



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DE NEUTRÓFILOS RECLUTADOS DURANTE EL DESARROLLO DE
CÁNCER DE COLON ASOCIADO A COLITIS EN AUSENCIA DE STAT1**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CUAUHTÉMOC DEL ÁNGEL SÁNCHEZ BARRERA

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. YADIRA LEDESMA SOTO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.
DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DE NEUTRÓFILOS RECLUTADOS DURANTE EL DESARROLLO DE
CÁNCER DE COLON ASOCIADO A COLITIS EN AUSENCIA DE STAT1**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

CUAUHTÉMOC DEL ÁNGEL SÁNCHEZ BARRERA

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. YADIRA LEDESMA SOTO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM.
DR. EZEQUIEL MOISÉS FUENTES PANANÁ
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/308/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **08 de febrero de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **(Biomedicina)** del estudiante **SÁNCHEZ BARRERA CUAUHTÉMOC DEL ÁNGEL** con número de cuenta **310275312** con la tesis titulada **“Caracterización de neutrófilos reclutados durante el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis en ausencia de STAT1”**, realizada bajo la dirección del **DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. JOSÉ SULLIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ
Vocal: DR. JOAQUÍN MANZO MERINO
Vocal: DR. ALEXANDER PEDROZA GONZÁLEZ
Vocal: DR. RICARDO LASCURÁIN LEDESMA
Secretario: DR. EZEQUIEL MOISES FUENTES PANANÁ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de abril de 2021

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pbiol.posgrado.unam.mx/>

Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas.

Al CONACyT por el apoyo otorgado a través de la beca con número de CVU 770801.

Este proyecto fue financiado por los programas: CONACyT Laboratorios Nacionales: 293893, CONACyT Infraestructura 268769, CONACyT Ciencia Básica: A1-S-37879 y PAPIIT-DGAPA-UNAM: IN220316.

A mi tutor principal el Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés.

Al comité tutor integrado por la Dra. Yadira Ledesma Soto y el Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá.

Agradecimientos a título personal

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

A los miembros del jurado: Dr. José Sullivan López González, Dr. Joaquín Manzo Merino, Dr. Alexander Pedroza González, Dr. Ricardo Lascuráin Ledesma y Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá.

A mis amigas y compañeras de laboratorio: Ing. en Biotecnología Diana Beristain Terrazas, Dra. Blanca Callejas y Dra. Mónica Mendoza.

Al Dr. José Luis Reyes.

A la Dra. Leticia Flores y el Biol. Tomás Villamar.

A mí amigo el M en C. Alí Fuentes.

Al Dr. César Terrazas.

Dedicatoria

A mi mamá, Carmen. Gracias por todas las enseñanzas y tu apoyo incondicional.
¡Te amo!

Índice

Índice	i
Índice de abreviaturas	iii
Índice de tablas y figuras	v
Índice de anexos	vi
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
1. Transductor de señales y activador de la transcripción 1.....	6
1.1 Participación de STAT1 en cáncer	7
1.2 Participación de STAT1 en cáncer colorrectal.....	8
2. Desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis	9
3. Neutrófilos.....	12
3.1 Funciones antitumorales de los neutrófilos.....	13
3.2 Funciones protumorales de los neutrófilos	14
3.3 Neutrófilos en cáncer colorrectal.....	16
4 Regulación de los neutrófilos por STAT1.....	16
Justificación	18
Hipótesis	19
Objetivo general	20
Objetivos particulares	20
Material y métodos	21
1. Manejo animal	21
2. Desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis	21
3. Análisis histológico	22
3.1 Procesamiento del tejido	22
3.2 Análisis histopatológico.....	22
3.3 Inmunohistoquímica	22
4. Análisis de proteínas	23
4.1 Extracción de proteínas.....	23
4.2 Western blot.....	23

5.	Citometría de flujo	24
5.1	Procedimiento general de tinción	24
5.2	Citometría de flujo de células circulantes	26
5.3	Citometría de flujo de células obtenidas de bazo	26
5.4	Citometría de flujo de células obtenidas de tumor.....	26
6.	Ensayo de supresión.....	27
6.1	Aislamiento y marcaje de células de bazo	28
6.2	Aislamiento de neutrófilos por citometría de flujo.....	28
7.	Ensayo funcional de neutrófilos.....	29
7.1	Enriquecimiento de neutrófilos por selección negativa	29
7.2	Medición de especies reactivas del oxígeno	29
7.3	Identificación de Trampas Extracelulares de DNA	30
7.4	Evaluación de muerte celular en neutrófilos	30
8.	Análisis estadístico	31
	Resultados	32
1.	La ausencia de STAT1 favorece el establecimiento de tumores	32
2.	Los tumores STAT1 ^{-/-} presentan mayor grado de desarrollo	33
3.	La ausencia de STAT1 promueve la activación de los factores STAT3 y NF-κB 	35
4.	Los ratones STAT1 ^{-/-} exhiben reducción significativa de linfocitos T CD8 ⁺ intratumorales...	37
5.	Los ratones STAT1 ^{-/-} presentan mayor infiltración de neutrófilos en el tumor	40
6.	Los neutrófilos deficientes de STAT1 suprimen la proliferación de linfocitos T CD8+.....	42
7.	Los neutrófilos deficientes de STAT1 muestran alteraciones en sus funciones efectoras ...	44
	Discusión	48
	Conclusiones.....	52
	Perspectivas	53
	Referencias bibliográficas.....	54
	Anexos	67

Índice de abreviaturas

AKT	Protein kinase B (Proteína cinasa B)
AOM	Azoxymethane (Azoximetano)
APC	Adenomatous Polyposis Coli
CAC	Colitis Associated Cancer (Cáncer de colon asociado a colitis)
CDK	Cyclin Dependent Kinases (Cinasas dependientes de ciclina)
CNI	Chromosomal Instability (Inestabilidad cromosómica)
COX	Ciclooxigenasa
CRC	Colorectal Cancer (Cáncer colorrectal)
CTLs	Cytotoxic T Lymphocytes (Linfocitos T citotóxicos)
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand (Ligando de quimiocinas, motivo C-X-C)
CXCR	Chemokine (C-X-C motif) Receptor (Receptor de quimiocinas, motivo C-X-C)
DAMPs	Damage-associated molecular patterns (Patrones moleculares asociados a daño)
DCFH	2',7'-Diclorofluoresceina diacetato
DSS	Dextran Sulfate Sodium (Dextrano sulfato sódico)
FasL	Fas Ligand (Ligando de FAS)
fMLF	N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine (Péptido N-formil-metionil-leucil-fenilalanina)
GAS	Gamma Activated Sequence (Secuencia gamma activada)
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor (Factor estimulante de colonias de granulocitos)
HBSS	Solución Salina Balanceada de Hank
HRP	Horseradish Peroxidase (Peroxidasa de rábano)
IAP	Inhibitor of apoptosis (Inhibidor de la apoptosis)
IFN	Interferón
IKK-ε	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon (Inhibidor del factor nuclear kappa-B cinasa subunidad épsilon)
IL-	Interleucina
ILC	Innate Lymphoid Cells (Células linfoides innatas)
iNOS	Inducible nitric oxide synthase (Oxido nítrico sintasa inducible)
IRF	Interferon Regulatory Factor (Factor regulador de interferón)
ISGF	Interferon Stimulated Gene Factor (Factor genético estimulado por interferón)
ISRE	Interferon Sensitive Response Element (Elemento de respuesta sensible al interferón)
JAK	Janus kinase (Cinasa Jano)
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LTB4	Leukotriene B4 (Leucotrieno B4)
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases (Proteínas cinasas activadas por mitógeno)
Mcl-1	Myeloid Cell Leukemia 1
MDsCs	Myeloid Derived Suppressor Cells (Células mieloides supresoras)
MHCI	Major Histocompatibility Complex (Complejo principal de histocompatibilidad)

MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (Metaloproteína de matriz 9)
MSI	Microsatellite Instability (Inestabilidad de microsatélites)
MUTYH	MutY DNA Glycosylase
NE	Neutrophil elastase (Elastasa de neutrófilo)
NETs	Neutrophil Extracellular Traps (Trampas extracelulares de neutrófilos)
NK	Natural killer Cell (Célula asesina natural)
NLR	Neutrophil-Lymphocyte Ratio (Proporción neutrófilos/linfocitos)
OSM	Oncostatin M (Oncostatina M)
PAF	Platelet-activating factor (Factor activador de plaquetas)
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns (Patrones moleculares asociados a patógenos)
PDL	Programed death ligand (Ligando de muerte programada)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase (Fosfoinositol 3-cinasa)
PIAS	Protein Inhibitors of Activated STATs (Proteínas inhibidoras de la activación de STATs)
PKC δ	Protein Kinase C-Delta (Proteína cinasa C delta)
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PRRs	Pattern Recognition Receptor (Receptores de reconocimiento de patrones)
RNI	Reactive Nitrogen Intermediates (reactivos intermediarios del nitrógeno)
ROS	Reactive Oxygen Species (Especies reactivas del oxígeno)
SFB	Suero Bovino Fetal
SMAD4	SMAD family member 4
SOCS	Suppressors of Cytokine Signalling (Supresores de la señalización de citocinas)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (Transductor de señales y activador de la transcripción)
TAM	Tumor associated macrophage (Macrófago asociado a tumor)
TAN	Tumor associated Neutrophil (Neutrófilo asociado a tumor)
TCF	T Cell Factor
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta (Factor de crecimiento transformante beta)
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (Receptor 1 del factor de necrosis tumoral)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRADD	TNFRSF1A Associated Via Death Domain
TRAF	TNF receptor associated factor (Receptor asociado a TNF)
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand (Ligando inductor de apoptosis asociado a TNF)
TYK	Tyrosine Kinase (Tirosina cinasa)
UC	Ulcerative Colitis (Colitis ulcerativa)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Factor de crecimiento endotelial vascular)

