



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“Severidad en el desarrollo de la colitis ulcerativa en
ausencia de las vías STAT1, STAT6 e IL-4R α .”

TESIS

QUE PARA OBTENER TITULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

ILSE CHÁVEZ SOTO



DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
LOS REYES IZTACALA EDO. MÉXICO.2018



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.

Dedicatorias.

A mis padres María y Roberto, por siempre estar conmigo, por todo el amor que me han dado, por guiarme para poder lograr esto, e impulsarme para siempre superarme. Sin su esfuerzo y dedicación no hubiera podido lograr nada de esto, en verdad muchas gracias, los quiero mucho y les agradezco infinitamente todo.

A mi hermana Lizeth por el apoyo que me brindo todos estos años, los regaños, los consejos, el cariño y también porque gracias a ella elegí esta hermosa carrera.

Gracias a mi cuñado Aldo por la ayuda y los consejos a lo largo de la carrera.

A mis tías (Lilia, Maty, Beatriz) y mi tío Luis por su apoyo y amor a lo largo de los años.

A mi abuelo Felipe que siempre me cuidó, consintió y me brindo mucho amor y a pesar de que ya no está conmigo, siempre lo recuerdo y lo extraño.

A mis amigas de la carrera Brench, Dali, Lau y mis amigos Ale y Miguel muchas gracias por todas las vivencias, el cariño y las aventuras que vivimos en toda la carrera.

A mis amigos Luz y Luis los quiero mucho y les agradezco todos estos años de amistad.

Agradecimientos.

A mi asesor el Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés por la oportunidad que me brindo al permitirme trabajar y formar parte de su laboratorio, también por todos los conocimientos que me proporciono y por la guía en la realización de este trabajo, muchas gracias.

A Yadis por ser mi guía a lo largo de este trabajo, por la confianza, el apoyo y la paciencia en estos años, en verdad Yad muchas gracias.

A mis sinodales la Dra. Miriam Rodríguez Sosa, el Dr. Luis Enrique Arias Romero y la Dra. Martha Ofelia Salcedo Alvares por su orientación.

A la Dra Ma. Leticia Olga Flores por proporcionarnos los animales necesarios para este proyecto.

A mis amigos del laboratorio 8 por apoyarme, enseñarme, escucharme y ayudarme a lo largo de los años (Blanca, Dianis, Sandy, Yola, Memo y Ángel) y también a las niñas Nimsi y Alejandra.

"La raza humana necesita un desafío intelectual.

Debe ser aburrido ser Dios y no tener nada que descubrir".

Stephen Hawking



Contenido

1	.Abreviaturas empleadas.	3
2	.Resumen	6
3	.Introducción	8
3.1	Función intestinal	8
3.2	Respuesta inmune intestinal	8
3.3	Enfermedades inflamatorias intestinales	11
3.4	Colitis Ulcerativa	13
3.5	Vía JAK/STAT	16
3.6	Participación de la vía JAK/STAT en el desarrollo de la Colitis Ulcerativa	19
3.6.1	STAT1	20
3.6.2	STAT6	20
3.7	Modelo de colitis experimental por DSS	22
4	.Justificación	23
5	.Hipótesis	24
6	.Objetivos	25
6.1	Objetivo general	25
6.2	Objetivos particulares	25
7	.Materiales y métodos	26
7.1	Material Biológico de Referencia	26
7.2	Inducción de la colitis experimental	26
7.3	Evaluación del modelo de colitis experimental	26
7.4	Análisis histológico	27
7.5	Inmunohistoquímica en colon	28
7.6	Cuantificación de citocinas de sobrenadante de cultivo de colon (ELISA)	29
7.7	ELISAS	29
7.8	Citometría de flujo (FACS)	30
7.9	RT-PCR	31
7.10	Electroforesis	32
7.11	Análisis de Datos	32
8	.Análisis de Resultados	34
8.1	Porcentaje de pérdida de peso	34
8.2	Evaluación del índice de actividad de la enfermedad (IAE)	35
8.3	Longitud del colon	36
8.4	Análisis histológico de HE	37
8.5	Análisis de infiltrado celular en lámina propia mediante citometría de flujo	38



Contenido

8.6	Análisis histológico de células caliciformes por tinción con Alcian Blue.....	41
8.7	La presencia de un mayor número de células caliciformes puede estar favoreciendo la expresión de mucinas (MUC 2) como método de protección ante el DSS en los diferentes grupos	42
8.8	Análisis de la citocina IL-13 en cultivo de tejido de colon.....	44
8.9	Análisis del complejo proteico E-cadherina/ β - catenina en tejido de colon.....	45
9	.Discusión	47
10	.Conclusiones:	51
11	.Referencias Bibliográficas	52



1 .Abreviaturas empleadas.

Abreviaturas	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
BSA	Albumina de suero bovino
Células NK	Células Natural Killer (asesinas naturales)
CU	Colitis ulcerativa
DNAasa I	Desoxirribonucleasa I de páncreas de bovino
DSS	Dextran sulfato de sodio
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EII	Enfermedades inflamatorias intestinales
FACS Buffer	Fluorescence-activated cell sorting (regulador de células activadas por fluorescencia)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa)
GATA3	GATA binding protein 3 (proteína de unión 3)



Abreviaturas

H&E	Hematoxilina-Eosina
HBSS	Solución salina equilibrada de Hanks
IAE	Índice de actividad de la enfermedad
IL	Interleucina
IL-4αR	Cadena alfa del receptor de interleucina 4
JAK	Cinasas Janus
JAM	Junctional adhesion molecule (Molécula de unión en la adhesión)
MUC2	Mucina 2
NF-kappaB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NOD	Nucleotide oligomerization domain (Dominio de oligomerización de nucleótidos)
RNA	Ácido ribonucleico
ROS (ERO)	Especies reactivas del oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa



Abreviaturas

SBF	Suero bovino fetal
SOCS	Supresor de la señalización de citocinas
STAT	Transductor y activador de la señalización
TGF-β	Transforming growth factor (Factor de transformación de crecimiento)
Th	T helper (T cooperadora)
TLR	Toll-like-receptors (Receptor tipo Toll)
TNBS	2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (ácido trinitrobenzenosulfónico)
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral alfa



2. Resumen

La colitis ulcerativa (CU) es una enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en donde se observa alta secreción de citocinas pro-inflamatorias como Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF- α), Interferon-gamma (IFN- γ), interleucina (IL)-1 β e IL-17A, pero también producción de citocinas características del perfil Th2 como IL-13 e IL-4. En estas respuestas se involucran los transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT) que participan en la patogénesis de CU. STAT1 y STAT6 son dos de las vías más importantes para modular la función inmune intestinal y la homeostasis. Sin embargo, el papel que desempeñan en la CU aún no está claro, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar como la ausencia de STAT1, STAT6 e IL-4R α afecta el desarrollo de colitis experimental inducida por dextran sulfato de sodio (DSS). Se usaron ratones BALB/c (WT), STAT1^{-/-}, IL-4R α ^{-/-} y STAT6^{-/-} para generar colitis, con administración oral de DSS al 4%. Se encontró que los ratones WT y STAT1^{-/-} mostraron la mayor severidad en el desarrollo de CU, con mayores signos de índice de enfermedad (IAE), pérdida de peso, una reducción significativa en la longitud del colon y a nivel histológico mostró un mayor infiltrado inflamatorio, compuesto principalmente por, neutrófilos (CD11b + Ly6C^{low}Ly6G⁺) y por monocitos pro-inflamatorios (CD11b⁺Ly6C^{Hi}Ly6G⁻). También se detectó una disminución en el porcentaje de células caliciformes, menor expresión del gen MUC2, y una disminución en la presencia del complejo de adhesión molecular E-cadherina/ β -catenina en el epitelio. Los grupos menos afectados fueron los animales IL-4R α ^{-/-} y STAT6^{-/-}. Mostrando que la ausencia de la molécula STAT6 favorece la protección de la barrera epitelial promoviendo una mayor expresión del complejo de adhesión molecular E-cadherina/ β -catenina, preservando las células caliciformes, que expresan más el gen MUC2 (mucinas) que funcionan como protección de la



Resumen

integridad del epitelio que reduce el proceso inflamatorio y el reclutamiento de células inmunes como los neutrófilos y los monocitos pro-inflamatorios que contribuyen al daño. Sin embargo, la ausencia de STAT1 no parece afectar el desarrollo de la colitis. Así STAT6 e IL-4R α podrían ser un blanco terapéutico para el tratamiento de la colitis ulcerativa previniendo la inflamación y así disminuir el riesgo de desarrollar cáncer de colon, ya que la inflamación se asocia fuertemente a la progresión del cáncer de colon asociado a colitis.



3 .Introducción

3.1 Función intestinal

El intestino constituye una extensa superficie de moco con vellosidades, microvellosidades y criptas, especialmente diseñadas para aumentar el área de contacto y favorecer la absorción de nutrientes provenientes principalmente de la dieta. Los componentes del intestino interactúan con los alimentos, como también con más de 400 especies diferentes de bacterias comensales, que se alojan en la mucosa y facilitan procesos asociados con la nutrición[1]. Debido al gran número de bacterias presentes en el intestino, el sistema inmune debe ser capaz de diferenciar entre comensales y patógenos, y generar adecuadas respuestas de tolerancia o inflamación, respectivamente[2].

3.2 Respuesta inmune intestinal

Las interacciones entre los microorganismos, la mucosa, el epitelio y los tejidos linfoides intestinales son muy variadas en sus características, de tal modo que los mecanismos efectores (inflamación) y de tolerancia, se modifican constantemente para adaptarse a las necesidades que genere el ambiente microbiano, al hospedero[3].

La primera barrera de protección del sistema inmune intestinal es una capa de moco compuesta por mucinas (glicoproteínas de alto peso molecular), sintetizada por células caliciformes, especializadas en la secreción de mucinas[4]. Estas células se encuentran bajo regulación directa por el sistema inmune, como ejemplo, la hiperproliferación de estas y la hipersecreción de moco asociada con infecciones parasitarias, provocando una respuesta de tipo Th2 con niveles incrementados de citocinas, como Interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-9 e IL-13, donde IL-13 se considera la citocina efectora principal [5]. Se ha demostrado que las células caliciformes intestinales expresan las subunidades IL-4R α e IL13R α 1, lo que hace



Introducción

probable que IL-13 actúe directamente sobre ellas para inducir la hiperplasia de las células caliciformes a través de la señalización STAT6 [6].

Estas mucinas sirven para lubricar el epitelio gastrointestinal, protegiéndolo contra el daño mecánico, además de impedir la colonización del epitelio por agentes patógenos y mantener el crecimiento bacteriano controlado. La mucosa gástrica normal muestra expresión específica de MUC1 y MUC2. Estas mucinas están unidas a la membrana de células epiteliales [7].

La barrera formada por células epiteliales (barrera epitelial) juega un papel muy importante, ya que la integridad de esta es crucial para el mantenimiento en la homeostasis del sistema inmune intestinal [8]. Formada por una monocapa continua, en donde las membranas de las células individuales están conectadas entre sí y unidas a la membrana mediante complejos proteicos que proporcionan al epitelio la integridad estructural y la actividad celular necesarias para llevar a cabo sus funciones específicas. Estas uniones intercelulares se clasifican en tres grupos funcionales: uniones de anclaje, uniones comunicantes y uniones estrechas. Estas últimas están compuestas por diferentes proteínas como las ocludinas, claudinas, las JAM y las caderinas,[2] una de las proteínas más importantes en esta tipo de uniones es la E-cadherina, una glicoproteína de 120 kDa la cual regula la adhesión de células epiteliales. Esta proteína se localiza en las uniones adherentes, a través de la formación de homodímeros extracelulares, sin embargo, esta unión es muy inestable por lo cual refuerza la estabilidad en la unión al ligarse al citoesqueleto por los microtúbulos mediante β -catenina, manteniendo así, la integridad de la barrera epitelial mediante el complejo E-cadherina- β -catenina [9] (Figura 2).

La posición de la barrera epitelial en primera línea y en contacto con la luz intestinal les permite la captación y reconocimiento inicial de antígenos externos a fin de que transmitan señales a las células del sistema inmune innato, que residen en la submucosa (macrófagos, células dendríticas, células linfoides innatas etc.) [10]. La rápida respuesta de estas células permite la activación de los mecanismos de defensa a través de receptores innatos que detectan



Introducción

componentes estructurales comunes de bacterias o virus. Esto se realiza en el medio extracelular mediante los Toll-like-receptors (TLR) de la membrana, y en el medio intracelular mediante las proteínas tipo NOD del citosol. La activación de estos por invasión bacteriana genera inmediatamente señales de factores de transcripción (NF-kappaB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) STATs etc.) que se traslocan al núcleo celular, donde activan la expresión de genes responsables de la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como Factor de Necrosis Tumoral alpha (TNF- α), Interferon-gamma (IFN- γ), IL-1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, e IL-12. De este modo, las células epiteliales emiten señales con capacidad de atraer y activar leucocitos circulantes (monocitos, neutrófilos, etc) al sitio, aumentar el flujo sanguíneo, incrementar la permeabilidad capilar, etc [3].

Otra función de las células epiteliales es la de condicionar a las células dendríticas para que adquieran un fenotipo tolerante a través de la secreción de ciertas sustancias, como factor de crecimiento transformante beta (“transforming growth factor” o “TGF”- β), ácido retinoico e interleucinas. Recientemente se ha reportado que β -catenina en células dendríticas es necesaria para la adquisición de tolerancia inmunológica[11]. A su vez, la flora intestinal esculpe la respuesta inmunológica del intestino. Las células dendríticas intestinales sirven como centinelas y sondan la presencia de bacterias que llegan a la lámina propia a través de las células M que son células epiteliales intestinales modificadas, que residen en las placas de Peyer en el intestino delgado y son capaces de ingerir bacterias completas del lumen intestinal y transportarlas a una cúpula subepitelial donde esperan las células dendríticas. Las células dendríticas con el marcador de superficie CD103 pueden fagocitar los microorganismos, digerirlos y migrar a los ganglios mesentéricos donde presentan sus antígenos a los linfocitos T “vírgenes”. Las células dendríticas con CD103 y otros marcadores como CXCR1 también pueden capturar microorganismos directamente en el lumen intestinal a través de sus dendritas, las cuales son proyectadas entre las células epiteliales intestinales. Estas células dendríticas pueden presentar antígenos a las células T en la lámina



Introducción

propia del intestino. En el estado normal las células T vírgenes que entran en contacto con las células dendríticas CD103⁺ adquieren un fenotipo regulador o tolerante. Las células T reguladoras ayudan a mantener la tolerancia a la microbiota intestinal normal [12].

