Bowel Disease: Molecular Perspectives. *Anticancer Research*, 1447-1450.
93. Rosenberg W., D., Giardina, C., & Tanaka, T. (2009). Mouse model for the study of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 183-196.
94. Schreiber, S., Rosenstiel, P., Hampe, J., Nikolaus, S., Groessner, B., Schottelius, A., . . . Seegert, D. (2002). Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. *Gut*, 379-385.
95. Shabo, I., Olsson, H., & Elkarim, R. (2014). Macrophage Infiltration in Tumor Stroma is Related to Tumor Cell Expression of CD163 in Colorectal Cancer. *Cancer Microenvironment*, 61-69.
96. Sohn, S. O., Fiala, S. E., Requeijo, P. S., Weisburger, H. J., & Gonzalez, J. F. (2001). Differential effects of CYP2E1 Status on the metabolic activation of the colon carcinogens azoxymethane and methylazoxymethanol. *Cancer research*, 8435-8440.
97. Stanilov, N., Miteva, L., Deliysky, T., Jovchev, J., & Stanilova, S. (2010). Advanced Colorectal Cancer Is Associated With Enhanced IL-23 and IL-10 Serum Levels. *Science*, 159-163.
98. Stempelj, M., Kedinger, M., Augenlicht, L., & Klampfer, L. (2007). Essential Role of the JAK/STAT1 Signaling Pathway in the Expression of Inducible Nitric-oxide Synthase in Intestinal Epithelial Cells and Its Regulation by Butyrate\*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 9797-9804.
99. Tanaka, T. (2012). Development of an Inflammation-Associated Colorectal Cancer Model and Its Application for Research on Carcinogenesis and Chemoprevention. *International Journal of Inflammation*, 1-16.
100. Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., & Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfato. *Cancer Sci*, 965-973.
101. Tanikawa, T., Wilke, C. M., Kryczek, I., Chen, G. Y., Kao, J., Núñez, G., & Zou, W. (2012). Interleukin (IL)-10 ablation promotes tumor development, growth and metastasis. *Cancer Research*, 420-429.
102. Thoeni, C., Hamilton, E. A., Elkadri, A., Murchie, R., Fiedler, K., Ovadia, A., . . . Roifman, C. M. (2016). The effects of STAT1 dysfunction on the gut. *LymphoSing Journal*, 19-33.
103. Tong, Z., Yang, X. O., Yan, H., Liu, W., Niu, X., Shi, Y., . . . Che, D. (2012). A Protective Role by Interleukin-17F in Colon Tumorigenesis. *PLoS ONE*, 1-8.

104. Triantafyllidis K., J., Nasioulas, G., & Kosmidis A., P. (2009). Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: Epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer research*, 2728.
105. Trikha, P., & Carson, W. E. (2014). Signaling pathways involved in MDSC regulation. *Biochim Biophys Acta*, 55-65.
106. Tymoszuk, P., Evens, H., Marzola , V., Wachowicz, K., Wasmer, M.-H., Datta, S., . . . Doppler, W. (2014). In situ proliferation contributes to accumulation of tumor-associated macrophages in spontaneous mammary tumors. *European Journal of Immunology*, 2247-2262.
107. Ugel, S., De Sanctis, F., Mandruzzato, S., & Bronte, V. (2015). Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. *Cancer Immunotherapy*, 3365-3376.
108. Villalobos, P. J., Bourlon, T. M., & Castillo, L. A. (2014). Variaciones en la frecuencia de cáncer del aparato digestivo en el transcurso de 35 años en cuatro instituciones de la ciudad de México de distinto nivel socioeconómico. *Gaceta Médica de México*, 50-56.
109. Wang, L., Wang, Y., Song, Z., Chu, J., & Qu, X. (2015). Deficiency of Interferon-Gamma or Its Receptor Promotes Colorectal Cancer Development. *J Interferon Cytokine Res*, 273-280.
110. Wang, W., Li, X., Zheng, D., Zhang, D., Huang, S., Zhang, X., . . . Shen, S. (2013). Dynamic changes of peritoneal macrophages and subpopulations during ulcerative colitis to metastasis of colorectal carcinoma in a mouse model. *Inflammation Research*, 669–680.
111. Wang, W., Li, X., Zheng, D., Zhang, D., Peng, X., Zhang, X., . . . Shen, S. (2015). Dynamic changes and functions of macrophages and M1/M2 subpopulations during ulcerative colitis-associated carcinogenesis in an AOM/DSS mouse model. *MOLECULAR MEDICINE REPORTS*, 2397-2406.
112. Wu, T., Wang, Z., Liu, Y., Mei, Z., Wang, G., Liang, Z., . . . Liu, C.-Y. (2014). Interleukin 22 protects colorectal cancer cells from chemotherapy by activating the STAT3 pathway and inducing autocrine expression of interleukin 8. *Clinical immunology*, 116-126.
113. Wynn, T. A., & Barron, L. (2010). Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin Liver Dis*, 245–257.
114. Wynn, T. A., Chawla, A., & Pollard, J. W. (2013). Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature*, 445–455.

115. Xie, Z., Qu, Y., Sun, W., Ma, S., Wei, J., Hu, J., & Zhang, X. (2015). Human colon carcinogenesis is associated with increased interleukin-17-driven inflammatory responses. *Drug Design, Development and Therapy*, 1679-1689.
116. Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X. F., & Wang, H. (2014). Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker Research*, 1-9.
117. Zhang, Q. Q., Hu, W. X., Liu, Y. L., Ye, Z. J., Gui, Y. H., Zhou, D. L., . . . Wang, L. J. (2015). CD11b deficiency suppresses intestinal tumor growth by reducing myeloid cell recruitment. *Nature*, 1-12.
118. Zhang, W., Chen, L., Ma, K., Zhao, Y., Liu, X., Wang, Y., . . . Xu, N. (2016). Polarization of macrophages in the tumor microenvironment is influenced by EGFR signaling within colon cancer cells. *Oncotarget*, 75366-75378.
119. Zhou D, H. C. (2014). Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal*, 192–197.