Índice de tablas y figuras

	Página
Figura 1. Mecanismos del desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis.	8
Figura 2. Funciones antitumorales de los neutrófilos.	11
Figura 3. Funciones protumorales de los neutrófilos.	13
Figura 4. Estrategia de análisis para citometría de flujo	25
Figura 5. Los ratones STAT1 ^{-/-} mostraron pérdida de peso moderada y sangrado hasta el día 68.	29
Figura 6. La ausencia de STAT1 favorece el establecimiento de tumores.	30
Figura 7. Los tumores, en ratones STAT1 ^{-/-} , tienen mayor grado de desarrollo.	31
Figura 8. Los ratones STAT1 ^{-/-} presentan sobre expresión de marcadores asociados a severidad.	32
Figura 9. STAT1 impide la sobre activación de STAT3 y NF-κB.	33
Figura 10. Los ratones STAT1 ^{-/-} presentan mayor número de linfocitos T CD8 ⁺ en sangre y bazo.	34
Figura 11. Los ratones STAT1 ^{-/-} exhiben reducción drástica de linfocitos T CD8 ⁺ reclutados a tumor.	35
Figura 12. Los ratones STAT1 ^{-/-} tienen mayor número de neutrófilos en sangre y bazo.	36
Figura 13. Los ratones STAT1 ^{-/-} reclutan más neutrófilos a tumor.	37
Figura 14. Los neutrófilos deficientes de STAT1 suprimen la proliferación de linfocitos T CD8 ⁺ .	38
Figura 15. Los neutrófilos deficientes de STAT1 tienen estallido respiratorio débil.	39
Figura 16. Los neutrófilos deficientes de STAT1 liberan menos NETs.	40
Figura 17. La ausencia de STAT1 favorece la sobrevida de neutrófilos no activados.	41
Figura 18. Desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis en ausencia de STAT1.	47
Tabla 1. Anticuerpos utilizados en Inmunohistoquímica.	21
Tabla 2. Anticuerpos utilizados en <i>Western blot</i> .	22
Tabla 3. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.	23
Tabla 4. Anticuerpos utilizados en aislamiento celular por citometría de flujo.	26
Tabla 5. Anticuerpos utilizados en ensayo de proliferación.	26
Tabla 6. Anticuerpos utilizados en ensayo DCFH.	27
Tabla 7. Anticuerpos utilizados en ensayo de apoptosis.	28

Índice de anexos

		Página
Anexo 1.	Genotipo de los ratones STAT1 ^{-/-} .	67
Anexo 2.	Aprobación del comité de ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.	68

Resumen

El transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT1) regula la señalización intracelular en respuesta a interferones tipo I (IFN- α/β) y II (IFN- γ). Este factor de transcripción controla diferentes procesos celulares, entre ellos, diversos mecanismos antitumorales como muerte celular, inhibición de la angiogénesis, arresto del ciclo celular y activación de la respuesta inmune antitumoral.

En pacientes con cáncer colorrectal (CRC), la translocación de STAT1 al núcleo se ha relacionado con aumento de la supervivencia global y supervivencia específica de la enfermedad, mientras que la expresión alta de mRNA de STAT1 se ha asociado con mayor supervivencia global. Por otra parte, un estudio realizado en el modelo de cáncer de colon asociado a colitis (CAC) inducido por Azoximetano (AOM)/ Dextrano Sulfato de Sódico (DSS) demostró que los ratones deficientes de STAT1 presentan desarrollo tumoral acelerado. En el CAC, los mediadores producidos por el infiltrado inflamatorio favorecen el establecimiento de tumores a través del daño al DNA y la activación de factores protumorales como β -catenina, NF- κ B y STAT3. De manera interesante, se observó que, durante el progreso del CAC, los ratones STAT1^{-/-} presentan incremento de neutrófilos en sangre y bazo, sugiriendo que estas células juegan un papel importante en el desarrollo del CAC en ausencia de STAT1.

Los neutrófilos asociados a tumor (TANs) son una población celular heterogénea que promueve o inhibe el desarrollo tumoral dependiendo de su activación. Hasta ahora, se ha reportado que la actividad antitumoral de los neutrófilos es sostenida por un ambiente rico en IFN- β , mientras que su actividad protumoral se mantiene a través de la señalización por TGF- β . No obstante, su participación en el desarrollo de CAC es controversial debido a que se ha sugerido que los neutrófilos inhiben el desarrollo tumoral mediante el control de la microbiota, sin embargo, estas células también producen mediadores inflamatorios que favorecen el desarrollo de tumores como las especies reactivas del oxígeno (ROS), IL-1 β , IL-6 y TNF- α .

Utilizando el modelo murino AOM/DSS, el presente estudio evaluó la participación de los neutrófilos en el desarrollo de CAC en ratones deficientes de STAT1. Los resultados obtenidos demostraron que, hasta el día 48, el tamaño y número de tumores fue similar en los grupos STAT1^{-/-} y WT. Sin embargo, en el día 68 el grupo STAT1^{-/-} presentó más tumores menores a 2 mm en comparación con el grupo WT, mientras que el número de tumores mayores a 2 mm fue similar en ambos grupos.

Notablemente, los tumores del grupo STAT1^{-/-} fueron más invasivos y presentaron sobre expresión de marcadores inflamatorios incluyendo β -catenina, NF- κ B y STAT3. Por otra parte, en el día 48 se observó mayor infiltración de neutrófilos y linfocitos T CD8⁺ en los tumores del grupo STAT1^{-/-}. No obstante, en el día 68 el número de linfocitos T CD8⁺ disminuyó en el grupo STAT1^{-/-}, mientras que el número de neutrófilos se mantuvo.

De manera interesante, los neutrófilos de ratones deficientes de STAT1 presentaron disminución en la producción de ROS y liberación de NETs, así como aumento de la supervivencia. Además, estas células suprimieron la proliferación de linfocitos T CD8⁺. Estos resultados sugieren que la formación de tumores en los ratones deficientes de STAT1 podría ser favorecida por la actividad supresora de los neutrófilos y la baja infiltración de linfocitos T CD8.

Abstract

Signal Transducer and Activator of Transcription 1 mediates intracellular signaling in response to type I (IFN- α/β) and type II (IFN- γ) interferons. This protein controls a wide variety of cellular processes, including several antitumor mechanisms such as apoptosis induction, angiogenesis inhibition, cell cycle arrest and the regulation of antitumor immunity.

In colorectal cancer patients, translocation of STAT1 to the nucleus improves both overall survival and disease specific survival while high expression of STAT1 mRNA enhances overall survival. Moreover, in colitis associated cancer (CAC) model induced by AOM/DSS, absence of STAT1 accelerates tumor formation.

In CAC, mediators produced by inflammatory infiltrate enhance tumor growth through DNA damage and activation of protumor transcription factors such as β -catenin, NF- κ B and STAT3. Interestingly, in AOM/DSS model, STAT1^{-/-} mice showed increased neutrophils in the blood and in spleen. This suggests that neutrophils may play an important role in CAC development.

Tumor associated neutrophils are a heterogeneous cell population that promote or inhibit tumor growth depending on their activation. Previous studies suggest that antitumor activity of neutrophils is sustained by an IFN- β -rich environment, while their protumor activity is maintained through TGF- β signaling. However, the role of neutrophils in CAC remains unclear. Several reports suggest that neutrophils inhibit CAC progression by controlling the microbiota. However, these cells also produce CAC-promoting inflammatory mediators such as ROS, IL-1 β , IL-6 and TNF- α .

In this work, we evaluated the participation of neutrophils in AOM/DSS model in STAT1 deficient mice. Our results did not reveal differences in tumor size and number in both STAT1^{-/-} and WT mice at day 48. However, on day 68 tumors smaller than 2 mm increased in STAT1^{-/-} mice compared with WT counterparts, while there were not differences in tumors larger than 2 mm.

Moreover, STAT1^{-/-} tumors exhibited high invasiveness and overactivation of inflammatory markers such as β -catenin, NF- κ B and STAT3. Furthermore, STAT1^{-/-} mice showed high recruitment of neutrophil and CD8⁺ lymphocytes into the tumors at day 48. In contrast, CD8⁺ lymphocytes decreased in STAT1^{-/-} tumors at day 68, while there were not differences in neutrophils number.

Interestingly, STAT1^{-/-} neutrophils showed ROS and NETs downregulation and increased lifespan. In addition, they suppressed CD8⁺ lymphocyte proliferation. Our results suggest that tumor formation in STAT1^{-/-} mice was supported by neutrophil-mediated CD8⁺ suppression.

Introducción

El transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT1) regula la señalización intracelular de los interferones tipo I (IFN- α/β) y II (IFN- γ)¹. La activación de esta proteína controla diferentes procesos celulares, entre ellos, diversos mecanismos involucrados en el desarrollo de cáncer. Aunque evidencias recientes sugieren que STAT1 puede actuar como un promotor de tumores, generalmente se considera un supresor de tumores debido a que induce muerte celular, inhibe la angiogénesis, impide el progreso del ciclo celular y juega un papel central en la activación de la respuesta inmune antitumoral²⁻⁴.

En pacientes con CRC, la translocación de STAT1 al núcleo se ha relacionado con aumento de la supervivencia global^{5,6} y supervivencia específica de la enfermedad⁷, mientras que la expresión alta de mRNA de STAT1 se ha asociado con mayor supervivencia global⁸. Por otra parte, un estudio realizado en el modelo de cáncer de colon asociado a colitis (CAC) inducido por AOM/DSS demostró que los ratones deficientes de STAT1 presentan desarrollo tumoral acelerado⁹.

En el CAC, los mediadores producidos por el infiltrado inflamatorio favorecen el establecimiento de tumores a través del daño al DNA y la activación de factores protumorales como β -catenina, NF- κ B y STAT3^{10,11}. De manera interesante, se ha observado que, durante el progreso del CAC, los ratones STAT1^{-/-} presentan incremento de neutrófilos en sangre y bazo⁹. Esto sugiere que el desarrollo de CAC en ausencia de STAT1 podría promover la producción y reclutamiento de neutrófilos y que estas células posiblemente juegan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad.

Los neutrófilos asociados a tumor (TANs) son una población celular heterogénea¹² que promueve o inhibe el desarrollo tumoral dependiendo de su estado de activación¹³⁻¹⁵. Hasta ahora, se ha reportado que la actividad antitumoral de los neutrófilos es sostenida por un ambiente rico en IFN- β ^{16,17}, mientras que su actividad protumoral se mantiene a través de la señalización por TGF- β ^{13,18}. No obstante, la participación de los neutrófilos en el desarrollo de CAC es controversial

debido a que se ha sugerido que los neutrófilos pueden inhibir el desarrollo tumoral mediante el control de la microbiota^{19,20}, sin embargo, estas células también producen mediadores inflamatorios que favorecen el desarrollo de tumores incluyendo ROS, IL-1 β , IL-6 y TNF- α ^{21,22}.

Utilizando el modelo AOM/DSS, el presente estudio evaluó la participación de los neutrófilos en el desarrollo de CAC en ratones deficientes de STAT1. Los resultados obtenidos demostraron que los neutrófilos de ratones STAT1^{-/-} adquieren características diferencias fenotípicas que podrían favorecer el establecimiento de tumores a través de la supresión de la respuesta inmune antitumoral.

1. Transductor de señales y activador de la transcripción 1

STAT1 α (91 kDa) está conformado por siete dominios evolutivamente conservados incluyendo el dominio N-terminal, super enrollado, de unión a DNA, de enlace, Src homologo 2, de acoplamiento a fosfotirosinas y de transactivación²³. Un *splicing* alternativo elimina parte del dominio de transactivación y genera la proteína incompleta STAT1 β (84 kDa). Al perder el sitio de fosforilación serina 727, esta proteína se considera transcripcionalmente inactiva^{3,4}.