Las células dendríticas también desempeñan el papel de capturar microorganismos u otros agentes extraños al organismo por fagocitosis. Una vez ingeridos, estos pasan por un proceso de digestión intracelular, seguido de exportación de los péptidos a la membrana celular para ser presentado a células T. La presentación de antígeno puede ocurrir en los ganglios mesentéricos o en la lámina propia intestinal. Las células dendríticas tienen la capacidad de estimular células T vírgenes (“naive”) y células T de memoria. Adicionalmente, las células dendríticas pueden determinar la formación de diferentes tipos de células T efectoras, incluyendo Th1, Th2 y Th17. Las células T efectoras secretan citocinas que reclutan células inflamatorias adicionales (monocitos, neutrófilos, células NK etc.)[13]

El funcionamiento correcto de estos mecanismos inflamatorios o de tolerancia, le permiten al organismo la protección contra microorganismos infecciosos y antígenos provenientes de la dieta, la homeostasis de estos es crucial para mantener la salud del huésped. Cuando estos procesos se ven alterados pueden surgir enfermedades inflamatorias como las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) [2].

3.3 Enfermedades inflamatorias intestinales

Las EII incluyen principalmente dos patologías, la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerativa (CU). Estas se caracterizan por presentar un proceso de inflamación crónica en el intestino. La EC puede afectar cualquier parte del tracto digestivo, desde los labios hasta el margen anal, aunque con más frecuencia se localiza en el íleon distal y en el colon. En contraste, la CU afecta solamente el intestino grueso. Las lesiones en la EC se presentan en forma discontinua y profunda afectando todo el grosor de la mucosa La inflamación puede extenderse fuera de la pared intestinal y causar abscesos intra-abdominales o perianales y/o



Introducción

fístulas a vísceras vecinas, incluyendo asas intestinales, la vejiga urinaria, la vesicular biliar y en ocasiones el útero y la vagina. En la EC la inflamación crónica puede dar lugar a la formación de tejido fibroso y estenosis en áreas del intestino, produciendo obstrucción intestinal. En la CU la inflamación comienza en el recto y se puede extender en forma continua al resto del colon y el ano, las úlceras solo afectan la submucosa[14].

La etiología de las EII aún no es clara, aunque se han podido describir factores genéticos, inmunológicos y ambientales[10].

Se ha postulado que existe cierta predisposición genética relacionada con la inmunología de algunos individuos a desarrollar EII como respuestas inadecuadas frente a la microbiota comensal. En los últimos años se ha confirmado la presencia de polimorfismos en varios genes que participan en la respuesta inmune innata en pacientes que desarrollan EII. Uno de éstos corresponde a las variantes alélicas del receptor NOD²/CARD¹⁵, perteneciente a una superfamilia de genes localizados en el cromosoma 16, y que se expresa principalmente en monocitos, células dendríticas y en el epitelio intestinal. Los polimorfismos de NOD2/CARD15 asociados con mayor frecuencia a EII son: Arg702Trp, Gly908Arg y Leu1007fsinsC, relacionados tanto con el riesgo de desarrollar EC como con el fenotipo de la enfermedad. Estas mutaciones producen defectos en la actividad bactericida de los macrófagos, lo que conduce a infecciones intracelulares persistentes con estimulaciones crónicas de células T; provocando disrupción en la barrera epitelial, que lleva a una pérdida en el balance homeostático de células efectoras y reguladoras[14].

El polimorfismo Asp299Gly del TLR4 se ha vinculado con el desarrollo de las EII. El TLR4 reconoce LPS y promueve la activación de NFκB, el cual transloca al núcleo para regular la transcripción de genes. NFκB se expresa principalmente en macrófagos, dendríticas, células endoteliales y en menor proporción en células epiteliales intestinales. La aumentada expresión en el epitelio intestinal de TLR4, y en especial del alelo 299Gly, ha sido reportado en pacientes con CU [15].



Introducción

La microbiota intestinal juega un papel crucial en la patogenia de las EII, en experimentos realizados en modelos animales libres de patógenos estos son incapaces de desarrollar CU.

Distintos patógenos han sido asociados con el desarrollo de EII, tanto en pacientes como en modelos animales. En 1913, Dalziel describió la existencia de similitudes histopatológicas y clínicas entre EC y los cuadros observados en paratuberculosis animal y tuberculosis intestinal humana. La subespecie paratuberculosis del *Mycobacterium avium* ha sido propuesta como un agente causal de la CU (ref).

El desarrollo de gastroenteritis infecciosas, especialmente producidas por *Campylobacter* y *Salmonella*, ha sido estrechamente vinculado con el posterior desarrollo de EII. Además, pacientes pediátricos con EII mostraron un aumento de bacterias patógenas o una disminución en la cantidad de flora comensal en el intestino, concluyendo que la persistencia de bacterias patógenas en el intestino podría facilitar el desarrollo de EII [16].

En el siglo XX estas enfermedades eran consideradas raras, sin embargo, en la actualidad se ha reportado un incremento en las personas afectadas por estos padecimientos [10], la mayor incidencia y prevalencia se ha señalado en el norte de Europa, Reino Unido y Estados Unidos de América, siendo la CU la enfermedad más recurrente. Aunque recientemente se ha informado un aumento en la incidencia y prevalencia en otras partes del mundo, en América Latina existen pocos estudios sobre la epidemiología de la CU, no obstante se ha sugerido una menor incidencia. En el caso de México se ha registrado un ascenso en la última década con 76 pacientes diagnosticados por año, comparada con la década anterior con un promedio de 28 pacientes por año [17].

3.4 Colitis Ulcerativa

La colitis ulcerativa es una enfermedad inflamatoria intestinal, en la cual la inflamación se encuentra localizada exclusivamente en el colon y el daño se limita a la mucosa [15]. La sintomatología principal de esta patología: es la diarrea, acompañada de sangrado, inanición de los pacientes y fuerte dolor abdominal



Introducción

esto [8] provoca una disminución en su calidad de vida y aumenta el riesgo de presentar cáncer de colon [15]. Si la CU no recibe un tratamiento apropiado y oportuno, prácticamente el 100% de los individuos afectados desarrollará cáncer de colon [18]

En la CU la respuesta inmune intestinal es exagerada, tanto en la respuesta inmune innata como en la adaptativa [8]. En este padecimiento, el número de células caliciformes se ve drásticamente reducido, por lo que la secreción de mucinas es reducida, dando como resultado la deficiencia en la capa protectora de mucina, dejando expuesta la barrera epitelial a daños mecánicos y a la colonización por agentes patógenos. Esta permeabilidad de la mucosa puede jugar un papel importante en el mantenimiento de un estado inflamatorio crónico provocando una barrera epitelial defectuosa, pudiendo causar una pérdida de tolerancia a la flora normal.

Esta deficiencia en la barrera epitelial puede ser causada también por la pérdida de moléculas de adhesión celular, como el complejo proteico de E-cadherina/ β -catenina, como ya se mencionó anteriormente, este complejo es importante en la estructura y función de la barrera epitelial, permitiendo la fragmentación de la misma y posibilitando la infiltración en la mucosa por la microbiota presente en el intestino [19], desencadenando mecanismos efectores como el reclutamiento de macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y células NK. Subsecuente a esto, hay una sobreproducción de citocinas inflamatorias tales como el TNF- α , IFN- γ , IL-1- β , IL-17, IL-6, IL-8, e IL-12. Algunas de estas citocinas son cruciales en la inflamación en CU desencadenando efectos y funciones celulares a través de la señalización por la vía JAK/STAT en la cual participan las janus cinasas (JAK) y los transductores de señal y activadores de moléculas de transcripción (STAT) [2] (Figura 1). De esta manera, la señalización controla eventos importantes como la diferenciación celular, la secreción de citocinas o la proliferación y la apoptosis en las células inmunes adaptativas e innatas [8].

Introducción

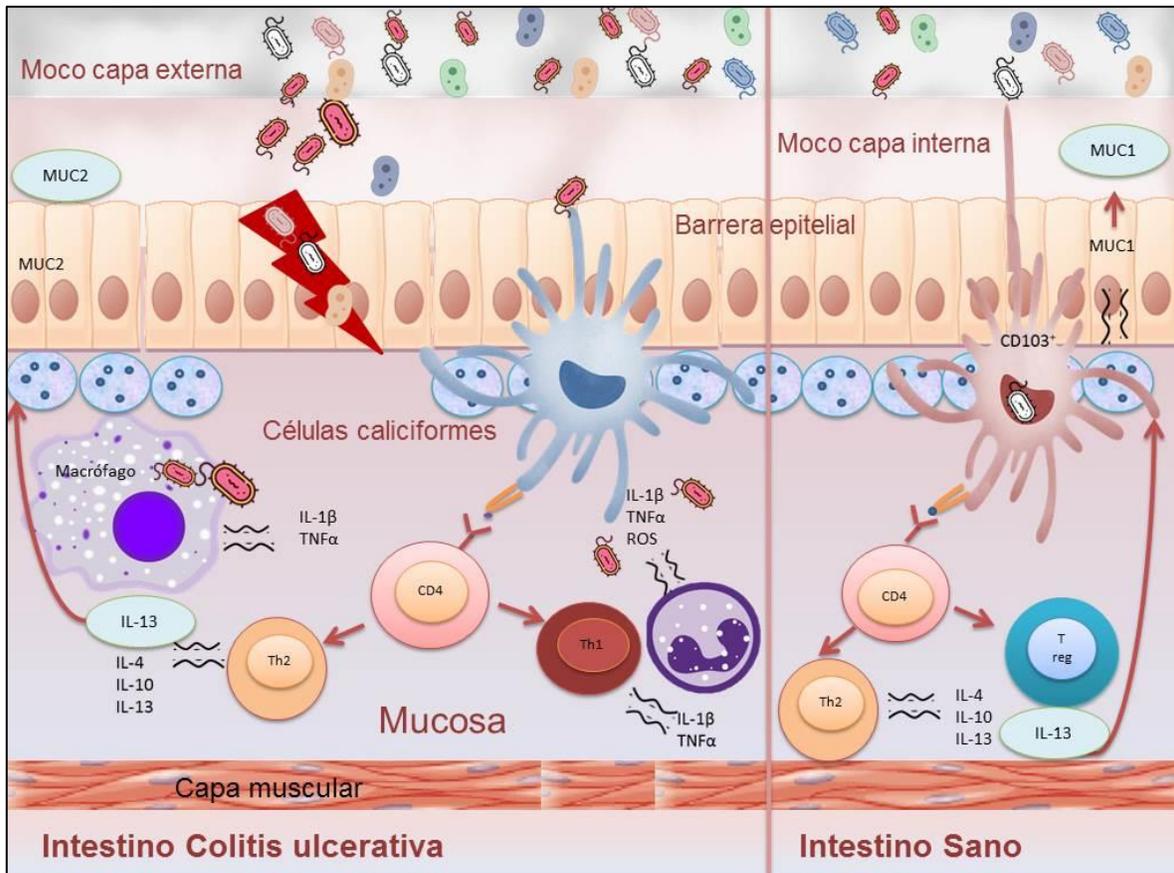


Figura 1. Representación esquemática de la respuesta inmune intestinal en estado patológico (CU) donde se puede apreciar la invasión de bacterias patógenas en la capa interna de moco lo que provoca la colonización y disrupción de la barrera epitelial, permitiéndoles la entrada a la mucosa intestinal, montando una respuesta inflamatoria caracterizada por la producción de citocinas como TNF- α , IL-1 β , la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) etc. Al igual que la presentación de antígenos a linfocitos CD4 y la diferenciación de estos a efectores como TH1 y TH2. En contra parte se puede observar la esquematización del intestino sano, en donde las células dendríticas con fenotipo tolerante actúan induciendo la diferenciación de linfocitos CD4 a células T reguladoras que mantiene la homeostasis intestinal.

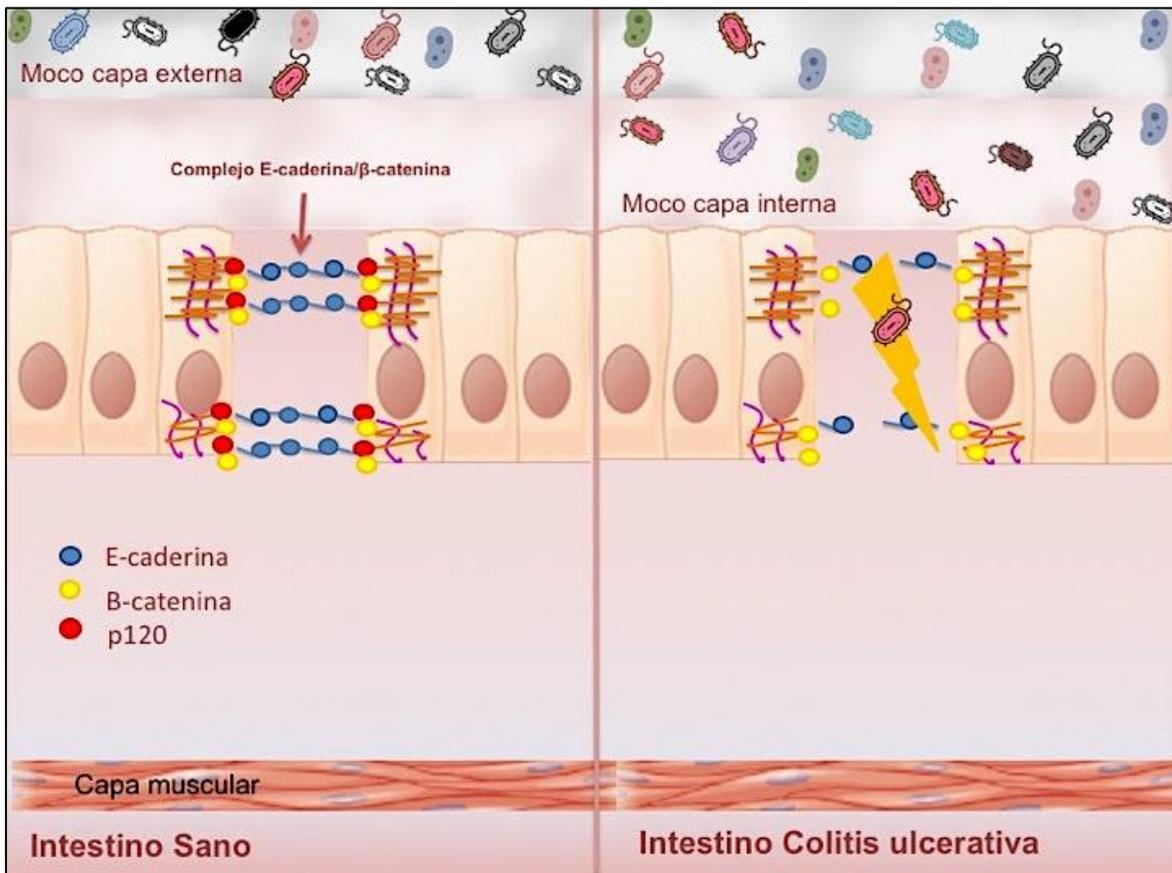


Figura 2. Representación esquemática del complejo E-cadherina/ β -catenina, en un intestino sano y en uno con colitis ulcerativa.