La activación de STAT1 puede ser mediada por factores de crecimiento²⁴ y citocinas como IL-27²⁵ e IL-35²⁶, sin embargo, los principales activadores de esta proteína son los interferones de tipo I (IFN- α/β) y II (IFN- γ). La unión de los interferones de tipo II a sus receptores IFNGR1 y 2 conduce a la fosforilación de la cinasa Jano 1 (JAK1) y JAK2. Esta interacción promueve la formación de homodímeros de STAT1 que se transportan al núcleo para unirse a las secuencias gamma activadas (GAS). Por otra parte, los interferones de tipo I activan a los receptores IFNAR1 y 2, facilitando la fosforilación de las proteínas JAK1 y Tirosina cinasa 2 (TYK2). Esta reacción favorece la formación de heterodímeros STAT1-STAT2 que se unen al factor regulador de interferón (IRF) y forman el factor 3 genético estimulado por interferón (ISGF3). Finalmente, este factor es transportado al núcleo y se une al elemento de respuesta sensible al interferón (ISRE) promoviendo la expresión de genes asociados a mecanismos antivirales y antitumorales²⁴.

Después de su activación, STAT1 puede sufrir otras modificaciones como acetilaciones que contrarrestan la activación mediada por interferones²⁷ y glicosilaciones que sostienen las funciones de este factor de transcripción²⁸. Además, otras cinasas como las proteínas cinasas activadas por mitógeno p38 (p38 MAPK)²⁹, la proteína cinasa C delta (PKC δ)³⁰ y el inhibidor del factor nuclear kappa-B cinasa subunidad épsilon (IKK- ϵ)³¹ mejoran la actividad de STAT1 a través de la fosforilación del sitio serina 727.

La regulación negativa de STAT1 se realiza de manera directa a través de su desfosforilación por la proteína inhibidora de la activación de STAT 1 (PIAS1)³² y de manera indirecta mediante la inhibición de las proteínas JAK por los supresores de la señalización de citocinas (SOCS)³³.

1.1 Participación de STAT1 en cáncer

La activación de STAT1 deriva en la transcripción de más de 2000 genes que controlan una gran variedad de procesos celulares³⁴. Evidencia reciente sugiere que STAT1 promueve la formación de tumores a través de la transcripción de proteínas antiapoptóticas como los inhibidores de la apoptosis 1 (IAP-1), IAP-2 y el factor asociado al receptor de TNF 1 (TRAF1)³⁵. Además, STAT1 favorece la expresión de mediadores inflamatorios como la ciclooxigenasa 2 (COX2)^{36,37} y la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS)^{38,39}. Por otra parte, promueve el reclutamiento de células mieloides supresoras (MDSCs)^{40,41}, controla la actividad supresora de los macrófagos asociados a tumor (TAMs)⁴² e incrementa la expresión del ligando de muerte programada 1 (PDL1) en leucocitos y células tumorales^{43,44}.

A pesar de los reportes que describen a STAT1 como un promotor de tumores, este factor de transcripción aún es considerado un supresor de tumores debido a que promueve la muerte celular a través de la inducción de ligandos de muerte (FasL⁴⁵ y TRAIL⁴⁶), la activación de caspasas⁴⁷ y la represión de proteínas antiapoptóticas (BCL-2)⁴⁸. Además, inhibe la angiogénesis al moderar la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMP)⁴⁹ e impide el progreso del ciclo celular mediante la regulación de p53⁵⁰ y cinasas dependientes de ciclinas (CDK)⁵¹. Por otra parte, STAT1 juega un papel central en la activación de la respuesta inmune

antitumoral, ya que participa en la maduración y la actividad citotóxica de las células NK⁵², mejora la presentación de antígeno al aumentar la expresión de moléculas que forman el complejo principal de histocompatibilidad (MHC-I)⁵³, favorece el establecimiento de la respuesta inmune Th1⁵⁴ y promueve la actividad antitumoral de los macrófagos a través de la expresión de iNOS⁵⁵.

La actividad de STAT1 como promotor o supresor de tumores varía en función del tipo de cáncer. En linfoma, mesotelioma pleural y cáncer de cabeza y cuello esta proteína actúa como un promotor de tumores. Mientras que, en melanoma, cáncer de esófago, cáncer de pulmón y cáncer gástrico este factor de transcripción es descrito como un supresor de tumores. No obstante, en cáncer de mamá y cáncer colorrectal, el papel de STAT1 es controversial^{3,4}.

1.2 Participación de STAT1 en cáncer colorrectal

Estudios realizados en muestras de pacientes revelan que la expresión de STAT1 puede tener diversos efectos en el desarrollo de CRC. Se ha reportado que la translocación de STAT1 al núcleo se relaciona con aumento de la supervivencia global^{5,6} y supervivencia específica de la enfermedad⁷, mientras que la expresión alta de mRNA de STAT1 se asocia con mayor supervivencia global⁸. Por otra parte, en tumores con inestabilidad de microsatélites (MSI) la expresión de STAT1 en etapas tempranas de la enfermedad se ha vinculado con reducción de la supervivencia global⁵⁶. Finalmente, la activación de STAT1 favorece el crecimiento de tumores con mutaciones en KRAS, favoreciendo la resistencia a fármacos⁵⁷.

Estudios realizados en el modelo murino de CAC, inducido por AOM/DSS, demuestran que STAT1 participa como un supresor de tumores durante el desarrollo de CAC. Se ha demostrado que los defectos en la activación de STAT1 se asocian a mayor establecimiento de tumores^{58,59}. Además, los ratones deficientes de STAT1, muestran inflamación intestinal grave, desarrollo tumoral acelerado y mayor porcentaje de neutrófilos en sangre y bazo⁹

2. Desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis

A nivel mundial el CRC es el tercer cáncer más común en hombres y el segundo en mujeres, mientras que es la tercera causa de muerte por cáncer en hombres y la cuarta en mujeres. En México el CRC ocupa el segundo lugar en incidencia en hombres y el cuarto en mujeres, así mismo, es el cuarto cáncer más mortal en ambos sexos⁶⁰.

El 15% de los casos de CRC surgen a partir de enfermedades hereditarias como el síndrome de Lynch y poliposis asociadas a mutaciones en los genes APC y MUTYH^{61,62}. El 85% restante surge esporádicamente y se asocia con diversos factores como la obesidad, el sedentarismo, el consumo de alcohol y tabaco, bajo consumo de fibra, alto consumo de carnes rojas/procesadas, alteraciones en la microbiota y las enfermedades inflamatorias intestinales como la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa (UC)^{62,63}. Los pacientes con UC tienen mayor probabilidad de desarrollar CAC, una variante del CRC donde la inflamación crónica del intestino juega un papel central. De manera interesante, la probabilidad de desarrollar CAC se eleva en función del tiempo en que se realizó el diagnóstico de UC, aumentando un 2% a los 10 años, 8% a los 20 años y 20% a los 30 años⁶³⁻⁶⁵.

En condiciones de homeostasis, el intestino se encuentra protegido por una barrera de mucinas rica en péptidos antimicrobianos e inmunoglobulina A, esto impide el contacto directo de la microbiota intestinal con la barrera epitelial⁶⁶. Además, el intestino se encuentra en un estado de tolerancia inmunológica sostenido por citocinas como TGF- β , IL-10 e IL-22 (Fig. 1C) que son producidas principalmente por linfocitos T reguladoras, macrófagos residentes, células dendríticas CD103⁺, células NK y células linfoides innatas tipo 2 (ILC2) (Fig. 1D)⁶⁷. En la enfermedad inflamatoria intestinal, la pérdida de moléculas de adhesión como E-cadherina, provoca la ruptura de la barrera epitelial y la interacción de la microbiota con el sistema inmune. Esta interacción promueve el establecimiento de procesos inflamatorios patológicos que favorecen el desarrollo de CAC^{10,66}.

En las primeras etapas de la inflamación intestinal, es posible observar diferentes poblaciones celulares como las células dendríticas, linfocitos Th, linfocitos T CD8⁺, macrófagos M1 y neutrófilos (Fig. 1D)⁶⁸. Estos últimos generan daño al DNA a través de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y reactivos intermediarios del nitrógeno (RNI) (Fig. 1C). Estos agentes son capaces de oxidar nucleótidos (p. ej. Guanina a 8-oxoguanina) provocando transversión de bases, formación de sitios abásicos y ruptura de una o dos cadenas de DNA⁶⁹.

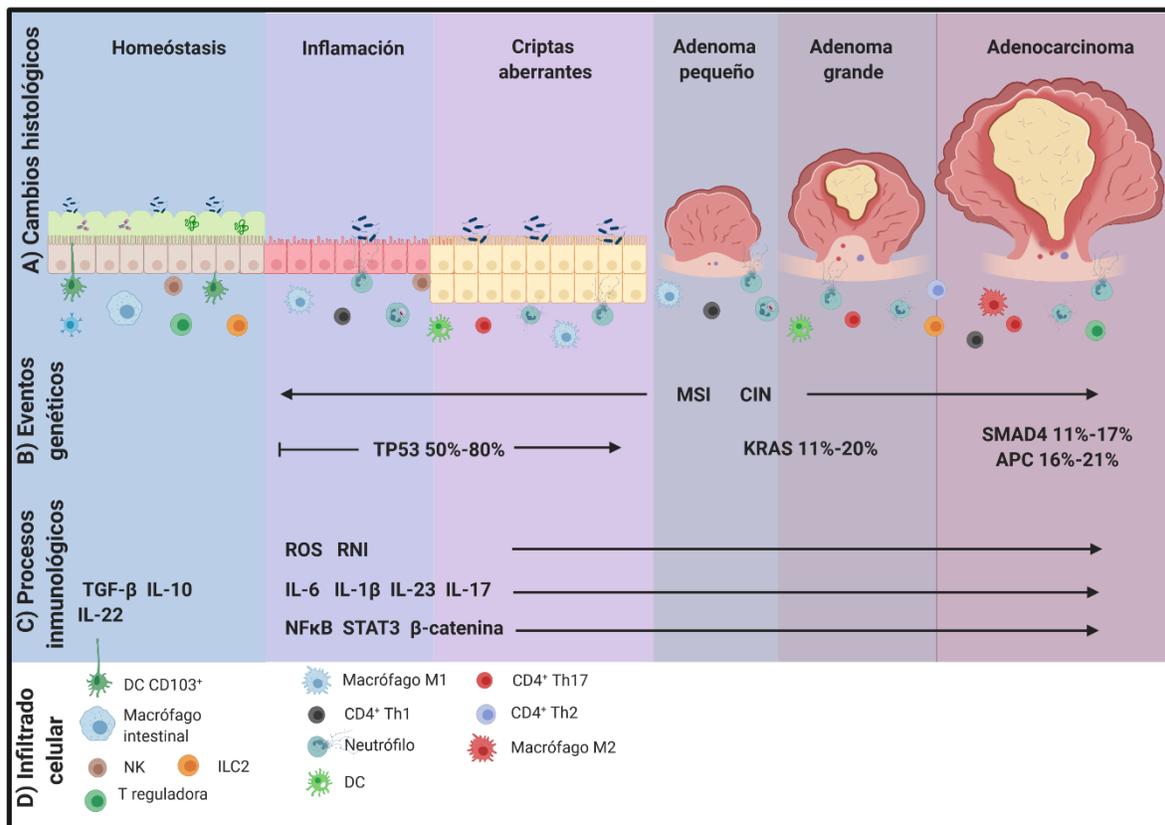


Figura 1. Mecanismos del desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis. Cambios histológicos en el colon (A) surgen como consecuencia de la acumulación de mutaciones y otros eventos genéticos (B), asociados a la inflamación crónica del intestino (C) mediada, principalmente, por células del sistema inmune(D).