3.5 Vía JAK/STAT

La vía JAK/STAT fue originalmente descubierta en 1990 por Darnell y Stark a través del estudio de la transducción de señales intracelulares inducidas por interferón [21].

Las familias JAK/STAT son dos grupos de proteínas que, constituyen diversas vías de señalización implicadas en la respuesta celular a citocinas. Los miembros de la familia STAT actúan como factores transcripcionales, activados río arriba por las proteínas JAK que a su vez se activan en respuesta a una citocina extracelular cuando ésta se une a su receptor específico. La familia STAT está compuesta por siete proteínas (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6), mientras que la familia JAK está compuesta por cuatro proteínas (JAK1,



Introducción

JAK2, JAK3 y TyK2). Estos dos grandes grupos de moléculas representan una vía de señalización que puede activarse rápidamente desde la membrana celular hasta el núcleo [20]. La activación de esta vía es mediada a través de fosforilaciones principalmente en los residuos de tirosina tanto en las proteínas JAKs Como STATs.

Las proteínas JAK son moléculas estructuralmente compuestas de siete regiones (JH1-JH7). El dominio JH1 tiene la actividad cinasa, mientras que JH2 es homóloga a JH1, pero sin los residuos necesarios para la actividad cinasa (dominio pseudocinasa), por lo que este dominio se asocia generalmente con funciones reguladoras[21].

Las proteínas JAK interactúan con diferentes dominios intracelulares de receptores de citocinas y están presentes en una variedad de subtipos celulares. Aunque las JAKs participan en múltiples vías de señalización, son de gran importancia en la modulación de la respuesta inmune[20].

La familia de las STATs está compuesta por siete miembros, estos se encuentran de manera constitutiva en el citoplasma celular, en forma inactiva, su activación requiere de la fosforilación de las proteínas JAK, para que a su vez se fosforilen y puedan formar homodímeros o heterodímeros y traslocarse al núcleo celular. El dominio SH2 (residuos 580-680) de las STATs juega un papel importante en la señalización de la vía ya que participa en el reclutamiento de las STATs al receptor de citocina a través del reconocimiento de fosfotirosinas específicas, asociación con las JAKs activadas y también para la homo o heterodimerización de las STATs[22].

La vía se inicia mediante la unión de una citocina extracelular a su receptor transmembranal, induciendo la dimerización de sus subunidades y asociándolas con las tirosinas cinasas JAK, esto además de unir a las JAK al receptor, produce la autofosforilación en la asociación de las JAK posteriormente se fosforila el residuo de tirosina intracelular de receptores de citocinas creando un sitio de acoplamiento para las STATs citoplásmicas. Mientras que las proteínas STAT están unidas al receptor de citocinas, las proteínas JAK las fosforilan en un



Introducción

residuo de tirosina, separando la proteína STAT del receptor de citocina de modo que las STAT forman homo- y heterodímeros que se trasladarán al núcleo. Donde reconocen y se unen a secuencias de ADN (ácido desoxirribonucleico) específicas de genes blanco, e inducen o reprimen la transcripción de genes según el requerimiento celular [23] (Figura 3).

Se ha demostrado que esta vía tiene participación en procesos del sistema inmune (innato y adaptativo) y que la desregulación o las mutación en los genes de la cascada de señalización se asocian con diferentes padecimientos como anemia, alergias, susceptibilidad a infecciones parasitarias, virales y bacterianas, diferentes tipos de cáncer (pulmón, mama, ovario etc.) En las EII como la CU, la alteración de esta vía se ha asociado como una de las principales causas del desarrollo de esta patología. En particular, tiene un papel clave en el desequilibrio entre los tipos de células T efectoras (Th1) y reguladoras (Th2), así como la funcionalidad de células epiteliales del intestino y el reclutamiento de células mieloides [22].

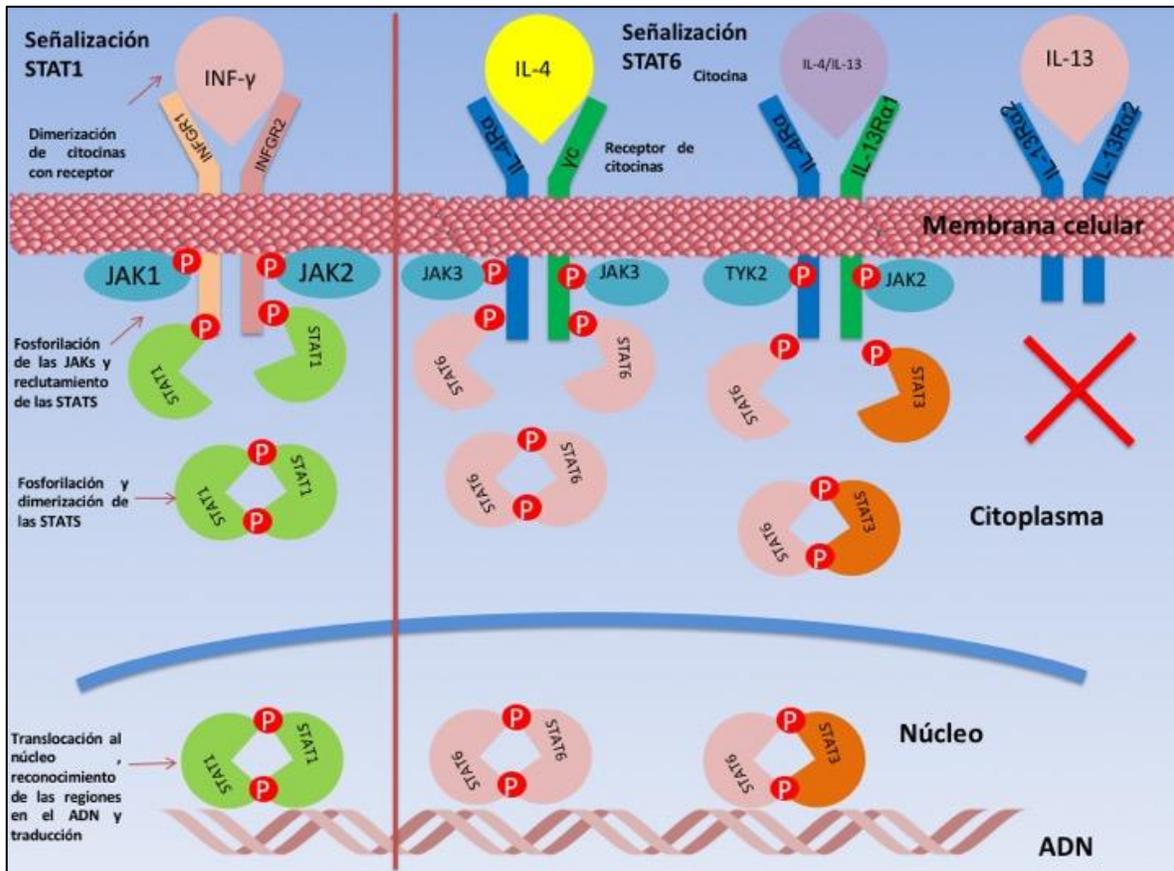


Figura 3. Figura 3. Señalización celular mediante la vía JAK/STAT. Esta vía se inicia mediante la unión de una citocina en este caso IFN- γ , IL-4 o IL-13 a su ligando induciendo la dimerización de las subunidades del receptor transmembrana, uniéndolo y a su vez fosforilando a las proteínas JAK posteriormente se fosforila el residuo de tirosina intracelular de receptores de citocinas creando un sitio de acoplamiento para las STATs como STAT1 y STAT6 citoplasmáticas. Mientras que las proteínas STAT están unidas al receptor de citocinas, las proteínas JAK las fosforilan en un residuo de tirosina, separando la proteína STAT del receptor de citocina de modo que las STAT forman homo y heterodímeros, STAT1 puede unirse a STAT4 mientras que STAT6 puede formar heterodímeros con STAT3 estos se traslocan al núcleo. Allí reconocen y se unen a secuencias de ADN específicas de genes blanco. Aunque existen excepciones como el receptor de IL-13 ya que sus dominios citoplasmáticos no son lo suficientemente largos para señalizar.

3.6 Participación de la vía JAK/STAT en el desarrollo de la Colitis Ulcerativa

Las respuestas inflamatorias mediadas por células T efectoras, se han dividido en T helper 1 (Th1), Th2, y Th17 definidas por ciertos patrones de



Introducción

producción de citocinas. En la CU la vía JAK / STAT interfiere con numerosas vías inflamatorias que se caracterizan por linfocitos T efectores, las cuales tienen una respuesta desequilibrada. Existen múltiples reportes donde se dice que la CU es mediada principalmente por una respuesta de tipo Th1, no obstante, a lo largo de los años se ha visto una mayor asociación en la inflamación de la CU a una repuesta de tipo TH2 , aunque aún no hay un panorama claro [24].

3.6.1 STAT1

La señalización de la proteína STAT1 es iniciada por la unión de IFN- γ y es fosforilada por JAK1, JAK2 y TYK2, tiene una gran relevancia en la señalización de IFN- γ , este es un efector importante de citocinas que participan en la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ a Th1, estos participan en hipersensibilidad crónica asociada a las patologías inflamatorias como CU[25]. Esta proteína también participa en procesos apoptóticos participando en la síntesis de caspasa 1 y 11, también es responsable de la transcripción de genes que participan en la regeneración de tejido mediante la síntesis de colágena [26].

Existe gran controversia del papel que juega STAT1 en el desarrollo de la CU, por ejemplo en humanos se ha visto que STAT1 se incrementa en pacientes con CU al igual que el IFN- γ y otras citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-17 [26]. Por otro lado, en pacientes en proceso de remisión se ha visto mayor fosforilación de STAT1 y niveles basales de citocinas pro-inflamatorias, otro estudio realizado en ratones donde se inhibió a STAT1 mediante el supresor de la señalización de citocinas 1 (SOCS1) se encontró que STAT1 resulta esencial para activar la función supresora de las células T reguladoras, al inhibir la síntesis de IFN- γ disminuyendo así la inflamación [27].

3.6.2 STAT6

La Fosforilación de STAT6 se da a través de JAK1 y JAK3 esta vía es iniciada cuando la IL-4 o la IL-13 se unen a su receptor el cual está compuesto por dos subunidades IL-4R y IL-13R. Además de GATA3, STAT6 es el factor de



Introducción

transcripción más importante que determina la diferenciación de los linfocitos T CD4+ en linfocitos Th2. Estos linfocitos secretan IL-4, IL-13 que participan en la inmunidad induciendo una vía alternativa de activación de macrófagos e inhiben la activación clásica mediada por Th1, también participan en la respuesta frente a citocinas de la respuesta inflamatoria. La desregulación del linaje de linfocitos Th2 y de la respuesta mediada por IL-4 e IL-13 han sido asociadas fuertemente a la patología de la CU. Pero al igual que STAT1 el papel de STAT6 aún no es claro en la modulación de la enfermedad [22].

Distintos estudios han analizado el papel de esta molécula en la enfermedad encontrando resultados muy diversos tanto en investigaciones realizadas con humanos como en modelos murinos, por ejemplo en un estudio realizado con 50 pacientes con CU encontraron una asociación de la región del IBD2 (cromosoma 12), a la CU, y relacionaron a STAT6 como un gen candidato al estar situado en esa región[28]. Por otro lado, en un modelo experimental de colitis con oxazolona se reportó que los procesos de remisión que caracterizan la patología de CU eran totalmente dependientes de la activación de STAT6 por la IL-13 así esta citocina actúa como interruptor para la resolución de la inflamación [29]. Otros estudios con ratones demostraron que al administrar un anticuerpo monoclonal anti-IL-4 en ratones doble knockout para STAT6 y para el receptor α de células T impedía la formación de la colitis, lo que indica que las células diferenciadas en el fenotipo Th2 tienen la capacidad de mediar el desarrollo de la colitis en ausencia de la activación de STAT6 por IL-4. Por el contrario experimentos realizados con ratones knockout para STAT6 presentaban un alto nivel sérico de IFN- γ y un mayor índice de la enfermedad que los ratones silvestres [30].

Debido a esto resulta de vital importancia conocer el papel de estas moléculas en la enfermedad, una herramienta clave para determinar esto, son los modelos de inducción de colitis en ratones, uno de ellos es el DSS.



3.7 Modelo de colitis experimental por DSS

Los modelos animales de inflamación intestinal son indispensables para nuestra comprensión de la patogénesis de la EC y la colitis ulcerativa, uno de los modelos que más se asemeja a la colitis ulcerativa es el de DSS[31].

En modelos animales, la administración oral de DSS durante un período relativamente corto (7 a 9 días) provoca colitis, con características similares a los daños clínicos e histopatológicos que se observan en la colitis ulcerativa. La cual se caracteriza por la aparición de sangrado, diarrea, pérdida de peso, ulceraciones en el colon e infiltrado celular[32].

El DSS es un polímero de polisacáridos sulfatados, que induce daño hiperosmótico directo a las células epiteliales del intestino de las criptas basales y, por lo tanto, afecta la integridad de la barrera de la mucosa.

Este modelo ha sido ampliamente utilizado en ratones deficientes en diversas moléculas para evaluar distintos blancos terapéuticos que pudieran influir positivamente en el desarrollo de la enfermedad [31].



4 .Justificación

Debido al incremento en los últimos años en el número de casos de pacientes con CU y con esto un aumento en el cáncer de colon asociados a colitis. Este estudio se enfocó en analizar la implicación de las moléculas STAT1 y STAT6 en la modulación de la CU, su papel ha sido estudiado en diversos modelos de colitis, sin embargo. el papel que juegan en el desarrollo de la enfermedad aun no es claro, por lo que resulta de vital importancia estudiarlos para así entender mejor su papel en la enfermedad y poder sugerir nuevos blancos terapéuticos.



5 .Hipótesis

La ausencia de los factores de transcripción STAT1 y STAT6, influirá directamente en el desarrollo de la colitis ulcerativa inducida por DSS al modificar las respuestas Th1 y Th2, respectivamente.



6 .Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar el papel de las moléculas STAT1, IL-4 α R y STAT6 en el desarrollo y severidad de la colitis ulcerativa utilizando ratones con deficiencias genéticas en dichas moléculas.

6.2 Objetivos particulares

- Valorar el índice de actividad de la enfermedad durante la inducción de la CU.
- Determinar la presencia de células caliciformes e infiltrado celular en colon por medio de histología.
- Evaluar el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en el colon por citometría de flujo.
- Determinar mediante RT-PCR la expresión del gen MUC2.
- Analizar la expresión de la IL-13 en colon.
- Valorar mediante inmunohistoquímica la expresión del complejo molecular de adhesión como E-cadherina/ β -catenina.



7 .Materiales y métodos

7.1 Material Biológico de Referencia

Se utilizaron ratones hembras, de la cepa BALB/c (WT), y ratones genéticamente deficientes en STAT1^{-/-}, STAT6^{-/-} e IL-4 α R^{-/-} de 8 a 9 semanas de edad, proporcionados por el Bioterio de la Facultad de estudios Superiores Iztacala, UNAM. Donde se mantuvieron en condiciones libres de patógenos durante el tiempo requerido hasta su sacrificio.

Los individuos se dividieron en dos grupos experimentales: Control (agua estéril) y Dextran Sulfato de Sodio (administración con DSS al 4%),

7.2 Inducción de la colitis experimental

La inducción de la colitis experimental se realizó por medio del compuesto químico Dextran Sulfato de Sodio (DSS, P.M.40000, Alfa Aesar, Canadá), colocándolo al 4% en los bebederos con agua estéril, durante un periodo de 8 días.

7.3 Evaluación del modelo de colitis experimental

Para determinar la severidad de la CU, se registró diariamente el peso de cada uno de los ratones de los diferentes grupos y el índice de actividad de la enfermedad, (IAE) donde se tomó en cuenta los siguientes criterios: falta de consistencia en heces, diarrea, rastro de sangre en heces, sangrado rectal y la apariencia de la mucosa (siendo 0 ausente o normal y 4 el valor máximo del IAE), después del sacrificio se les extrajo el colon, registrando tanto la longitud del ciego intestinal como la del colon , finalmente se realizaron cortes histológicos de la porción distal.



7.4 Análisis histológico

El colon y ciego intestinal fueron lavados con solución salina estéril (PISA) y se cortaron porciones distales de aproximadamente 0.5 cm., la primer porción se mantuvo en etanol a 4°C durante 7 días. Una vez transcurrido el tiempo, los tejidos se colocaron en casetes de inclusión y se siguió un tren de inclusión, utilizando etanol absoluto 1, 2 y 3 dejando los tejido 1 hora en cada uno de estos, posteriormente se pasaron a xilol 1, 2 y 3, dejándolos 1 hora en cada uno, finalmente se pasaron por parafina 1, 2, y 3 manteniéndolos durante 1 hora en cada una de las parafinas, conservando la temperatura a 56°C, después de pasar por el tren de inclusión, los tejidos se incluyeron en una consola de inclusión (Lupetec, Brasil.) y se realizaron cortes histológicos de 4µm de grosor con ayuda del micrótopo (Leica, Alemania), las cuales se montaron en laminillas previamente tratadas con poly-L-lisina (Sigma,EUA). Para la extensión del tejido, se utilizó un baño de flotación (Gesellschaft fur Labortechnik, Aleman) manteniendo la temperatura a 56°C.

Para quitar el exceso de parafina, las laminillas se incubaran a 58°C durante 1hora.

Se realizó la tinción Hematoxilina-Eosina (H&E) (Sigma, EUA) con la cual se determinó la arquitectura del colon, para poder observar el infiltrado celular, el grosor de la lámina propia, la estructura de las criptas, las vellosidades y microvellosidades, también se llevó a cabo una tinción de Alcian Blue(Sigma, EUA) para determinar la presencia de células caliciformes.

Las laminillas se montaron con Entellan (J. T.Baker, Mexico) y se observaron en el microscopio óptico (Zeiss, Alemania), utilizando el programa AxioVisionRel 4.6n (Zeiss, Alemania) y las fotos se tomaron con cámara AxioCam ICc3 (Zeiss, Alemania) con objetivos 20x.



7.5 Inmunohistoquímica en colon

Para evaluar la expresión de las moléculas de adhesión, beta (β) Catenina (proteína asociada a caderina), 88 kDa de (GeneTex, EUA) y E-Cadherina (Cell signalig,EUA) en el colon, se realizó la técnica de inmunohistoquímica. Las laminillas se desparafinaron cuidando que la temperatura no rebasara los 60°C, las muestras se rehidrataron pasando por Xilol (M.P.Biomedicals, Francia), etanol (Fermont, México) y agua destilada. Posteriormente se realizó la recuperación antigénica poniendo los tejidos en buffer citratos (DIVA 1:10 Biocare, México) y colocándolos en una olla de presión (Oster, EUA) durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo los tejidos se lavaron con PBS-Tween, las laminillas fueron marcadas con Pap pen (Sigma, EUA) y se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno al 3% (J.T. Baker, México) en Metanol (Meyer, México). Se lavaron con PBS-T. Para evitar el pegado inespecífico del anticuerpo se bloquearon con PBS-BSA al 2% (Equitech, EUA) durante 1 hora a temperatura ambiente, el bloqueo fue lavado con PBS-T y se colocaron los anticuerpos primarios E- cadherina y Beta catenina en una dilución 1-300, en PBS-BSA al 1%, agregando 150 μ l por laminilla y se incubo toda la noche a 4°C. Posteriormente las laminillas se lavaron con PBS-T y se agregó el anticuerpo secundario en una dilución 1-500 en PBS-BSA al 1% incubando 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS-T y se revelaron con diaminobencidina durante 5 minutos, cuando la marca positiva fue evidente se detuvo la reacción con PBS-T y se realizó una contra tinción con Hematoxilina de Harris, para hacer viral el color de la Hematoxilina se colocaron las laminillas en agua amoniacal al 3% y se detuvo la reacción con agua destilada, se realizó un tren de deshidratación, las laminillas se montaron con Entellan, se observaron en el microscopio óptico (Zeiss), utilizando el programa AxioVisionRel 4.6n (Zeiss) y las fotos se tomaron con cámara AxioCam ICc3 (Zeiss) con objetivos 20x.



7.6 Cuantificación de citocinas de sobrenadante de cultivo de colon (ELISA)

La tercera porción del intestino se cultivó en placas de 24 pozos estériles marca (Sarstedt, México) tomando el segmento del colon y abriéndolo longitudinalmente, lavándolo 5 veces con 500µl de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS), sin calcio, ni magnesio y adicionada con glucosa y rojo de fenol, de (Thermo Fisher scientific, EUA) complementada con antibiótico (penicilina 1x y estreptomycin 2x ,(Corning, EUA), después se cultivaron con 300 µl medio RPMI 1640 (biowest, México) (adicionado con L- glutamina, penicilina 1x, estreptomycin 1x, suero bovino fetal (SBF) (biowest, México) 1 % y piruvato (Corning, EUA)) se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ (Thermo Fisher scientific, EUA) por 24 horas. Posterior a eso se recuperó el sobrenadante y se mantuvo a -20°C.

7.7 ELISA

La medición de citocinas de sobrenadantes obtenidos de cultivo de colon, se analizó por la técnica de ELISA sándwich. Se detectó IL-13. Se emplearon placas de 96 pozos MaxiSorp (Thermo Fisher scientific, EUA), las cuales se sensibilizaron con 50 µl de anticuerpo (Ab) (PeproTech, EUA) de captura correspondiente diluido en PBS a una concentración de 2µg/ml, se incubaron toda la noche a 4°C. Trascurrido el tiempo se realizaron 4 lavados con PBS tween 20x (PBS-T) al 0.05%, después de los lavados se colocó 100µl de una solución de BSA al 1% en PBS por dos horas. Posteriormente se realizaron tres lavados y se colocó 100µl de los estándares y las muestras de sobrenadante. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Se procedió a lavar las placas con PBS-T y se agregó 100µl de Ab secundario biotinilado y se incubó 1 hora a temperatura ambiente, se realizó 4 lavados y el anticuerpo secundario se detectó con el sustrato de estreptavidina 1:4000 en una solución de BSA al 1%, añadiendo 100µl por pozo. La intensidad del color generado se analizó mediante el equipo de lector de elisas Multiskan Ascent (Thermo Fisher scientific, EUA) a 404 nm.

Para obtener las concentraciones de la citocinas se realizó una curva patrón de los valores de densidad óptica (DO), obtenidos mediante la curva estándar.



7.8 Citometría de flujo (FACS)

Una vez obtenida la porción de intestino para histología, RNA (ácido ribonucleico) y cultivo, se utilizó el resto del intestino para la obtención de células de lámina propia, para lo cual se utilizó la enzima Colagenasa D de *Clostridium histolyticum* Clostridiopeptidasa liofilizada (Roche, Alemania). Primero se abrió longitudinalmente el intestino y se lavó con HBSS + Antibiótico frío para retirar restos de materia fecal del intestino, se realizaron 5 lavados manteniéndolo en agitación durante 2 minutos. Posteriormente se lavó con HBSS + EDTA 2mM (J. T.Baker, Mexico) + 2% SBF + Antibiótico, para retirar la mayor parte de la mucosa intestinal y se incubó a 37° en agitación a 250 revoluciones por minuto (rpm). Para retirar el exceso de EDTA se lavaron con HBSS + 2% SBF + antibiótico 1x. Con ayuda de una navaja de bisturí se cortó el colon en pedazos no mayores a 2mm. El intestino se puso a digerir en medio RPMI 1640 + 10% SBF + 40µl/ml de desoxiribonucleasa I de páncreas de bovino (DNAasa I) (Sigma, EUA) + antibiótico + 0.5mg/ml de Colagenasa D +antibiótico 1x manteniéndolas en agitación a 250rpm a una temperatura de 37°C por 30 minutos. Posteriormente se pasaron las células por un filtro de 100µm y después por uno 40µm (BD. Falcon, EUA) para retirar restos de tejido, las muestras se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos. Para quitar todos los restos de colagenasa, las células fueron lavadas con medio RPMI completo (Antibiótico + 2% SBF) por 10 minutos a 15000 rpm y se resuspendieron en 5ml de medio de cultivo completo; las células fueron separadas mediante un gradiente de percoll 30% y 70%(GE Healthcare, EUA) con una densidad de 1.130g/ml formando dos fases y centrifugando (centrifuga HERMLE, Alemania) a 2000 rpm durante 30minutos sin freno. Por último se recuperó la fase entre los dos percolles y fueron lavadas 2 veces con Buffer de FACS (PBS+0.5% de SBF +0.1% de acida de sodio (AMRESCO, EUA)).

Una vez finalizada la extracción de células de lámina propia se colocaron en tubos de FACS para citometría (Sarstedt, México) se centrifugaron y resuspendieron en 50µl de Buffer de FACS con 0.5µl de antiCD16/32 y se incubaron por 30 minutos a 4°C. Posteriormente se realizó la tinción de citometria



Materiales y Métodos

utilizando anticuerpos acoplados con un flourocromo (Cuadro1.) diluidos en 25 μ l de buffer de FACS por muestra. Se centrifugaron y se lavaron 2 veces con Buffer de FACS y se fijaron con paraformaldehído al 2%(Sigma,EUA). Las muestras fueron procedas en el citómetro FACs Aria Fusion (BD Biosciences, EUA) y se capturaron 10,000 eventos por muestra. Los datos se analizaron mediante el programa Flowjo Software2.4.0.

Anticuerpo	Flourocromo	Concentración mg/ml	Catalogo	Marca
CD11b	APC/Cy7	0.2	101226	Biolegend
Ly6G	BV 711	0.2	127643	Biolegend
Ly6C	FITC	0.5	128006	Biolegend
F4/80	APC	0.2	123116	Biolegend
PDL1	PE	0.2	558091	BD
PDL2	PE	0.2	107206	Biolegend
CD16/32	****	0.5	70-0161-u500	Tonbo

Cuadro1. Anticuerpos para citometría de células de lámina propia.

7.9 RT-PCR

La segunda porción obtenida del colon de aproximadamente 0.5 cm se utilizó para realizar ensayos de RT-PCR, las muestras se maceraron con nitrógeno líquido y se mantuvieron en 1 ml de trizol (Invitrogen, EUA) A -70°C. El RNA total se obtuvo con el método de Fenol-cloroformo se hidrato en 20 μ l de agua inyectable y se cuantifico en el espectrofotómetro (Epoch 2 Biotek, EUA) utilizando una dilución 1:100. Una vez obtenida la cuantificación el RNA se convirtió a cDNA utilizando el RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kituna K1621 de (Thermo Fisher scientific, EUA). El cDNA se cuantifico, después se realizaron los cálculos para cargar 1 μ g de cDNA y se realizaron los ensayos de PCR para la identificación de los siguientes gen: Mucina: Muc2. Para llevar acabo



Materiales y Métodos

los ensayos se utilizó el termociclador Corbett Research y las siguientes concentraciones (Cuadro 2).

Mezcla de Reacción	μl
Buffer 10x	2.5 μl
MgCl 20x	1.25 μl
dNTP mix 10mM	1 μl
Primer F 50pM	1 μl
Primer R 50pM	1 μl
Taq Polimerasa 5U/ μl	0.3 μl

Cuadro2. Mezcla de reacción para PCR, a cada muestra se le agregó los μl de cDNA según la cuantificación en espectrofotómetro. La mezcla tuvo un volumen final de 23 μl .

A cada mezcla se le agregó 1mg según los datos obtenidos en la cuantificación, y se llevaron a un volumen final de 25 μl con agua inyectable.

7.10 Electroforesis

Para observar los productos de los ensayos de RT-PCR se realizaron electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en Buffer TBE 1X y Bromuro de etidio (Amresco, EUA) en una cámara molde. Una vez que gelifico, se agregó 1 μl de amortiguador de carga juice 1x (Invitrogen, EUA) y se colocaron 10 μl de la dilución a partir del segundo pozo, para poder determinar el tamaño del producto de PCR se colocó en el primer carril marcador de peso molecular de 100pb (Cleaver, EUA). Las muestras se corrieron durante a 1 hora a 100 volts, finalmente se observaron en un transiluminador con luz UV y las imágenes se capturaron con el programa BioSens SC 645.

7.11 Análisis de Datos

El análisis de datos se llevó a cabo mediante la prueba de ANOVA ($\alpha=0.05$) para determinar las diferencias significativas, posteriormente se realizó la prueba



Materiales y Métodos

de Tukey para comprobar las diferencias significativas entre los grupos. Este análisis se realizó mediante el programa Graph pad.