Los daños generados por agentes oxidantes favorecen el establecimiento de mutaciones. En el CAC, las primeras alteraciones suceden en el gen *TP53* y son las más frecuentes al presentarse en el 50-85% de los casos. Por otra parte, las alteraciones en *APC* (16-21%), *KRAS* (11-20%) y *SMAD4* (11-17%) son menos frecuentes⁷⁰⁻⁷². Notablemente, las mutaciones en CRC y CAC difieren en orden y frecuencia de aparición. Otras alteraciones genéticas, recientemente descritas en CAC, son la MSI y la inestabilidad cromosómica (CIN) que se presentan en el 15% y 85% de los casos, respectivamente^{70,73}(Fig. 1B).

El progreso de la inflamación intestinal genera cambios en el infiltrado inflamatorio. En etapas avanzadas, este infiltrado se compone de linfocitos T citotóxicos (CTLs), linfocitos Th2 y Th17, células dendríticas, células NK, macrófagos M2 y neutrófilos (Fig. 1D)⁶⁸. Estas poblaciones celulares modulan el microambiente intestinal a través de la producción de citocinas como TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-23 e IL-17. Diversos reportes sugieren que estos mediadores inflamatorios promueven el desarrollo de CAC a través de la activación de factores de transcripción como NF- κ B, β -catenina y STAT3, favoreciendo la sobrevivencia de las células tumorales (Fig. 1C)^{11,70,74,75}.

En células epiteliales β -catenina interactúa con el complejo TCF/LEF y activa la transcripción de genes que regulan la proliferación celular. Además, NF- κ B transcribe genes como ciclina D1 y BCL-2. Así mismo, STAT3 favorece la expresión de c-Myc, Mcl-1, ciclina D1 y BCL-2. Por otra parte, la expresión de NF- κ B y STAT3 en leucocitos favorece el establecimiento de un microambiente inflamatorio^{66,75}.

La acumulación de mutaciones y la activación de proteínas oncogénicas provoca la expansión clonal de las células del epitelio intestinal. En consecuencia, la evolución gradual de la displasia promueve cambios a nivel histológico desde la formación de criptas aberrantes (displasia indefinida), adenomas pequeños (displasia de bajo grado), adenomas grandes (displasia de alto grado), hasta el establecimiento de adenocarcinomas invasivos^{10,73}(Fig. 1A).

3. Neutrófilos

Los neutrófilos son células pequeñas de 10 a 15µm, tienen núcleo segmentado y citoplasma rico en gránulos que contienen péptidos antimicrobianos y enzimas⁷⁶. En ratón, los neutrófilos son identificados por los marcadores de membrana CD11b, Ly6C y Ly6G, sin embargo, estos marcadores también son expresados por las MDSCs granulocíticas (G-MDSCs)⁷⁷. Debido a que las G-MDSCs son consideradas una población de neutrófilos inmaduros⁷⁸, en el presente estudio la población CD11b⁺ Ly6C⁺ Ly6G⁺ será referida como neutrófilos.

La producción de neutrófilos se lleva a cabo en la médula ósea en un proceso controlado por el eje IL-23/IL-17/G-CSF⁷⁹. Durante la granulopoyesis, los precursores de neutrófilos expresan altos niveles del receptor CXCR4 cuya interacción con el ligando CXCL12 facilita su retención en médula ósea. Aquí, los precursores maduran hasta diferenciarse en neutrófilos que serán liberados al torrente sanguíneo ante la estimulación del receptor CXCR2 por alguno de sus ligandos (CXCL1 y CXCL2)⁸⁰. Los neutrófilos permanecen en circulación durante seis a diez horas. Si estos no son reclutados al foco de infección, son reciclados al reingresar a médula ósea en un proceso mediado por CXCR4⁷⁹.

Ante un estímulo, los neutrófilos son reclutados al foco inflamatorio a través de diversos factores quimiotácticos como CXCL1, CXCL2, el factor activador de plaquetas (PAF), leucotrieno B4 (LTB4), el componente C5 del sistema del complemento y el péptido N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLF)⁸¹. Una vez en el tejido, los neutrófilos pueden ser activados a través de receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) que identifican PAMPs y DAMPs o mediante receptores de opsoninas que reconocen el componente C3b del sistema del complemento o la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas⁸². Además, la estimulación por citocinas juega un papel importante en la activación y funcionamiento de los neutrófilos. Las principales funciones efectoras de los neutrófilos involucran la fagocitosis, degranulación, producción de ROS, producción de citocinas y liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)⁸³.

Los neutrófilos son considerados un marcador de la inflamación aguda debido a que son de las primeras células que se reclutan al foco inflamatorio y que, hasta hace poco, se consideraban células de vida media corta (3-24h)¹⁵. No obstante, estudios recientes sugieren que estas células juegan un papel importante en procesos de inflamación crónica, demostrando plasticidad fenotípica¹² y una vida media de 5 o más días⁸⁴.

Con el descubrimiento de la plasticidad fenotípica de los neutrófilos, diversos trabajos se enfocaron en el estudio de esta población celular durante procesos inflamatorios crónicos, entre ellos el cáncer. La presencia de TANs ha sido reportada en diversos tipos de cáncer como el carcinoma bronqueoalveolar, melanoma metastásico, carcinoma renal, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer colorrectal. Hasta ahora, la evidencia sugiere que el papel de estas células es variado al promover o inhibir el desarrollo tumoral dependiendo de su activación¹³⁻¹⁵.

3.1 Funciones antitumorales de los neutrófilos

Los neutrófilos con funciones antitumorales se han descrito como células maduras de núcleo segmentado, pequeños, con gran capacidad de migración, fagocitosis muy activa y estallido respiratorio agresivo¹².

Los principales mecanismos citotóxicos de los neutrófilos involucran la apoptosis inducida por el daño a DNA generado por ROS⁸⁵, la apoptosis dependiente de contacto mediada por Fas Ligando⁸⁶ y la trogocitosis, proceso donde los neutrófilos fagocitan parte de la membrana plasmática de células tumorales opsonizada por anticuerpos y generan su muerte por necrosis (Fig. 2)⁸⁷.

Recientemente se demostró que las funciones antitumorales de los neutrófilos son controladas, principalmente, por la respuesta a IFN- β . Se ha señalado que IFN- β inhibe la angiogénesis a través de la represión de genes como VEGF y MMP9 en los TANs^{70,85}. Así mismo, se demostró que esta citocina controla el reclutamiento de neutrófilos al tumor, inhibiendo la expresión de CXCR2 y CXCR4^{17,88}.

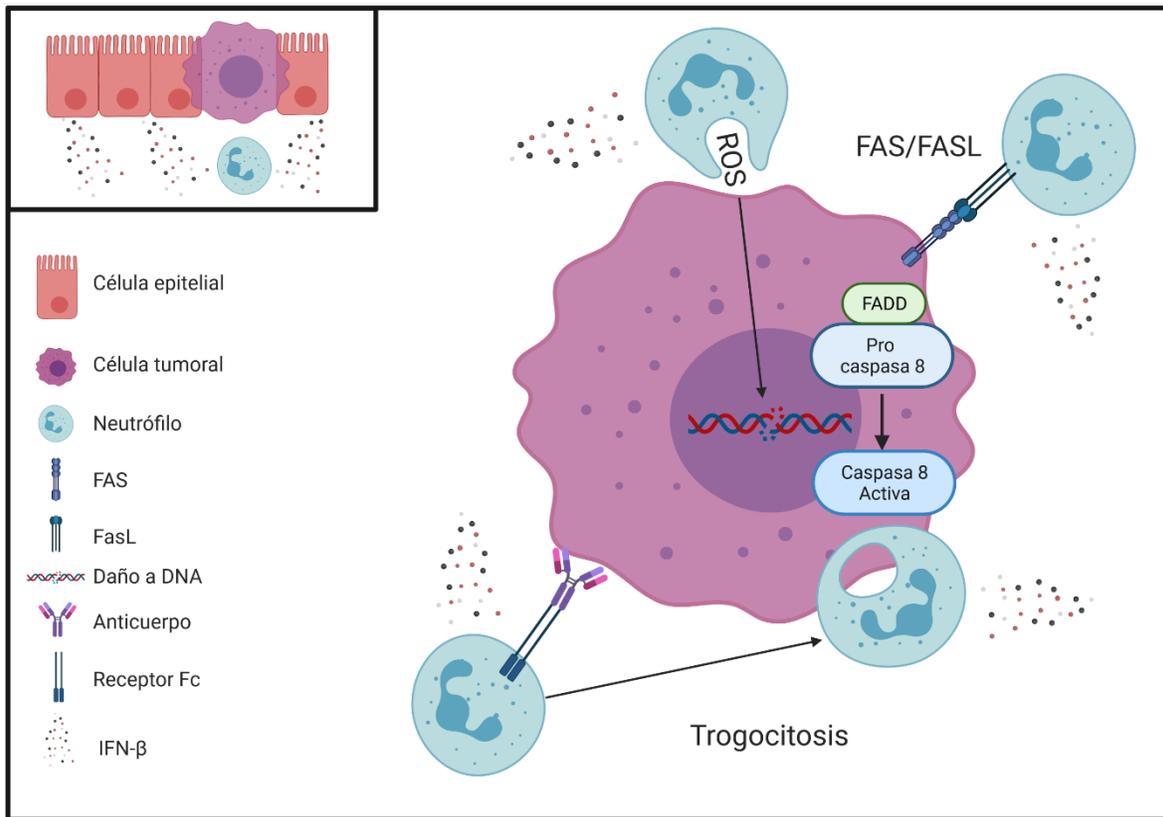


Figura 2. Funciones antitumorales de los neutrófilos. Los mecanismos antitumorales de los neutrófilos incluyen la trogocitosis y la inducción de apoptosis a través de ROS y ligando FAS. Estas funciones son sostenidas por un ambiente rico en IFN- β que es generado por células epiteliales dañadas que secretan esta citocina como señal de alarma.