8 .Resultados

8.1 Porcentaje de pérdida de peso

La pérdida o ganancia de peso, se registró diariamente en las cuatro diferentes grupos (BALB/c, STAT6,^{-/-} STAT1^{-/-} y IL-4αR^{-/-}). Durante los 8 días de inducción de la colitis, se obtuvo, el porcentaje de pérdida o ganancia de peso. En la figura 4 se observa que a partir del cuarto día los ratones BALB/c comenzaron a perder peso de manera gradual. A diferencia de las tres grupos KO restantes, donde la pérdida de peso fue muy similar. Hacia el final de la exposición a DSS los animales silvestres (BALB/c) tuvieron una pérdida de peso significativamente mayor con respecto a los animales STAT1, STAT6 e IL-4Ra KO's (Fig. 4).

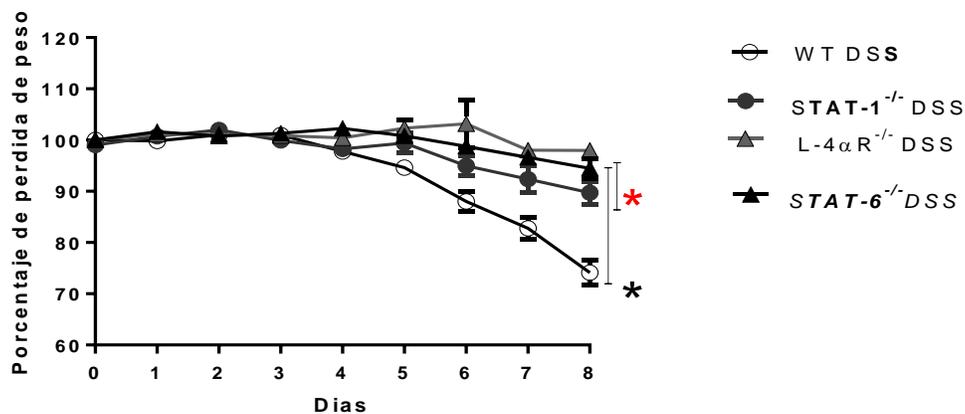


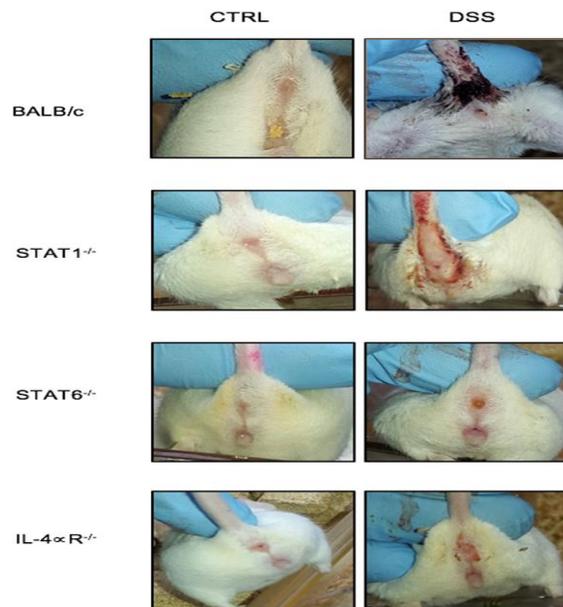
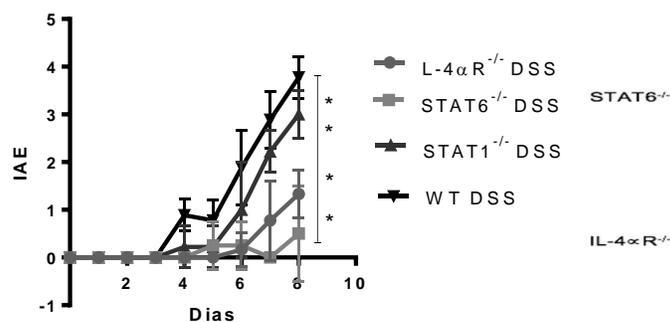
Figura 4. Porcentajes de pérdida de peso por Análisis estadístico de ANOVA, y Tukey para determinar las diferencias significativas entre los cuatro grupos (Balb/c, STAT6,^{-/-} STAT1^{-/-} y IL-4αR^{-/-}). Los datos obtenidos corresponden a 6 animales de cada grupo. Datos de 2 experimentos independientes. Los valores se consideraron significativos cuando la $p < 0.05^{**}$, $p < 0.01^{***}$, $p < 0.001^{****}$. La pérdida de peso fue registrada diariamente durante 8 días.

8.2 Evaluación del índice de actividad de la enfermedad (IAE)

El IAE es un factor importante para determinar la severidad de la enfermedad, este se determinó en base a los siguientes parámetros: sangre, diarrea, y muco, dándole un valor del 0 a 4 con respecto a la severidad, siendo 0 ausente o normal, 1 moderado, 2 más abundante, 3 abundante y 4, el valor máximo del índice.

En la figura 5 se muestra el avance de la enfermedad a lo largo de los días de la inducción de la colitis, observando que el grupo BALB/c tuvo el mayor índice (IAE de 4), seguido de STAT1^{-/-} (IAE de 3) después IL-4αR^{-/-} (IAE de 2) y por último los ratones STAT6^{-/-} (IAE de 1) con el menor índice. De esta forma se aprecia que la ausencia de una respuesta tipo Th2 se asocia a un menor índice de la enfermedad.

A)



B)

Figura 5. A) Índice de la actividad de la enfermedad entre los distintos grupos (BALB/c, STAT1^{-/-}, IL-4αR^{-/-} y STAT6^{-/-}) a lo largo de los 8 días de inducción de la colitis. Mostrando que las cepas con mayor IAE fueron BALB/c y STAT1^{-/-} y los grupos menos afectados fueron IL-4αR^{-/-} y STAT6^{-/-}. B) Foto del daño en el recto en el último día de la inducción de la enfermedad entre los cuatro distintos grupos (Balb/c, STAT6^{-/-}, STAT1^{-/-} y IL-4αR^{-/-}) con respecto a sus controles. Datos

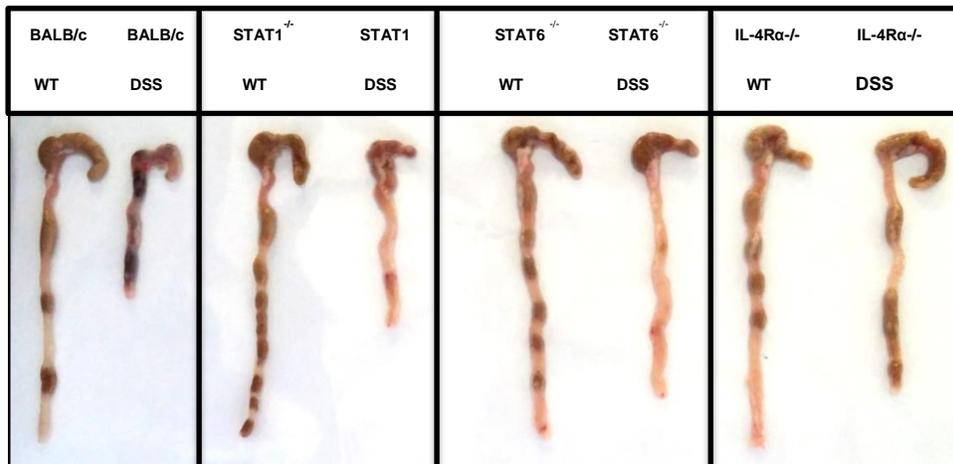
Análisis de resultados

de 2 experimentos independientes. Los valores se consideraron significativos cuando la $p < 0.05^{**}$, $p < 0.01^{***}$, $p < 0.001^{****}$ por ANOVA y post-test Tukey.

8.3 Longitud del colon

La longitud del colon fue tomada en el momento del sacrificio. En la figura 6 se puede observar, que en todos los grupos, a los ratones que se les administró DSS, la longitud del colon se redujo con respecto a la de sus respectivos controles. Los ratones BALB/c que recibieron DSS mostraron una reducción más drástica en la longitud del colon, seguidos del grupo $STAT1^{-/-}$ y por último $STAT6^{-/-}$ e $IL-4\alpha R^{-/-}$ mostraron una ligera reducción. Al comparar la longitud del colon en animales silvestres recibiendo DSS y los $STAT6^{-/-}$ e $IL-4\alpha R^{-/-}$ se observó que la ausencia de $STAT6$ e $IL-4\alpha R$ evitó de manera significativa el acortamiento del colon, sugiriendo un papel importante de éstas moléculas en la colitis (Fig 6B).

A)



Análisis de resultados

B)

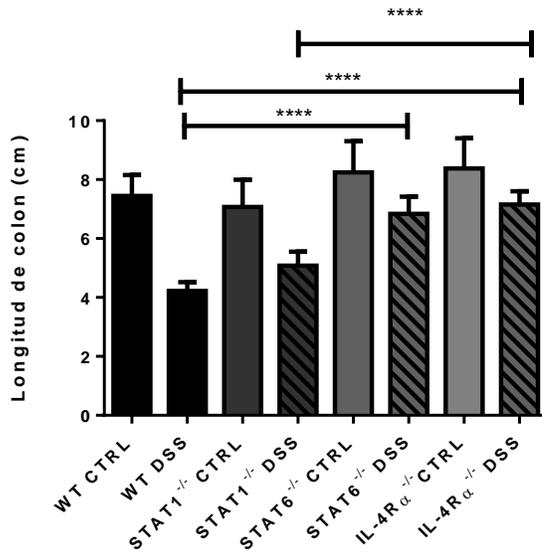


Figura 6. A) Colon y ciego de los ratones con tratamiento de DSS y los controles de los distintos grupos (BALB/c, STAT1^{-/-}, IL-4 α R^{-/-} y STAT6^{-/-}) **B)** Se muestran las diferencias significativas entre los cuatro grupos, con respecto a sus controles y entre los distintos grupos. Datos de 2 experimentos independientes. Los valores se consideraron significativos cuando $p < 0.05^{**}$, $p < 0.01^{***}$, $p < 0.001^{****}$ ANOVA y post-test Tukey.

8.4 Análisis histológico de HE

Para determinar el daño a nivel histológico se obtuvieron cortes transversales de la porción distal del intestino y se realizó una tinción de HE. En la figura 7 se puede observar que tanto los ratones BALB/c como los STAT1^{-/-} a los cuales se les administró DSS presentaron pérdida o fragmentación de la barrera epitelial, alteración de la conformación original del colon (pérdida de criptas, vellosidades, etc.) también mostraron infiltración celular considerable, con respecto a los controles. Por el contrario, se puede observar que los ratones deficientes tanto para STAT6 como IL-4 α R el daño histológico fue menor ya que se conservó la estructura original del colon, la integridad de la barrera epitelial y el infiltrado inflamatorio fue mucho menor.

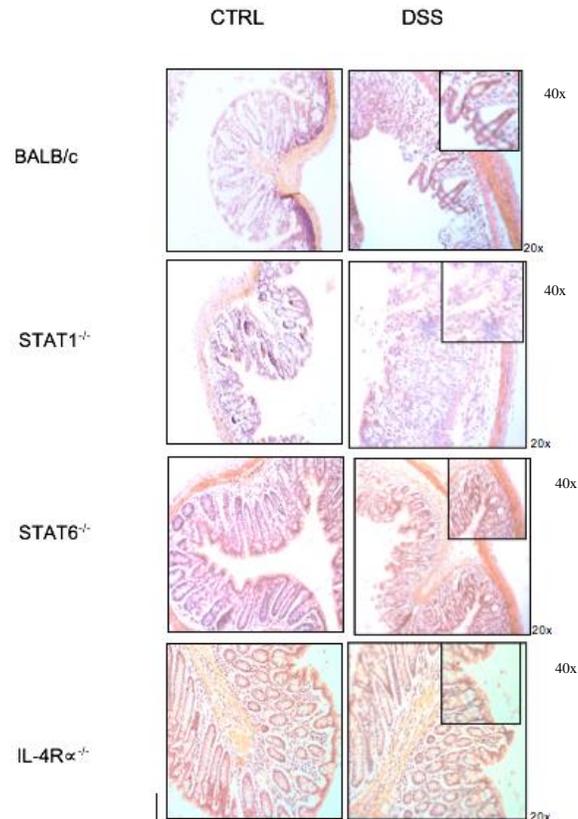


Figura 7. Histología del colon. Tinción de HE (20x) se puede observar que los grupos más dañados son los BALB/c seguidos por los ratones deficientes para STAT1 presentando mayor infiltrado inflamatorio, pérdida o fragmentación de la barrera epitelial y mayores alteraciones en la estructura original del colon, tanto STAT6^{-/-} e IL-4R α ^{-/-} conservan su conformación original, presentan menor infiltrado inflamatorio y conservan la integridad de la barrera epitelial.

8.5 Análisis de infiltrado celular en lámina propia mediante citometría de flujo

Al observar los cortes histológicos y detectar notables diferencias en el infiltrado inflamatorio en la mucosa en los distintos grupos experimentales, se decidió evaluar las poblaciones celulares de neutrófilos y monocitos hi y low, mediante citometría de flujo. Estas poblaciones han sido descritas como células importantes en el desarrollo de la CU. Los neutrófilos son un grupo de células que



Análisis de resultados

participan activamente en el proceso inflamatorio de la enfermedad, tienen la capacidad de fagocitar y matar microorganismos, mediante la producción de distintas enzimas (perforina, granzima, etc). Los monocitos son células inmaduras precursoras de macrófagos y células dendríticas. Cuando estos presentan en su membrana alta expresión de Ly6C se les considera monocitos inflamatorios y probablemente derivaran en un macrófago con activación clásica, por el contrario cuando tiene baja expresión de Ly6C se les considera monocitos anti-inflamatorios y probablemente se diferenciara en macrófagos con activación.