3.2 Funciones protumorales de los neutrófilos

Los neutrófilos protumorales se han identificado como células maduras con núcleo segmentado o células inmaduras con núcleo en banda (G-MDCS); ambas son grandes, tienen poca capacidad migratoria, fagocitosis reducida y estallido respiratorio débil. Además, estos neutrófilos se han asociado a procesos inflamatorios crónicos debido a que presentan vida media larga¹². Las principales funciones protumorales de los neutrófilos son sostenidas por un ambiente rico en TGF- β ¹⁸, estas incluyen la generación de mutaciones mediante el daño a DNA generado por ROS⁸⁹, la activación de factores de transcripción que promueven la proliferación y supervivencia de las células tumorales (NF- κ B⁹⁰, PI3K/AKT⁹¹ y MAPK⁹²) y la supresión de CTLs⁹³. Además, la liberación de NETs puede favorecer la metástasis al promover la transición epitelio mesénquima a través de la degradación de la matriz extracelular por medio de la MMP9 y la elastasa de neutrófilo (NE)⁹⁴.

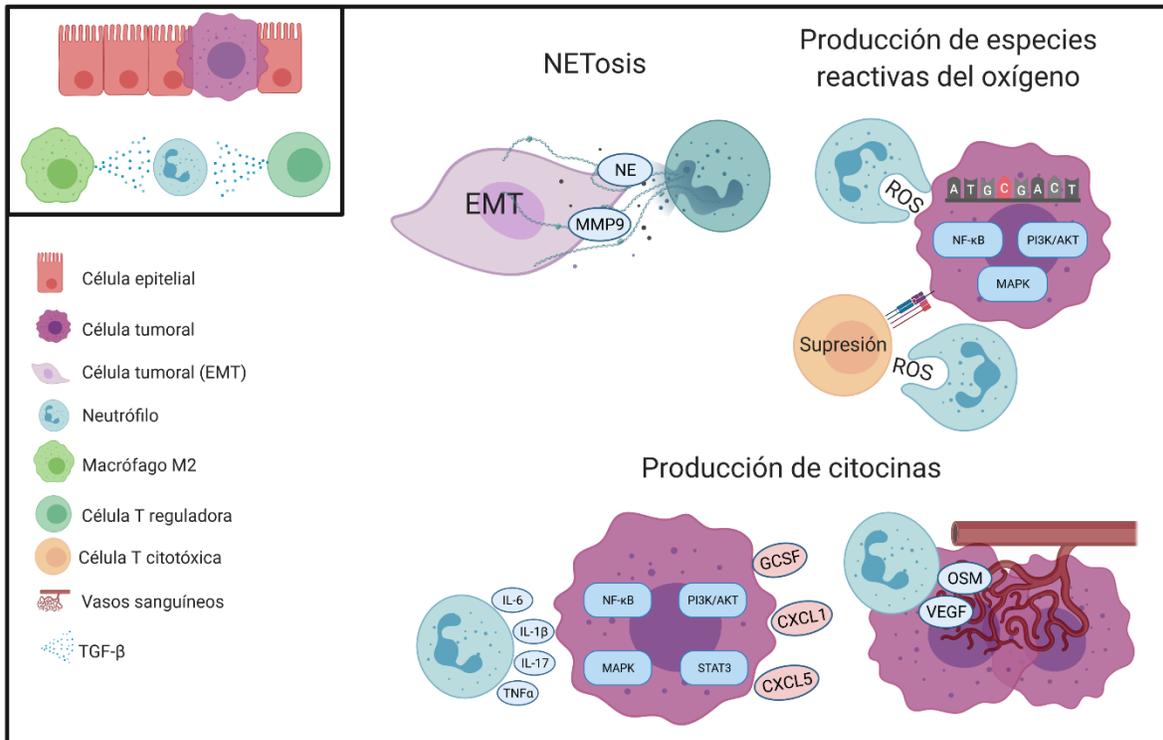


Figura 3. Funciones protumorales de los neutrófilos. Los mecanismos protumorales de los neutrófilos incluyen la generación de mutaciones a través del daño al DNA mediado por ROS, la degradación de la matriz extracelular mediante la liberación de proteasas por NETosis, la activación de factores protumorales a través de la producción de citocinas y la supresión de la respuesta inmune antitumoral. Estas funciones son sostenidas por un ambiente rico en TGF- β que es generado por linfocitos T reguladoras y macrófagos M2.

La producción de citocinas genera retroalimentación entre neutrófilos y células tumorales. Por una parte, los neutrófilos, a través de la producción de IL-6, IL-17, IL-1 β y TNF- α activan vías de señalización como NF- κ B, MAPK, PI3K/AKT y STAT3 en las células tumorales^{66,95}. Así mismo, otros productos de los neutrófilos como la oncostatina 6 (OSM) y VEGF favorecen la formación de nuevos vasos sanguíneos⁹⁶. Por otra parte, las células tumorales promueven el reclutamiento de neutrófilos al tumor por medio de la producción de G-CSF, CXCL1 y CXCL5⁹⁷.

3.3 Neutrófilos en cáncer colorrectal

La relación de la proporción neutrófilos/linfocitos (NLR) en sangre de pacientes con cáncer colorrectal ha sido utilizada como un factor pronóstico del grado de desarrollo tumoral y sobrevida del paciente. Diversos estudios han reportado que valores altos de NLR, por aumento en la proporción de neutrófilos, predicen un estadio tumoral más avanzado y menor esperanza de vida^{98,99}. Por otra parte, la infiltración de neutrófilos al tumor ha sido objeto de discusión. Mientras que algunos reportes asocian un mayor número de neutrófilos intratumorales con menor supervivencia global, otros estudios sugieren que la presencia de neutrófilos intratumorales en estadios tempranos favorece la supervivencia global de los pacientes^{100,101}.

En el modelo de CAC AOM/DSS, el papel de los neutrófilos también resulta controversial. Por una parte, se reportó que estas células inhiben el desarrollo tumoral a través del control de la microbiota intestinal¹⁹. Así mismo, la deficiencia de neutrófilos CD177⁺ se relaciona con un aumento en el establecimiento de tumores¹⁰². Por otra parte, se demostró que los neutrófilos favorecen la formación de tumores a través de la activación del eje IL-1 β /IL-6^{21,22}. Además, la eliminación de esta población celular deriva en la reducción del tamaño y número de tumores²². Finalmente, la regulación de la microbiota intestinal, a través de antibióticos, previene el daño tisular mediado por neutrófilos infiltrantes²⁰.

4 Regulación de los neutrófilos por STAT1

Al ser activado por interferones de tipo I y II STAT1 se ha relacionado con la respuesta inmune antiviral¹⁰³. Sin embargo, diversos reportes demuestran su participación en procesos inflamatorios que involucran la expresión de quimiocinas, diferenciación y muerte de leucocitos y producción de ROS y RNI¹⁰⁴.

La regulación que ejerce STAT1 sobre las principales quimiocinas reconocidas por los neutrófilos (CXCL1, CXCL2) depende de la población celular observada. Se ha reportado que en células β -pancreáticas, STAT1 coopera con NF- κ B para aumentar la producción de estas quimiocinas¹⁰⁵. Por otra parte, en macrófagos STAT1 actúa como un represor de la transcripción de estas

proteínas^{106,107}. Además, se observó acumulación de neutrófilos en sangre, bazo y tumores de ratones STAT1^{-/-} sometidos a modelos de cáncer de mama¹⁰⁸ y CRC⁹.

Hasta ahora la participación de STAT1 en la activación de los neutrófilos ha sido poco estudiada. No obstante, se ha observado la fosforilación de este factor de transcripción en neutrófilos activados con LPS¹⁰⁹. Por otra parte, se ha demostrado que la incubación de neutrófilos con IFN- γ potencia su actividad cuando éstos se encuentran ante un segundo estímulo¹¹⁰. Entre los principales efectos que ejerce IFN- γ sobre los neutrófilos se encuentra el aumento de la producción y liberación de citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , el incremento de la producción de ROS a través de la sobreexpresión de las subunidades p47^{phox} y gp91^{phox} de la NADPH oxidasa y el mejoramiento de la capacidad fagocítica mediante la sobreexpresión de los receptores CD16/32¹¹⁰⁻¹¹². Por otra parte, se ha observado que la ausencia de IFN- γ genera defectos en la liberación de NETs¹¹³, mientras que los interferones tipo I y II inducen la liberación de NETs en neutrófilos maduros¹¹⁴.

Recientemente se ha comprobado que los neutrófilos tienen una vida media de 5 días o más. De manera interesante, los interferones de tipo I, II y G-CSF alargan la vida de estas células en un proceso mediado por la fosforilación de STAT1 y STAT3^{112,115}. Estos descubrimientos abrieron paso al estudio de los neutrófilos en procesos de inflamación crónica, donde, se demostró que IFN- γ induce la expresión de PDL1 en esta población celular¹¹⁶⁻¹¹⁸.

Justificación

En el CAC, los mediadores producidos por el infiltrado inflamatorio favorecen el establecimiento de tumores a través del daño al DNA y la activación de factores protumorales como β -catenina, NF- κ B y STAT3^{10,11}. De manera interesante, en un modelo murino de CAC inducido por AOM/DSS se observó que los ratones STAT1^{-/-} presentan desarrollo tumoral acelerado e incremento de neutrófilos en sangre y bazo, sugiriendo que el desarrollo de CAC en ausencia de STAT1 podría promover la producción y reclutamiento de neutrófilos y que estas células posiblemente juegan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad. No obstante, la participación de los neutrófilos en el desarrollo de CAC es controversial debido a que se ha sugerido que estas células inhiben el desarrollo tumoral mediante el control de la microbiota^{19,20}, sin embargo, estas células también producen mediadores inflamatorios que favorecen el desarrollo de tumores incluyendo ROS, IL-1 β , IL-6 y TNF- α ^{21,22}. Es por esto que el presente estudio evaluó la participación de los neutrófilos en el desarrollo de CAC en ratones deficientes de STAT1, utilizando el modelo de CAC-AOM/DSS.

Hipótesis

STAT1 promueve el reclutamiento, activación y muerte de los neutrófilos, por lo tanto, los neutrófilos deficientes de STAT1 presentarán diferencias funcionales que favorecerán el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis.

Objetivo general

Analizar la participación de neutrófilos deficientes de STAT1 durante el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis.

Objetivos particulares

1. Comparar la gravedad en el desarrollo de CAC en ratones silvestres y ratones STAT1^{-/-}.
2. Evaluar el reclutamiento de neutrófilos durante el desarrollo de CAC en ratones silvestres y ratones STAT1^{-/-}.
3. Establecer las diferencias funcionales entre los neutrófilos de ratones silvestres y ratones STAT1^{-/-}.
4. Determinar si las funciones efectoras de neutrófilos de ratones silvestres y STAT1^{-/-} favorecen o inhiben el desarrollo de CAC.

Material y métodos

1. Manejo animal

Se emplearon ratones hembra silvestres (WT) y STAT1^{-/-} (Anexo1) con fondo genético BALB/c de ocho a diez semanas de edad que se mantuvieron en ambiente libre de patógenos en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales se alimentaron con Purina Diet 5015 (Purina) y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales y manejo animal se llevaron a cabo bajo las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud (EE. UU)¹¹⁹. y fueron aprobados por el Comité de Ética de la FESI-UNAM (CE/FESI/042017/1168) (Anexo 2).

2. Desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis

Para el desarrollo de CAC se utilizó el modelo AOM/DSS^{120,121}. Ratones WT y STAT1^{-/-} recibieron una sola dosis de AOM 12.5 mg/kg (Sigma-Aldrich, EE. UU) mediante inyección intraperitoneal. Cinco días después, los ratones se sometieron a tres ciclos de DSS. Cada ciclo consistió en la administración de DSS 2% en agua *ad libitum* (MW: 40 000, Alfa, Canadá) durante siete días y un periodo de descanso con agua regular *ad libitum* durante 14 días.

Los ratones se monitorearon y se pesaron una vez por semana. Además, se obtuvieron muestras de sangre por punción en cola los días 28, 48 y 68. Al finalizar el segundo (día 48) y tercer ciclo (día 68), los ratones se sacrificaron en cámara de CO₂ y se realizó la disección del bazo y colon. El colon se lavó con solución fisiológica (SF) para la cuantificación y medición del diámetro de tumores con ayuda del microscopio estereoscópico. Posteriormente, se dividieron en secciones que se usaron en el análisis histológico y de proteínas. Por otra parte, los bazos se perfundieron en SF con agujas 25G x 16 mm.

3. Análisis histológico

3.1 Procesamiento del tejido

Secciones longitudinales del colon se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 h. Los tejidos se deshidrataron en etanol/xilol absoluto y se incluyeron en parafina (Leica Geosystems, Switzerland). Posteriormente, se obtuvieron secciones de 5 µm de espesor y se montaron en portaobjetos previamente tratados con Poli-L-lisina (1:10) (Sigma-Aldrich, EE. UU). Finalmente, se eliminó la parafina a 58 °C¹²².

3.2 Análisis histopatológico

Las muestras se rehidrataron en una serie de concentraciones descendentes de etanol. Posteriormente, se tiñeron con hematoxilina-eosina (Sigma-Aldrich, EE. UU)¹²³ para visualizar la morfología o con el colorante azul alcian (Merck Millipore, EE. UU)¹²⁴ para observar células caliciformes. Finalmente, las muestras se deshidrataron en una serie de concentraciones ascendentes de etanol y las laminillas se cubrieron con cubreobjetos empleando el medio de montaje entellan. El análisis histopatológico se realizó utilizando las guías Colorectal tumors: The histology guide¹²⁵ y Colorectal carcinoma: Pathologic aspects¹²⁶ con apoyo del atlas Histology Guide virtual microscopy laboratory¹²⁷.

3.3 Inmunohistoquímica

Las muestras se rehidrataron en una serie de concentraciones descendentes de etanol. Posteriormente, se realizó la recuperación antigénica en *buffer* DIVA (pH 6) (1:10) (BioCare Medical, EE. UU), calentando en olla de presión (100 °C-15 min). Para evitar choque térmico, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente. Después, se realizó el bloqueo de peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% en metanol y el bloqueo de uniones inespecíficas con albumina sérica bovina (BSA) al 2% en PBS. Posteriormente, se procedió a la incubación con los anticuerpos primarios respectivos (Tabla 1) toda la noche a 4 °C.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en Inmunohistoquímica.

Anticuerpo	Isotipo	Marca	Dilución
Anti-E-Cadherina	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:200
Anti- β -Catenina (activa)	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:1000
Anti-Ly6G	Rat IgG	Tonbo	1:100
HRP anti-Rabbit IgG	Policlonal	Biolegend	1:500
HRP anti-Rat IgG	Policlonal	Tonbo	1:500

Al siguiente día, los tejidos se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) correspondientes al isotipo del anticuerpo primario (Tabla 1) durante 1 h a temperatura ambiente. El revelado se realizó con el sustrato diaminobencidina (7 min) (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, las muestras se deshidrataron en una serie de concentraciones ascendentes de etanol y se montaron en medio entellan. Todas las imágenes se obtuvieron en el microscopio óptico Axio Vert.A1 (Carl Zeiss) bajo el objetivo 20x y se analizaron cuatro campos de cada muestra empleando el programa ImageJ.

4. Análisis de proteínas

4.1 Extracción de proteínas

Una vez que se extrajo el colon, se obtuvo una sección de aproximadamente 0.5 cm y se congeló con nitrógeno líquido para su almacenamiento a -70 °C. La extracción de proteínas se realizó empleando el RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit (Norgen Biotek Corp, Canadá) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, EE. UU) siguiendo las instrucciones del inserto.

4.2 Western blot

Todas las muestras fueron ajustadas a una concentración de 30 μ g en *buffer* de carga 6x y se realizó electroforesis SDS-PAGE con geles de poliacrilamida al 10% en presencia de SDS. Para este procedimiento se utilizó la cámara Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad) con *buffer* de corrida (Tris 25 mM, SDS 0.1%, glicina 250 mM) a 90 V, 150 mA durante dos horas. Se empleó el marcador de peso molecular de amplio rango (Bio-Rad laboratories, EE. UU).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en Western blot.

Anticuerpo	Isotipo	Marca	Dilución
Anti- β -actina	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:1000
Anti-pSTAT3	Rabbit IgG	Cell Signalling	1:1000
Anti-p NF- κ B (p65)	Mouse IgG	Cell Signalling	1:1000
HRP anti-Rabbit IgG	Policlonal	Biologend	1:500
HRP anti-Mouse IgG	Policlonal	Biologend	1:500

Las proteínas separadas por peso molecular se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad laboratories, EE. UU) en cámara húmeda Mini omniPAGE Sub Blot (Cleaver Scientific, Ltd) y *buffer* de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, Metanol 20 %) durante 100 min a 80 V. Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche al 10% (Bio-Rad laboratories, EE. UU) a temperatura ambiente durante 2 h y se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 2) a 4 °C toda la noche.

Se agregaron los anticuerpos secundarios acoplados a HRP correspondientes (Tabla 2) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Para la detección de proteínas se utilizó el reactivo de quimioluminiscencia West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. La señal se detectó con el equipo Alliance Q9 (UVITEC, UK) y se realizó el análisis densitométrico con ayuda del software NineAlliance (UVITEC, UK). Finalmente, el análisis densitométrico se realizó tomando como referencia la proteína constitutiva β -catenina.

5. Citometría de flujo

5.1 Procedimiento general de tinción

Se tomaron 1×10^6 células de las muestras de bazo, tumor y ensayos de supresión. Las células se lavaron agregando 1 mL de *buffer* FACS (PBS, Suero Bovino Fetal 2%, EDTA 2mM), se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Para bloquear uniones inespecíficas, se agregaron 0.5 μ L de anticuerpo anti-CD16/32 diluidos en 25 μ L de *buffer* FACS y se incubó durante

15 min a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 100 μL de la mezcla de anticuerpos de interés (Tabla 3) y se incubó durante 30 min a 4 $^{\circ}\text{C}$.

Para eliminar el exceso de anticuerpo, se realizó un lavado y el botón celular se suspendió en 500 μL de *buffer* FACS. Todas las muestras se procesaron en el equipo Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fischer Scientific). Se realizó el conteo absoluto de linfocitos T citotóxicos (CD3^+ , CD8^+), monocitos (CD11b^+ , Ly6C^{hi}) y neutrófilos (CD11b^+ , Ly6C^+ , Ly6G^+) a través del método volumétrico¹²⁸. El cálculo se realizó tomando como referencia el conteo de células en cámara de Neubauer y se utilizaron las siguientes formulas:

$$\frac{\text{Número de células}}{\mu\text{L}} = \frac{\text{Número de eventos positivos}}{\text{Volúmen grabado}} \times \text{factor de dilución}$$

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{Número total de células}}{\text{Número de células en la muestra}}$$

Todos los datos se analizaron en el programa FlowJo_V10, siguiendo la estrategia de análisis correspondiente (Fig. 4).

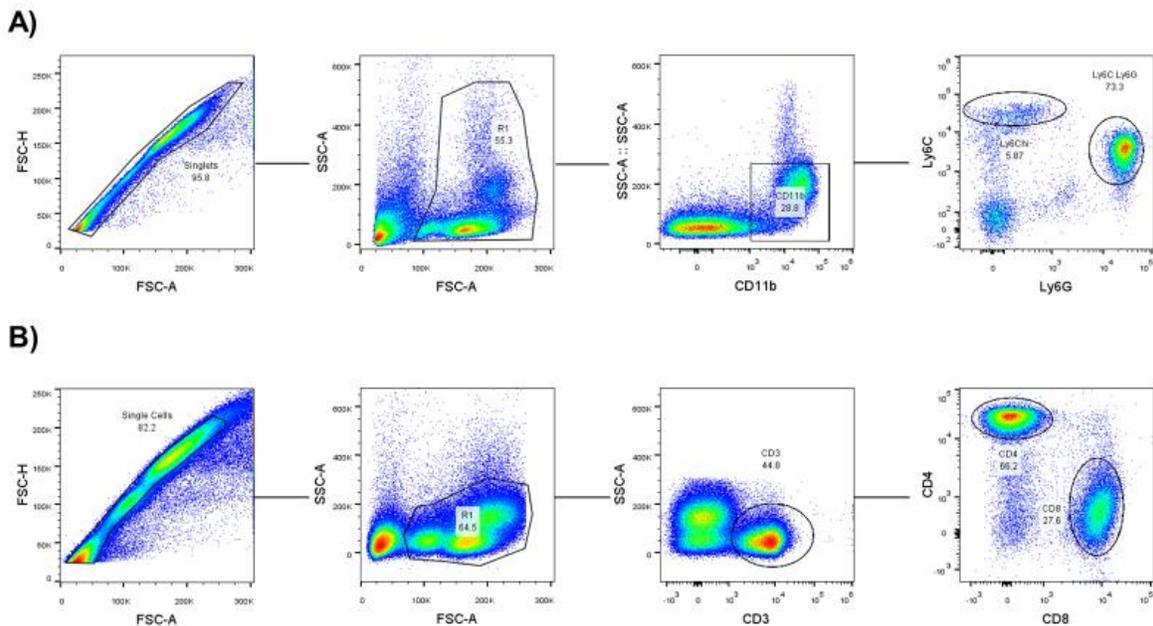


Figura 4. Estrategia de análisis para citometría de flujo. (A) células mieloides y (B) células linfoides.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

	Anticuerpo	Fluorocromo	Excitación/Emisión (nm)	Dilución	Marca
Células mieloides	Anti-CD11b	APC-Cy7	638/790	1:1000	BD
	Anti-Ly6C	BV711	405/711	1:1000	Biolegend
	Anti-Ly6G	PE-Cy7	488/780	1:1000	Tonbo
Células linfoides	Anti-CD3	APC-Cy7	638/790	1:100	BD
	Anti-CD4	APC	638/660	1:100	Biolegend
	Anti-CD8	BV605	405/605	1:1000	Biolegend

5.2 Citometría de flujo de células circulantes

Se obtuvo sangre periférica por punción en cola de los ratones sometidos al modelo AOM/DSS en tubos vacutainer EDTA (BD, EE. UU.). A continuación, se colocaron 50 μ L de sangre por muestra y se adicionaron 50 μ L de *buffer* FACS y se bloquearon uniones inespecíficas. Posteriormente, se agregaron 100 μ L de la mezcla de anticuerpos de interés (Tabla 3) y se incubó durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, se agregaron 2 mL de solución hemolizante (Tris-HCl 0.15 M, NH₄Cl 0.01 M, Ph 7.56) y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron dos lavados con 2 mL de *buffer* FACS, se decantó y se suspendió en 500 μ L.

5.3 Citometría de flujo de células obtenidas de bazo

A las muestras de bazo se les agregaron 5 mL de solución hemolizante y se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 5 mL de SF y se centrifugó a 1500 rpm por 10 min. Las células se suspendieron en medio RPMI completo para su conteo en cámara de Neubauer. Para finalizar se siguió el protocolo general de tinción anteriormente mencionado.

5.4 Citometría de flujo de células obtenidas de tumor

Se extrajo el colon de los ratones sometidos al modelo AOM/DSS y se diseccionaron los tumores. Se realizaron cinco lavados con Solución Salina Balanceada de Hank (HBSS) sin calcio y sin magnesio para retirar mucinas. Posteriormente, se incubaron las muestras en HBSS/SBF 2%/EDTA 2 mM durante 30 min, en agitación, a 37 °C.

A continuación, los tumores se cortaron en porciones menores a 2 mm y se incubaron en medio RPMI completo que contenía DNAsa 40 µg/mL (Sigma-Aldrich, EE. UU) y Colagenasa IV 0.5 mg/mL (Sigma-Aldrich, EE. UU) durante 30 min, en agitación a 37 °C.

La suspensión obtenida se filtró en Falcon Cell Strainer de 100 µm y 40 µm (BD, EE. UU) y se colocó en un gradiente de Percoll (Formerly GE Healthcare Life Sciences) manteniendo una interfase a una concentración de 30% y 70%. La muestra se centrifugó a 1500 rpm durante media hora y se recuperaron las células presentes entre ambas concentraciones de Percoll. Las células se lavaron dos veces agregando medio RPMI completo y centrifugando a 1500 rpm durante 10 min. Finalmente, las células se suspendieron en medio RPMI completo para su conteo en cámara de Neubauer y su procesamiento conforme al protocolo general de tinción anteriormente mencionado.

6. Ensayo de supresión

Se utilizó el ensayo de dilución del colorante CellTrace Violet Cell Proliferation Kit (Thermo Fischer Scientific) para comprobar la capacidad supresora de los neutrófilos. Para este ensayo se utilizaron placas de 96 pozos de fondo plano previamente incubadas (24 h a 4°C) con anticuerpos anti CD3 (Biolegend Clona: 17A2) (0.5 µg/mL) y anti CD28 (Tonbo Clona: 37.51) (1 µg/mL). A continuación, se marcaron células del bazo de ratones WT sanos con el colorante Cell Trace Violet y se colocaron 100 000 células por pozo en medio RPMI completo/ β -mercaptoetanol 0.5mM (GIBCO). La placa se incubó durante 4 h en condiciones estándar (37°C CO₂ 5%). Al finalizar la incubación, a cada pozo con 100 000 células marcadas se le agregaron 25 000 (ensayo 4:1) o 50 000 (ensayo 2:1) neutrófilos aislados (96% de pureza) del bazo de ratones WT CAC día 68 o STAT1^{-/-} CAC día 68. La placa se incubó durante 72 h en condiciones estándar y se realizó la tinción para linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (Tabla 4) siguiendo el protocolo general previamente mencionado. El análisis de datos se realizó en el programa FCS Express 7 (De Novo Software) para modelar y obtener el índice de proliferación.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en ensayo de proliferación.

Anticuerpo	Fluorocromo	Excitación/Emisión (nm)	Dilución	Marca
Cell trace violet	-	405/605	5 μ M	Thermo Fischer
Anti-CD3	APC-Cy7	638/790	1:100	BD
Anti-CD4	APC	638/660	1:1000	Biolegend
Anti-CD8	BV621	405/605	1:1000	Biolegend

6.1 Aislamiento y marcaje de células de bazo

Se obtuvo el bazo de ratones WT sanos y se perfundieron en SF con agujas 25G x 16 mm. Se agregaron 5 mL de solución hemolizante y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Después, se agregaron 5 mL de SF y se centrifugó a 1500 rpm por 10 min. Las células se suspendieron en medio RPMI completo para su conteo en cámara de Neubauer. Posteriormente, 1×10^7 células se marcaron con el colorante CellTrace Violet Cell Proliferation Kit 10 μ M ((Thermo Fischer Scientific) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Las células marcadas, se suspendieron en medio RPMI completo + β -mercaptoetanol 0.05 mM (Gibco).

6.2 Aislamiento de neutrófilos por citometría de flujo

Se extrajo el bazo de los ratones sometidos al modelo AOM/DSS y se perfundieron en SF con agujas 25G x 16 mm. Posteriormente, se agregaron 5 mL de solución hemolizante y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se agregaron 5 mL de SF y se centrifugó a 1500 rpm por 10 min. Las células se suspendieron en medio RPMI completo para su conteo en cámara de Neubauer.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en aislamiento celular por citometría de flujo.

Anticuerpo	Fluorocromo	Excitación/Emisión (nm)	Dilución	Marca
CD11b	APC-Cy7	638/790	1:1000	BD
Ly6C	FITC	488/517	1:250	Biolegend
Ly6G	PE	488/576	1:200	Biolegend
7AAD	-	488/647	1:30	Tonbo

Se tomaron 1×10^7 células y se lavaron con 2 mL de *buffer* FACS. Para bloquear uniones inespecíficas, se agregaron 5 μ L de anticuerpo anti-CD16/32 disueltos en 250 μ L de *buffer* FACS y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 1000 μ L de la mezcla de anticuerpos de interés (Tabla 5) y se incubó durante 30 min a 4 °C. Las muestras se suspendieron en 3.5 mL de *buffer* FACS y se purificaron con ayuda del sistema automatizado del equipo FACS Aria Fusion III (BD, EE. UU.).

7. Ensayo funcional de neutrófilos

7.1 Enriquecimiento de neutrófilos por selección negativa

Se extrajeron fémures y tibias de ratones WT y STAT1^{-/-} sanos y se colocaron en solución fisiológica. Posteriormente, los huesos se desinfectaron en etanol al 70% durante un minuto y se mantuvieron en medio RPMI completo. Las muestras se perfundieron en SF con una aguja 25G x 16 mm y la médula ósea obtenida se centrifugó a 1500 rpm por 10 min. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se suspendió en medio RPMI completo para su conteo en cámara de Neubauer.

Para el enriquecimiento de neutrófilos se utilizó el EasySep Mouse Neutrophil Enrichment Kit (STEMCELL Technologies) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Finalmente, los neutrófilos (86% de pureza) se lavaron y suspendieron en medio RPMI completo.

7.2 Medición de especies reactivas del oxígeno

Se colocaron 1.5×10^6 neutrófilos, aislados de médula ósea, por pozo en una placa de 24 pozos y se agregó 1 mL de medio RPMI completo + 2',7'-Diclorofluoresceína diacetato (DCFH) 15 μ M (Sigma-Aldrich, EE. UU) + PMA 100 nM (Sigma-Aldrich, EE. UU). La placa se incubó durante 15 min en condiciones estándar. Posteriormente, las muestras se lavaron con 1 mL de *buffer* FACS y se realizó la tinción correspondiente (Tabla 6) siguiendo el protocolo general previamente descrito.

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en ensayo DCFH.

Anticuerpo	Fluorocromo	Excitación/Emisión (nm)	Dilución	Marca
Anti-CD11b	APC-Cy7	638/790	1:1000	BD
Anti-Ly6C	BV711	405/711	1:1000	Biolegend
Anti-Ly6G	PE-Cy7	488/780	1:1000	Tonbo
DCFH	-	488/529	15 nM	Sigma-Aldrich

7.3 Identificación de Trampas Extracelulares de DNA

En portaobjetos tratados con Poli-L-lisina, se colocaron 10 000 neutrófilos en medio RPMI completo + LPS 1ug/mL + PMA 100 nM y se incubaron durante 18 h en condiciones estándar. Posteriormente, las células se fijaron con metanol y se realizó el bloqueo de uniones inespecíficas con BSA 2%. Las células se tiñeron con el anticuerpo anti Ly6G acoplado al fluorocromo ficoeritrina y se incubó durante 2 h a 4 °C. A continuación, las muestras se prepararon en medio de montaje con DAPI, se observaron en el microscopio de fluorescencia Axio Vert.A1, Carl Zeiss y se identificaron células Ly6G positivas que presentaron liberación de NETs (hebras de DNA extra citoplasmáticas positivas para DAPI). Finalmente se realizó el conteo de las trampas en 4 campos diferentes de diferentes láminas.

7.4 Evaluación de muerte celular en neutrófilos

En placas de 24 pozos, se colocaron 1×10^6 células por pozo en 1 mL de medio RPMI completo y se incubó durante 24 h en condiciones estándar. Posteriormente, se realizó la tinción correspondiente (Tabla 7) siguiendo el protocolo general de tinción previamente descrito.

Tabla 7. Anticuerpos utilizados en ensayo de apoptosis.

Anticuerpo	Fluorocromo	Excitación/Emisión (nm)	Dilución	Marca
Anti-CD11b	APC-Cy7	638/790	1:1000	BD
Anti-Ly6C	BV711	405/711	1:1000	Biolegend
Anti-Ly6G	PE-Cy7	488/780	1:1000	Tonbo
Anti-Anexina V	PE	488/576	1:20	Tonbo
7AAD	-	488/647	1:30	Tonbo

8. Análisis estadístico

Los datos se analizaron comparando los grupos de ratones WT contra los ratones STAT1^{-/-}. Se realizaron tres experimentos independientes con n igual a cuatro en el modelo AOM/DSS y dos experimentos independientes con n igual a cuatro para evaluar la funcionalidad de los neutrófilos. Se empleó la prueba estadística paramétrica ANOVA de dos vías y la prueba de comparación múltiple de Tukey para identificar las diferencias significativas. Todas las pruebas estadísticas se efectuaron bajo un valor alfa de 0.05 con ayuda del programa GraphPad Prism 6.

Resultados

1. La ausencia de STAT1 favorece el establecimiento de tumores

Estudios previos indican que la translocación de STAT1 al núcleo y el aumento del mRNA de esta proteína se asocian con aumento de la supervivencia global en pacientes con CRC^{5,6,7,8}. Además, en el modelo AOM/DSS se ha demostrado que la ausencia de STAT1 aumenta la gravedad de la inflamación intestinal y acelera el desarrollo tumoral⁹. Para confirmar estos hallazgos, el presente estudio utilizó el modelo AOM/DSS en ratones WT y STAT1^{-/-}.