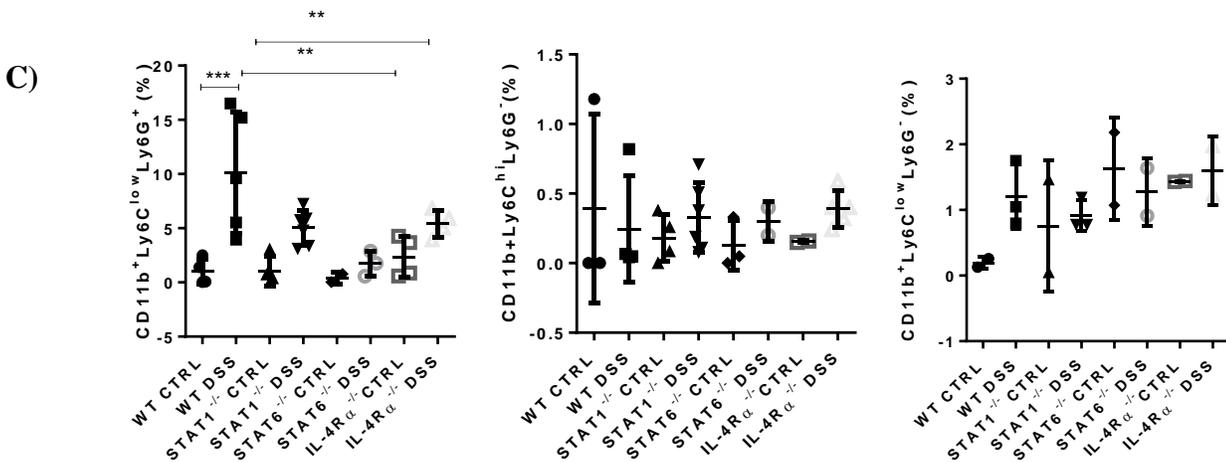
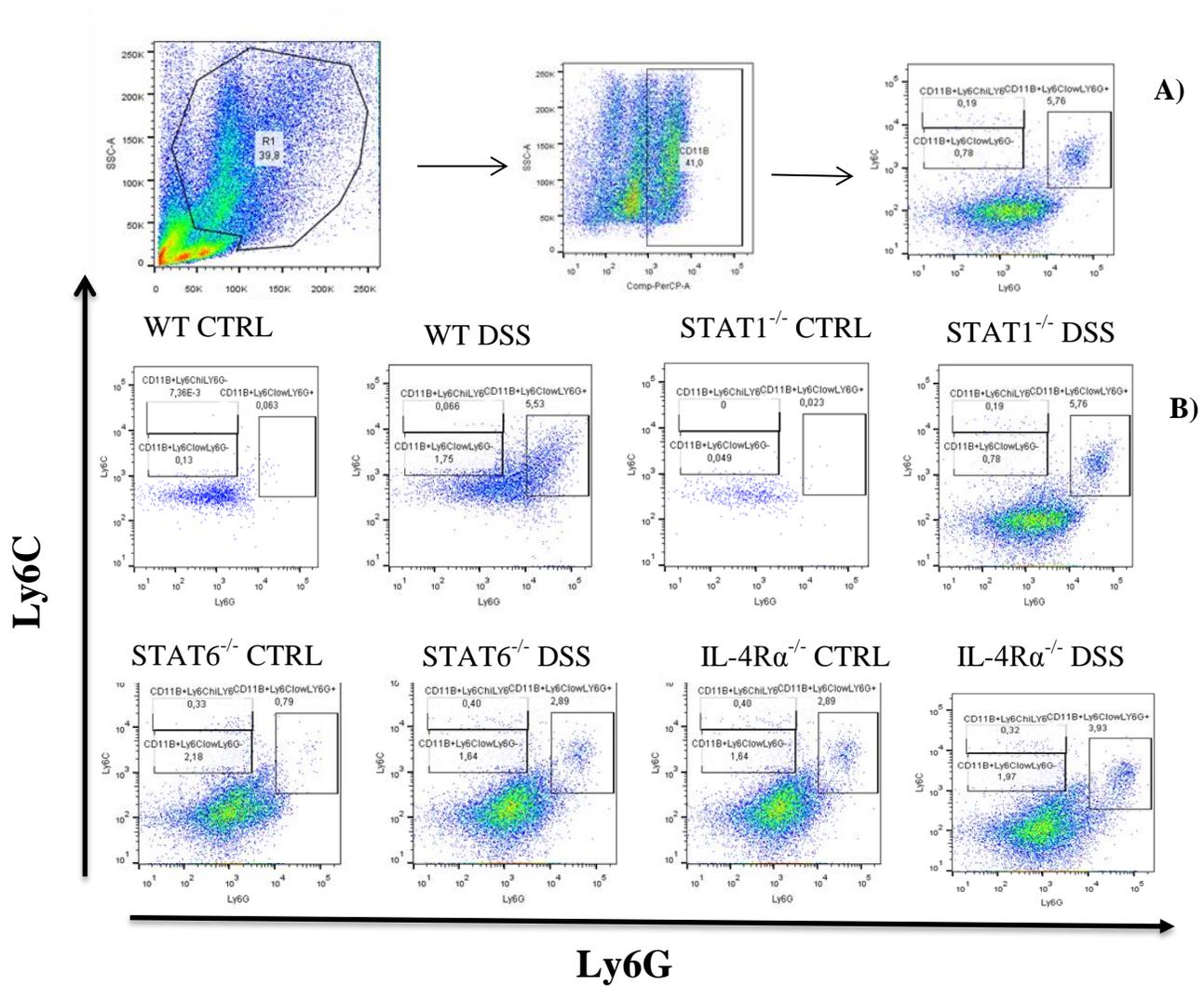
Para determinar esta poblaciones en el intestino se siguió la siguiente estrategia de análisis se tomó la región positiva para monocitos y granulocitos (R1) de la R1 se seleccionó la región para CD11b y de esa región se enfrentó Ly6C y Ly6G figura 8(A).

Como se observa en las figuras 8 B y C los neutrófilos reclutados en el colon aumentaron en los ratones BALB/c (10%) y STAT1^{-/-} (8%) con respecto a sus controles (3%), ambos grupos experimentales fueron los que mostraron mayor desarrollo y gravedad de la CU. Los ratones deficientes para STAT6^{-/-} e IL-4R α ^{-/-} presentaron diferencias significativas en el porcentaje de neutrófilos en la lámina propia en comparación con BALB/c y STAT1^{-/-} con un porcentaje de 3 y de 4 respectivamente, evidenciando un menor reclutamiento de estas poblaciones inflamatorias, estos animales se enfermaron con menor severidad mostrando menor desarrollo de los signos y síntomas de la colitis.

Tanto los monocitos pro-inflamatorios como antiinflamatorios no presentaron diferencias significativas entre las cuatro cepas, sin embargo, parece haber una tendencia en los monocitos low a aumentar en los grupos de STAT6 y de IL-4R α ^{-/-}.



Análisis de resultados





Análisis de resultados

Figura 8.A) Estrategia de análisis de los resultados obtenidos mediante citometría de flujo, para determinar las poblaciones de neutrófilos y monocitos en la lámina propia. **B)** Plots representativos de las células aisladas del intestino tanto de ratones controles y con administración de DSS, en los cuatro grupos (Balb/c, STAT6^{-/-} STAT1^{-/-} y IL-4 α R^{-/-}) **C)** Gráficas del porcentaje de neutrófilos y monocitos de células aisladas de la lámina propia. Los valores se consideraron significativos cuando la $p < 0.05^{**}$, $p < 0.01^{***}$, $p < 0.001^{****}$ ANOVA y post-test Tukey.

8.6 Análisis histológico de células caliciformes por tinción de Alcian Blue

Después de realizar la tinción de HE y al observar la pérdida de las criptas, se realizó una tinción de Alcian Blue para determinar la presencia o ausencia de las células caliciformes, ya que estas células son productoras de mucinas, se localizan debajo del epitelio y secretan muco que sirven como protección contra daño mecánico y evitan el establecimiento de patógenos (bacterias, virus y parásitos) en el epitelio. En la CU estas células se ven afectadas cuando el colon pierde su conformación original provocando que el epitelio quede expuesto a la microbiota. En la figura 9 (A y B) se puede observar a los distintos grupos (BALB/c, STAT1^{-/-}, IL-4 α R^{-/-} y STAT6^{-/-}). Los ratones a los que se les administró el DSS mostraron una reducción en el número de células caliciformes con respecto a su control. En el grupo BALB/c se puede distinguir una pérdida casi total de las células caliciformes; los ratones STAT1^{-/-}, fue el segundo grupo con una drástica reducción en el número de células caliciformes, por el contrario en los grupos IL-4 α R^{-/-} y STAT6^{-/-} se pudo apreciar que la reducción con respecto a sus controles fue mucho menor que los dos grupos anteriores.

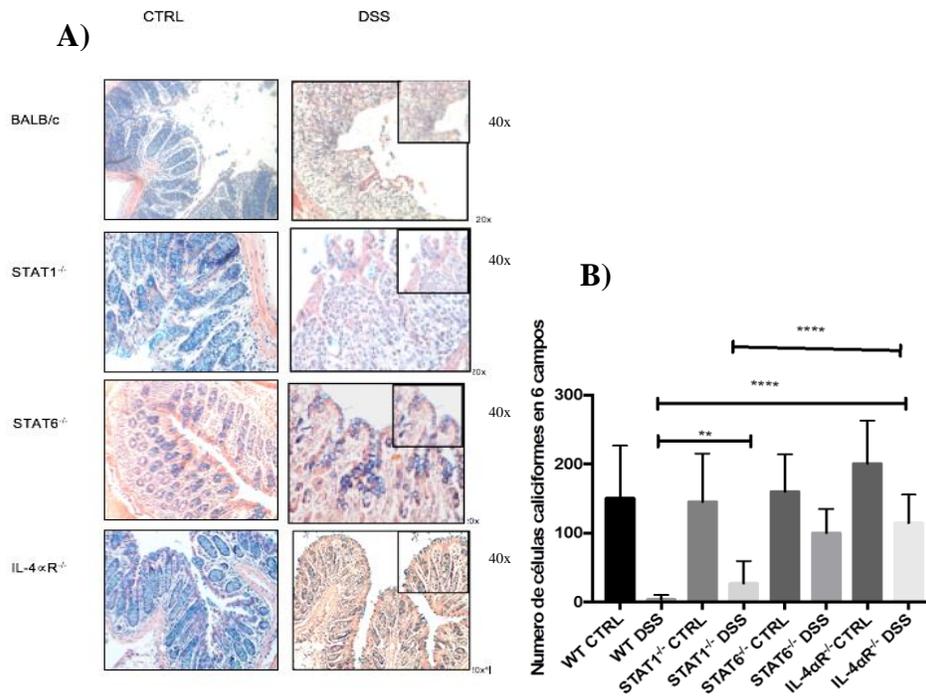


Figura 9. A) Tinción de Alcian Blue en células caliciformes (teñidas en azul) objetivo 20x. Se observa que los animales controles presentan un mayor número de células caliciformes, mientras que los ratones a los cuales se le administró DSS el número de éstas células se reduce. **B)** Número de células caliciformes en 6 campos de 2 ratones. La cepa BALB/c presenta el menor número de células caliciformes seguida de STAT1^{-/-} y por último IL-4αR^{-/-} y STAT6^{-/-} con un mayor número. Datos de 2 experimentos independientes. Los valores se consideraron significativos cuando la $p < 0.05^{**}$, $p < 0.01^{***}$, $p < 0.001^{****}$ ANOVA y post-test Tukey.

8.7 La presencia de un mayor número de células caliciformes puede estar favoreciendo la expresión de mucinas (MUC 2) como método de protección ante el DSS en los diferentes grupos

Como ya se había mencionado las células caliciformes son fuente principal de producción de mucinas. De manera normal estas células secretan MUC1; pero cuando el sistema inmune intestinal es sometido a estrés debido a infecciones patógenas se induce la expresión de MUC2 esta mucina es abundante en procesos infecciosos funcionando como barrera del epitelio.

En la tinción de Alcian blue se pudo apreciar la ausencia o presencia de las células caliciformes en los grupos experimentales de STAT1^{-/-} y de BALB/c este

Análisis de resultados

número se reduce drásticamente, y en los grupos de STAT6^{-/-} e IL-4αR^{-/-} se mantienen. Esto tiene una correlación positiva con la expresión de MUC2 la cual se evaluó mediante RT-PCR (figura 10 A y B). Se puede apreciar que en ambos grupos donde se observó una reducción drástica del número de células caliciformes (STAT1 y BALB/c) la expresión del RNAmensajero de MUC2 fue menor con respecto a sus controles mientras que para los grupos donde estas células caliciformes se mantuvieron (STAT6^{-/-} e IL-4αR^{-/-}) la expresión de este gen no se vio alterada.

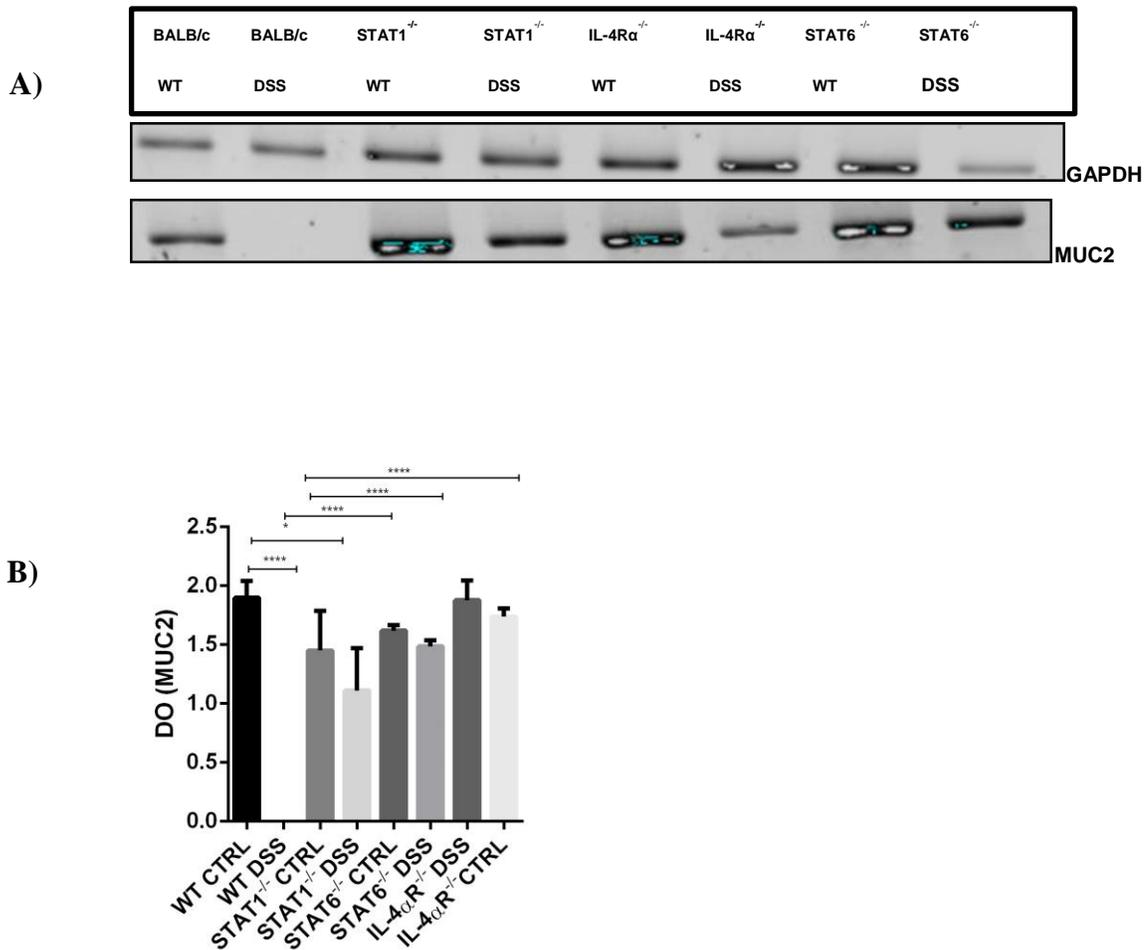


FIGURA 10. Análisis de la expresión génica del gen MUC2 en tejido de colon mediante RT-PCR. **A)** niveles de expresión de ARNm de GAPDH (gen constitutivo) y MUC2 en los cuatro distintos grupos (Balb/c, STAT6^{-/-}, STAT1^{-/-} e IL-4αR^{-/-}) tratados con DSS y ratones controles. **B)** Densitometría de las bandas del gen MUC2 normalizada respectivamente con la expresión de su



Análisis de resultados

gen constitutivo como control de carga (GAPDH). Datos de 2 experimentos independientes. Los valores se consideraron significativos cuando la $p < 0.05^{**}$, $p < 0.01^{***}$, $p < 0.001^{****}$ ANOVA y post-test Tukey.

8.8 Análisis de la citocina IL-13 en cultivo de tejido de colon

IL-13 es una citocina importante en el tejido intestinal, se ha asociado en la homeostasis del sistema inmune intestinal ya que induce a la hiperplasia y la activación para la producción de mucinas en las células caliciformes. La expresión de esta citocina en el colon se evaluó mediante la técnica de ELISA, en la figura 11 se puede apreciar los niveles presentes de esta citocina en los diferentes grupos. En el caso de BALB/c y los ratones $STAT1^{-/-}$ los niveles producidos fueron menores comparados con los de los ratones $IL-4\alpha R^{-/-}$ que muestran una mayor concentración de esta citocina.

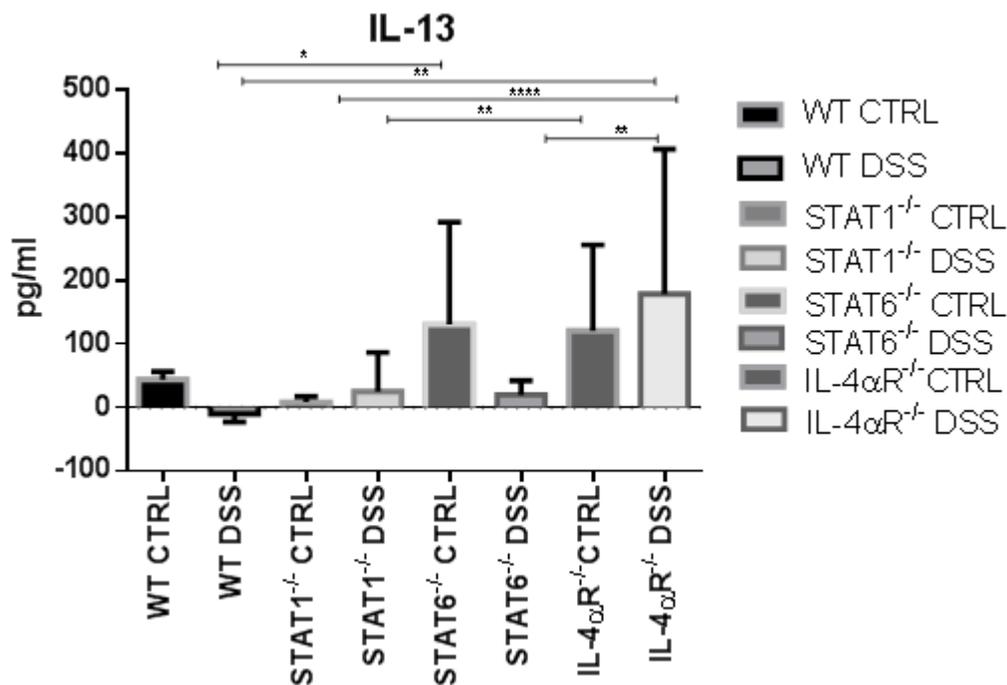


FIGURA 11. Niveles de IL-13 en sobrenadante de tejido de colon recolectado a las 24 horas de cultivo, Se puede observar la producción de esta citocina en los cuatro diferentes grupos (Balb/c, $STAT6^{-/-}$, $STAT1^{-/-}$ y $IL-4\alpha R^{-/-}$) tratados con DSS y ratones controles. Datos de 2



Análisis de resultados

experimentos independientes. Los valores se consideraron significativos cuando $p < 0.05^{**}$, $p < 0.01^{***}$, $p < 0.001^{****}$ ANOVA y post-test Tukey.

8.9 Análisis del complejo proteico E-cadherina/ β -catenina en tejido de colon

La protección de la barrera epitelial es crucial para evitar el desarrollo de la colitis, para ello las moléculas de adhesión juegan un papel importante, la proteína E-cadherina es muy importante en la homeostasis intestinal ya que regula la adhesión de las células epiteliales. Esta proteína se localiza en las uniones adherentes, pero forma una unión muy débil e inestable con la membrana celular por lo cual se refuerza la estabilidad en la unión al ligarse al citoesqueleto y los microtúbulos mediante β -catenina, formando así el complejo E-cadherina/ β -catenina. Debido a su importancia en la integridad de la barrera epitelial, se evaluó la expresión de este complejo en el colon mediante inmunohistoquímica y se encontró (Fig 12 A-B) que los ratones deficientes en STAT6 y en el receptor de la cadena alfa de IL-4 presentaron una mayor expresión tanto de E-cadherina como de β -catenina, localizada en la barrera epitelial intestinal, mientras que en los ratones BALB/c y los deficientes en STAT1 la presencia de estas moléculas se observó reducida drásticamente.

Análisis de resultados

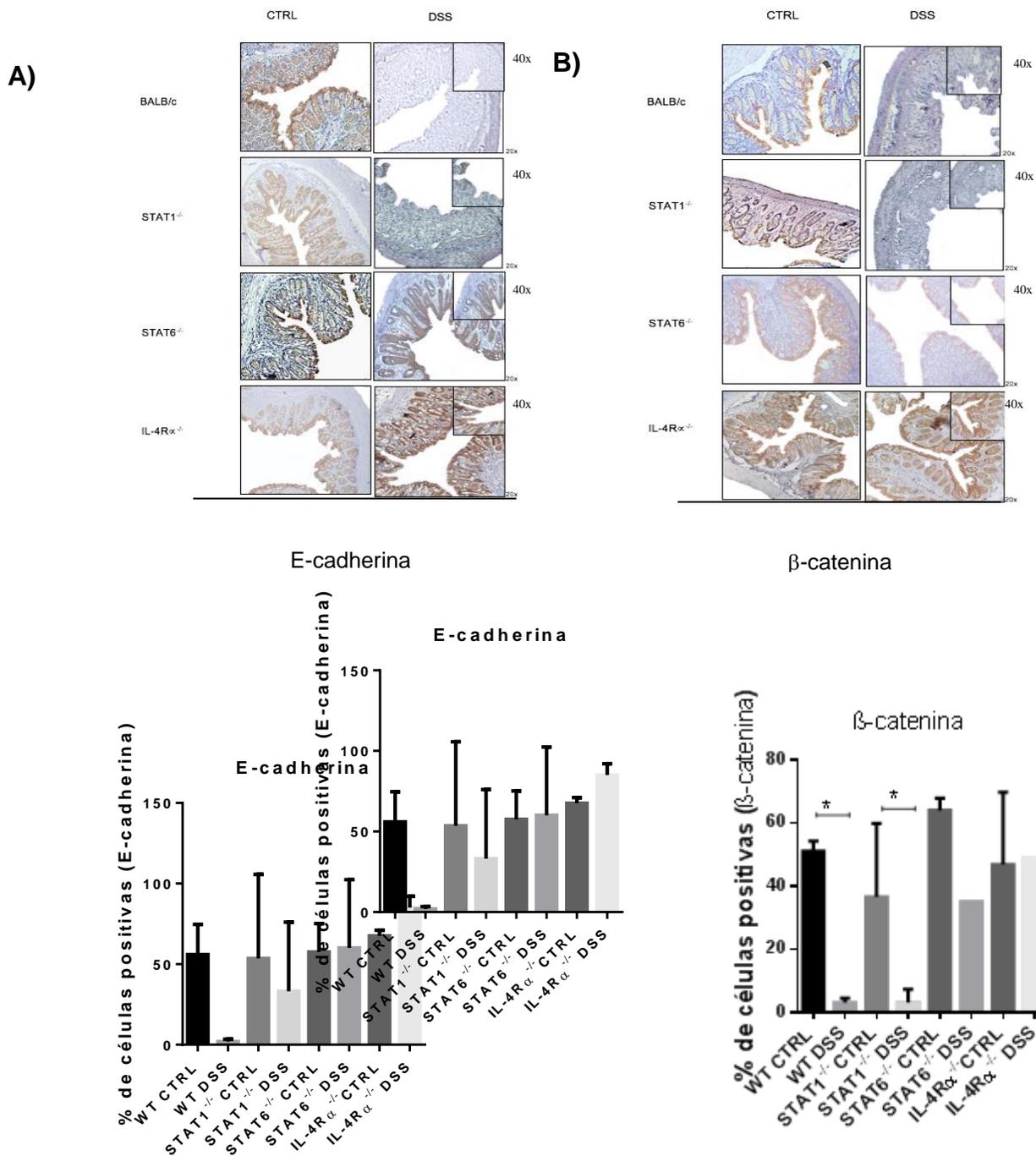


FIGURA 12. A) y B) Niveles de expresión del complejo E-cadherina/ β -catenina en tejido de colon mediante inmunohistoquímica, en donde se puede observar la expresión de este complejo en los cuatro diferentes grupos (Balb/c, STAT6^{-/-} STAT1^{-/-} y IL-4 α R^{-/-}). Tratados con DSS y ratones controles, se aprecia que a los individuos de los grupos BALB/c y STAT1^{-/-} a los que se les administró DSS, el complejo se pierde casi por completo, mientras que los STAT6^{-/-} y los IL-4 α R^{-/-} la expresión se ve aumentada. Datos de 2 experimentos independientes. Los valores se consideraron significativos cuando la $p < 0.05^{**}$, $p < 0.01^{***}$, $p < 0.001^{****}$ ANOVA y post-test Tukey.



9 .Discusión

La CU es una EII que presenta una condición crónica de inflamación en el colon, con secreción de citocinas pro-inflamatorias como $TNF-\infty$, $IL-1\beta$, $IL-17A$ e $IFN-\gamma$ pero también producción de citocinas de un perfil Th2 como $IL-13$ e $IL-4$, en estas respuestas están implicados los factores de transcripción, transductores de señal y activadores de la transcripción (STAT) los cuales también han sido implicados en el proceso de la enfermedad. STAT1 y STAT6 son dos de las vías más importantes involucradas en el desarrollo de la colitis ulcerativa [8].

En estudios previos de CU han implicado a STAT1 en el desarrollo de la enfermedad, existen pocos estudios en modelos murinos que hacen referencia al papel que juega esta molécula. Sin embargo, en biopsias de pacientes, se ha encontrado un incremento en la expresión y activación de STAT1 en la lámina propia colonica, con altos niveles de expresión de $NF\kappa B$ p65 y una alta fosforilación de STAT1 en neutrófilos y macrófagos presentes en el intestino, con respecto a las biopsias de pacientes sanos [34]. En uno de los pocos estudios realizado en ratones $STAT1^{-/-}$ encuentran que estos son menos susceptibles a desarrollar colitis inducida por DSS [35]. Estos resultados son contradictorios con respecto a lo que se reporta en este estudio, ya que los ratones $STAT1^{-/-}$ presentan signos de la enfermedad muy similares a los ratones WT, los cuales muestran signos más altos de IAE, pérdida de peso y una reducción significativa en la longitud del colon; a nivel histológico presentaron un mayor infiltrado celular, compuesto principalmente por monocitos pro-inflamatorios y neutrófilos, además de la disminución del porcentaje de células caliciformes y menor expresión del gen MUC2, indicando que a pesar de no estar presente este factor de transcripción, el cual es uno de los más importantes en la respuesta inflamatoria, parece no participar en desarrollo de la enfermedad en un modelo de colitis con DSS.



Discusión

Una posible explicación a este fenómeno, donde parece que STAT1 no influye en el desarrollo de la CU podría ser que NF-kappa B sea el factor principal que participe en la respuesta inflamatoria. Como ya se mencionó anteriormente en biopsias de pacientes se reportan altos niveles de activación de NF-kappa B acompañada de una mayor producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α ; también un incremento en las subunidades p50 y c-rel de NF-kappa B. En otro estudio observan que al regular negativamente a p65 en macrófagos provenientes de ratones con CU, mediante un oligonucleótido antisentido de fosforotioato específico para p65, es suficiente para reducir considerablemente la producción de citocinas pro-inflamatorias y el daño a nivel histológico [28]. Hasta el momento no se ha reportado que la vía de activación NFkB este afectada en animales deficientes en STAT1, por lo que aparentemente esta vía podría seguir activa durante la colitis y así los animales STAT1KO desarrollan la enfermedad de una forma similar a los animales silvestres.

Por otro lado, diversos estudios relacionan a STAT6 como causante de la inflamación intestinal dependiendo el modelo de inducción, por ejemplo, en colitis experimental con oxazolona en ratones STAT6^{-/-} se reduce la pérdida de peso, el daño al tejido, el reclutamiento de células inflamatorias y la producción de citocinas de un perfil Th2[29]. Esto concuerda con los resultados de nuestro estudio, ya que en los ratones STAT6^{-/-} e IL-4R α ^{-/-} el desarrollo de la enfermedad fue menor comparada con los ratones WT, es decir, se redujo de manera considerable el daño a nivel histológico, la pérdida de peso, hubo una reducción significativa del IAE, así como del reclutamiento de neutrófilos y monocitos pro-inflamatorios.

Reportes previos han demostrado que STAT6 es una molécula de señalización esencial para la homeostasis intestinal que está implicada en, hiperplasia de células caliciformes, eosinofilia tisular, remodelación de la barrera intestinal, fibrosis y crecimiento de células tumorales [37]. También STAT6 podría



Discusión

favorecer un aumento en la permeabilidad de la mucosa, mejorando así la respuesta del epitelio intestinal a los productos microbianos, lo que puede resultar en inflamación crónica permitiendo la disrupción de la barrera epitelial, afectando directamente a las células caliciformes [38]. Estudios en modelos de cáncer de colon asociado a colitis, han demostrado que los ratones STAT6^{-/-} conservan la integridad de la barrera epitelial manteniendo así a las células caliciformes, se ha comprobado que estas células a su vez son cruciales en el mantenimiento la barrera epitelial intestinal, ya que son las encargadas de la secreción de moco en colon. En este estudio se encontró que los ratones deficientes en STAT6, y la cadena alfa de interleucina 4 mantienen el número de células caliciformes, mientras que en los ratones WT estas decrecen en número de manera considerable.

Como ya se mencionó estas células protegen al secretar moco para evitar el daño a la barrera epitelial, estos procesos inflamatorios de tipo Th2 son atribuibles principalmente a IL-4 e IL-13 citocinas mediadas que requieren STAT6 para ejercer su función. En modelos de inflamación, IL-4 e IL-13 se consideran las principales mediadoras de la diferenciación de células caliciformes, conduciendo a la metaplasia de estas y a la expresión del gen MUC2 [30]. Sin embargo, en este estudio se encontró que en los ratones deficientes para STAT6 e IL-4R α , a los cuales se les administro DSS, tenían una mayor expresión del gen MUC2, en contraste con otros trabajos anteriores que reportan a STAT6 como principal mediador de la producción de MUC2 mediante IL-13. También se obtuvo como resultado una mayor producción de la citocina IL-13 en el cultivo de colon en los ratones knockout tratados con DSS. Esto podría ser explicado por la señalización independiente de IL-13 a través de la vía PI3K, como se ha demostrado en estudios con líneas celulares intestinales, donde es capaz de inducir la hiperproliferación de las células caliciformes y la expresión del gen MUC2 [30].

Al observar que la ausencia de STAT6 protegía a los ratones y conservaba la integridad de la barrera epitelial, se midió la expresión del complejo E-



Discusión

cadherina/ β -catenina ya que este ha sido asociado tanto en modelos murinos como en humanos a la enfermedad, debido a que la desregulación en éste, causan permeabilidad en la barrera epitelial y disrupción de la misma [9]. Estudios en líneas celulares humanas en modelo de cáncer de colon, asocian a la IL-13 señalizando a través de STAT6 como un represor de E-cadherina mediante ZEB1, sin embargo, el mecanismo por el cual STAT6 reprime la transcripción de esta proteína no es aun conocido [39]. Por otro lado β -catenina también participa en la homeostasis intestinal al mantener anclada a E-cadherina a la membrana celular, también en la reparación y renovación epitelial, ya que al activarse por los ligandos de Wnt se trasloca al núcleo para mantener la integridad de la barrera epitelial [9]. En la literatura se ha reportado que la activación de β -catenina es mediada por la activación de STAT6, comprobando que su ausencia retrasa la formación de la mucosa y la recuperación de los ratones en un modelo de colitis con TNBS [40]. En este trabajo se encontró que el complejo E-cadherina/ β -catenina en los ratones STAT6^{-/-} y los IL-4R α ^{-/-} tiene una mayor expresión con respecto a las ratones WT, donde éste se pierde casi por completo; como ya se mencionó anteriormente, IL-4 e IL-13 son capaces de señalizar de manera independiente a sus receptores clásicos a través de Plk3 pudiendo ser esta una explicación sobre la expresión de β -catenina [42], por otro lado, al estar ausente STAT6 y la cadena alfa del receptor de IL-4, se favorece la presencia de E-cadherina, reforzando las uniones celulares epiteliales, evitando la disrupción de la misma y la respuesta inflamatoria.

Esto indica que la ausencia de la vía de señalización IL-4/STAT6 favorece la protección de los ratones contra la CU inducida por DSS, manteniendo la integridad del epitelio colonico mediante la expresión del complejo E-cadherina/ β -catenina, e impidiendo la pérdida de las células caliciformes, las cuales sobreexpresan el gen MUC2 fungiendo como otro mecanismo de protección al epitelio.



10 .Conclusiones:

- ❖ Las moléculas STAT6 /IL-4R α modulan negativamente el desarrollo de la colitis ulcerativa mientras que STAT1 no participa en el proceso de la enfermedad.
- ❖ La deficiencia de STAT6 y de IL-4R α disminuyen el reclutamiento de neutrófilos en la lámina propia.
- ❖ La ausencia de STAT6 y de IL-4R α mantiene las células caliciformes
- ❖ La expresión del gen MUC2 se ve aumentada en ausencia STAT6 y de IL-4R α .
- ❖ La ausencia de STAT6 y de IL-4R α favorece la expresión del complejo E-cadherina/ β -catenina.



11 .Referencias Bibliográficas

1. Ramiro,E., Pérez, F. J., Castellote, C., Franch, A., Castell, M. 2008,. El intestino: Pieza clave del sistema inmunitario. Revista Española de Enfermedades., 1: 29-34.
2. Salvo, E., Alonso, C., Pardo, C., Casado, M., Vicario, M. 2015. Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. Revista Española de Enfermedades Digestivas. ARAN Ediciones.107: 686-696
3. Guarner, F., & Malagelada, J. R. 2003. Gut flora in health and disease. Lancet. Elsevier Limited. 361: 512–19
4. Heazlewood, C. K., Cook, M. C., Eri, R., Price, G. R., Tauro, S. B., Taupin, D.McGuckin, M. A. 2008. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. PLoS Medicine, 5(3), 0440–0460.
5. Birchenough.,G. Johansson., M.Gustafsson., J KHansson.,G. 2016. New developments in goblet cell mucus secretion and function. 8(4): 712–719.
6. Harrison.,J&Maloy.,K.2011.Innate immune activation in intestinal homeostasis. Journal of innate immunity.3(6):585-593.
7. Simón.,P. Gutiérrez.,Y. Castillo.,A. Márquez.,R .Shimizu.,.A.López.,G.Becker,J. Castro.D. 2015.Expresión de mucinas: MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6, HGM y CD10 en carcinomas gástricos y lesiones pre-neoplásicas adyacentes. Revista Gen .10:64-67.
8. Coskun.,M.Salem.,M.Pedersen.,J.Nielsen.,O. Haagen.,A. 2013. Involvement of JAK/STAT signaling in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Pharmacological Research.76:1-8.
9. Xinrui.,T. Zhuola.,L. Bo.,N.Jianlin.,Z.Thian.,T.Lee.,K.Ra.,S. 2011.E-Cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. Journal of Biomedicine and Biotechnology.2011:6.
10. Salomón, R. 2007. Enfermedad inflamatoria del intestino : colitis ulcerativa *. Revista Médica, 1–27.



Referencias Bibliográficas

11. Henderson., P. Limbergen.,J. Wilson .,D. Satsangi., J. Russell., R. Genetics of childhood-onset inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2010;17:346-361.
12. Larrosa.,H.Vásquez.,G. 2011. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental. Nestlé Nutrition Institute Workshop LATAM.(2): 187-200.
13. Romero.,A.Palomo.,J. Sánchez., M. Risalde.,M. Pedrara.,V. Molin., E.Ruiz., V. J.Gómez.,V. 2011. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental.(2):187-200.
14. Sepúlveda.,S.Beltrán.,C.Peralta.,A.Rivas.,P.,Rojas.,N.Figueroa.,C.2008.Enfermedad inflamatoria intestinal: una mirada inmunológica. *Revista médica de Chile* .(136):367-375.
15. Tao.,F.Qian.,C.Guo.,W.Luo.,Q.Xu.,Q.Sun.,Y. 2013. Inhibition of Th1/Th17 responses via suppression of STAT1 and STAT3 activation contributes to the amelioration of murine experimental colitis by a natural flavonoid glucoside icariin. *Biochemical Pharmacology.*(85): 798-807.
16. Judith., L.Araujo., A.2010. BACTERIAS LÁCTICAS COMO T ERAPIA A LTERNATIVA PARA E NFERMEDADES I NFLAMATORIAS I NTESTINALES.Instituto de Ciencias Biomédicas .(7):2-7
17. Bosques.,F.Sandoval., E.Martínez., M.Garza.,E.Maldonado.,H. 2011.Epidemiología y características clínicas de la colitis ulcerosa crónica idiopática en el noreste de México. *Revista de Gastroenterología de México.*(76): 34-38.
18. Durán.,O. Rodrigo.,E. Pulido.,L. Farías.,O.López.,M. González.,A.2005. Proctocolectomía restaurativa con reservorio ileal en “J”. 10 años de experiencia en un centro de especialidades. *Edigraphic.*(76):1-4.
19. Zhang.,Chao.Liu.,L.Sun.,W.Qin.,S.Qin.,L.,Wang,X. 2015.Expressions of E-cadherin, p120ctn, β -catenin and NF- κ B in Ulcerative Colitis(35): 368-373.
20. Becerra.,M.Valderrama.,H.Terrazas.,I.2011.Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) Family Members in Helminth Infections. *International Journal of Biological Sciences.* 7(9):1371-1381.
21. Zundler.,S.Neurath.,M. 2016.Integrating Immunologic Signaling Networks: The JAK/STAT Pathway in Colitis and Colitis-Associated Cancer. *Vaccines.*(5):1-110
22. Mendiola., A.Cruz.,I.2005. VÍA JAK-STAT: UNA VISIÓN GENERAL. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud.*(8): 14-25.



Referencias Bibliográficas

23. Heneghan., A.Pierre.,J.Kudsk.,K. 2014. JAK-STAT and intestinal mucosal immunology.(5): 1-8.
24. Wu, X.; Guo,W.;Wu, L.; Gu, Y.; Gu, L.; Xu, S.;Wu, X.; Shen, Y.; Ke, Y.; Tan, R.; et al. Selective sequestration of STAT1 in the cytoplasm via phosphorylated SHP-2 ameliorates murine experimental colitis. *J. Immunol.* 2012, 189, 3497–350.
25. Li.,Y.2012. The Role of SOCS3 Signaling in Ulcerative Colitis and Ulcerative Colitis-related Carcinogenesis.Tesis de Doctoral.40-43
26. Xia, B.Crusius, J .Wu, J.Zwiers, A.Bodegraven, A. Bodegraven,A.2003. Signal transducer and activator of transcription 6 gene G2964A polymorphism and inflammatory bowel disease. *Clinical and experimental immunology.*(131): 446-50.
27. Markus., F.Neurath.,A.,Guido.,S. Huelmun .,P.Logbetg.,W.Meyer.,Z.2015.Cytokine Gene Transcription By NF-κB Family Members in Patients wit Inflammatory Bowel Disease. *Medical Clinic*(18)3759-9773.
28. Rosen, M.Chaturvedi, R.Washington, M.Kuhnhein, L.Moore, P.Coggeshall S.McDonough,E.Weitkamp,J.Singh, A. Coburn, L.Williams, C.Yan, F.Van Kaer, L.Peebles, R. 2013 STAT6 Deficiency Ameliorates Severity of Oxazolone Colitis by Decreasing Expression of Claudin-2 and Th2-Inducing Cytokines. *The Journal of Immunology.* (190): 1849-1858
29. Blanchard.,C.Durual.,S.Estienne.,M.Bouzakri.,K.Heim.,M.Blin.,N.Cuber.,J.2013JAK inhibitors: pharmacology and clinical activity in chronic myeloproliferative neoplasms. *Curr Med Chem.* 2013;20(9):1147-61.
30. Blanchard, Carine.Durual, Stéphane.Estienne, Monique.Bouzakri, Karim.Heim, Markus H.Blin, Nikolaus.Cuber, Jean-Claude2014.IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression: requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. *Journal of immunology.*(172): 3775-3783
31. Mizoguchi.,A. 2012. Animal models of inflammatory bowel disease. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.*(105) : 263-320.
32. Wirtz.S.Neurath.,M.2007. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Advanced Drug Delivery Reviews.*(59): 1073-1083.
33. S Schreiber, P Rosenstiel, J Hampe, S Nikolaus, B Groessner, A Schottelius, T Kühbacher, J Hämling, U R Fölsch, D Seeger. 2002. Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory



Referencias Bibliográficas

- bowel disease. *INFLAMMATION AND INFLAMMATORY BOWEL DISEASE*(51): 379-385
34. Sudip K. Bandyopadhyay, Carol A. de la Motte, Sean P. Kessler, Vincent C. Hascall, David R. Hill, and Scott A. Strong. 2008. Hyaluronan-Mediated Leukocyte Adhesion and Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis Are Attenuated in the Absence of Signal Transducer and Activator of Transcription 1. *American Journal of Pathology*(173): 1361-1368
 35. Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005;129:550–64.
 36. OwHebenstreit D, Wirnsberger G, Horejs-Hoeck J, Duschl A. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine.Growth Factor Rev* 2006;17:173–88
 37. Leon-Cabrera, S.A. Molina-Guzman, E. Delgado-Ramirez, Y.G. Vázquez-Sandoval, A. Ledesma-Soto, Y. Pérez-Plasencia, C.G. Chirino, Y.I. Delgado-Buenrostro, N.L. Rodríguez-Sosa, M. Vaca-Paniagua, F. Ávila-Moreno, F. Gutierrez-Cirlos, E.B. Arias-Romero, L.E. Terrazas, L.I. 2016 Lack of STAT6 attenuates inflammation and drives protection against early steps of colitis-associated colon cancer. *Cancer Immunology Research*.(5): 385-397.
 38. Cao, Hui. Zhang, Jing. Liu, Hong. Wan, Ledong. Zhang, Honghe. Huang, Qiong. Xu, Enping. Lai, Maode. Cao, Hui. Zhang, Jing. Liu, Hong. Wan, Ledong. Zhang, Honghe. Huang, Qiong. Xu, Enping. Lai, Maode. 2016. IL-13/STAT6 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *Oncotarget*.(7): 61183-61198.
 39. Fichtner-Feigl, S. Kesselring, R. Martin, M. Obermeier, F. Ruemmele, P. Kitani, A. Brunner, S. Haimerl, M. Geissler, E. K. Strober, W. Schlitt, H. J. IL-13 Orchestrates Resolution of Chronic Intestinal Inflammation via Phosphorylation of Glycogen Synthase Kinase-3. *The Journal of Immunology*. (192)3969-3980.
 40. Lee, Goo. Goretsky, Tatiana. Managlia, Elizabeth. Dirisina, Ramanarao. Singh, Ajay Pal. Brown, Jeffrey B. May, Randal. Yang, Guangyu. Ragheb, Josette William. Evers, B. Mark Weber, Christopher R. Turner, Jerrold R. He, Xi C. Katzman, Rebecca B. Li, Linheng. Barrett, Terrence A. 2010. Phosphoinositide 3-kinase signaling mediates β -catenin activation in intestinal epithelial stem and progenitor cells in colitis. *Gastroenterology*.(139)869-881.e9



Referencias Bibliográficas

41. Cosín, J.Ortiz., D.Calatayud, S.Hernández, C.Esplugues, J. V.Barrachina. . 2016.The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD. 2016. *Mucosal Immunology*(9):389-394.