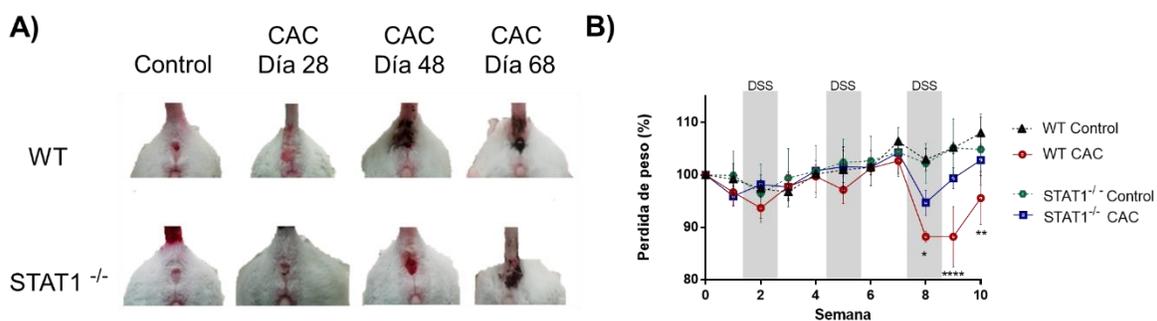


Figura 5. Los ratones STAT1^{-/-} muestran pérdida de peso moderada y sangrado hasta el día 68. Para determinar diferencias en el desarrollo de la enfermedad, los ratones tratados con AOM/DSS (denotado como CAC) (A) se monitorearon y (B) se pesaron semanalmente; datos representativos de 3 experimentos independientes (media \pm SD, n=4/grupo/experimento). Las diferencias significativas obtenidas por prueba ANOVA de dos vías y prueba Tukey representan la comparación del grupo WT CAC contra STAT1^{-/-} CAC. $\alpha=0.05$ * $p=0.02$, ** $p=0.009$, **** $p<0.0001$.

Los grupos se monitorearon semanalmente para registrar signos clínicos como el sangrado y la pérdida de peso. Los ratones STAT1^{-/-} mostraron pérdida de peso moderada (5%) y sangrado hasta el día 68. En contraste, los ratones WT manifestaron pérdida de peso considerable (12%) y sangrado desde el día 48 (Fig, 5). Notablemente, en el día 48 la evaluación macroscópica del colon no exhibió diferencias significativas en el número y tamaño de los tumores (menores a 2 mm). No obstante, en el día 68 los ratones STAT1^{-/-} presentaron mayor número de tumores menores a 2 mm, mientras que el número de tumores mayores a 2 mm fue similar en ambos grupos (Fig. 6). Estos resultados sugieren que la ausencia de STAT1 favorece el establecimiento de tumores.

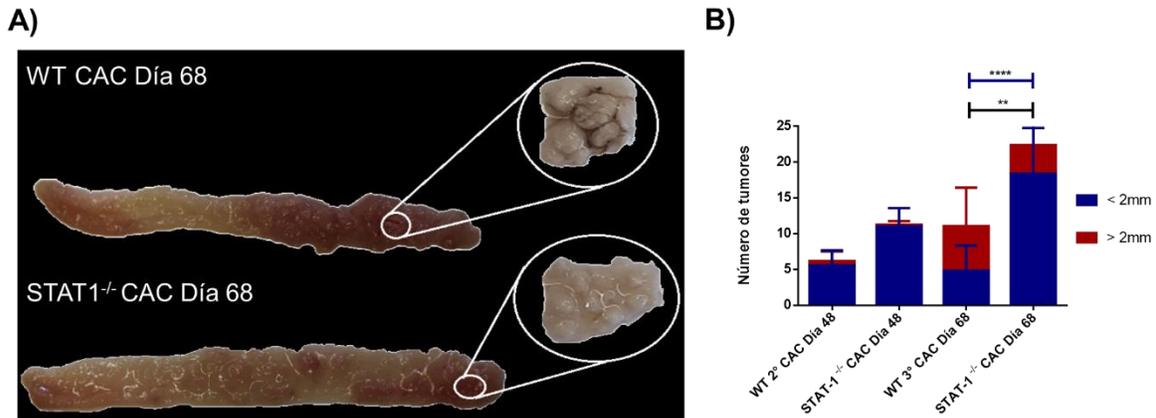


Figura 6. La ausencia de STAT1 favorece el establecimiento de tumores. Para determinar diferencias en el desarrollo tumoral. (A) se extrajo el colon de ratones tratados con AOM/DSS. (B) Los tumores se contaron y midieron en el microscopio estereoscópico; datos representativos de 3 experimentos independientes (media± SD, n=4/grupo/experimento). Las diferencias significativas obtenidas por prueba ANOVA de dos vías y prueba Tukey representan la comparación entre el número total de tumores del grupo WT CAC día 68 contra STAT1^{-/-} CAC día 68 (barra negra) y el número de tumores menores a 2 mm del grupo WT CAC día 68 contra STAT1^{-/-} CAC día 68 (barra azul). $\alpha=0.05$ ** $p=0.004$, **** $p<0.0001$.

2. Los tumores STAT1^{-/-} presentan mayor grado de desarrollo

Debido a que las principales diferencias se observaron en el día 68, se realizó la evaluación histopatológica de los tumores en este punto del modelo. A través de la tinción hematoxilina-eosina se demostró que ambos grupos desarrollaron arreglos glandulares displásicos y núcleos hiper cromáticos característicos del desarrollo de CAC. De manera interesante, el grupo STAT1^{-/-} presentó mayor desarreglo glandular con tendencia a un estado indiferenciado. Además, se observó invasión a la submucosa y pérdida del estrato *muscularis mucosae* (Fig. 7A). Por otra parte, mediante la tinción azul alcian se determinó que la reducción de células caliciformes fue similar en ambos grupos (Fig. 7B). Estas observaciones demuestran que los ratones STAT1^{-/-} presentan tumores con mayor grado de dediferenciación.

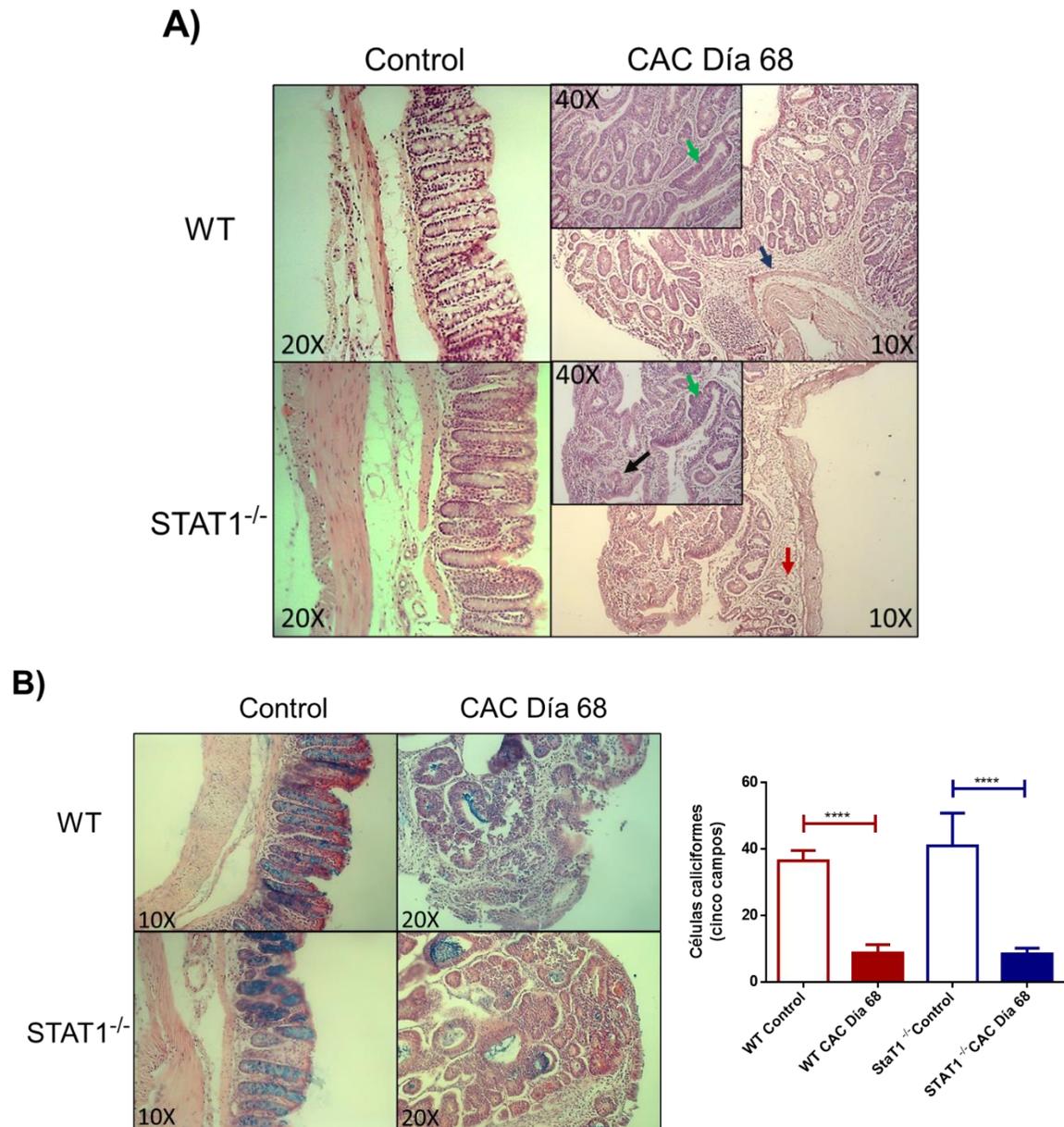


Figura 7. Los tumores inducidos con AOM/DSS, en ratones STAT1^{-/-}, tienen mayor grado de desarrollo. Para evaluar las diferencias en el desarrollo tumoral (A) se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina para visualizar la morfología y (B) con el colorante azul alcian para observar células caliciformes. Datos representativos de 3 experimentos independientes (media± SD, n=4/grupo/experimento). Las flechas indican diferentes estructuras histológicas identificadas. Verde: arreglos glandulares con núcleos hiper cromáticos, Azul: *muscularis mucosae*, Negro: arreglo indiferenciado, Rojo: invasión a la submucosa. Las diferencias significativas obtenidas por prueba ANOVA de una vía y prueba Tukey representan la comparación entre los grupos WT control contra WT CAC día 68 (barra roja), STAT1^{-/-} control contra STAT1^{-/-} CAC día 68 (barra azul). $\alpha=0.05$ **** $p=0.0001$.

3. La ausencia de STAT1 promueve la activación de los factores STAT3 y NF- κ B

La pérdida de moléculas de adhesión, como E-cadherina, provoca la ruptura de la barrera epitelial abriendo paso al establecimiento de procesos inflamatorios patológicos que favorecen el desarrollo de CAC¹²⁹. Por ende, la reducción de esta molécula fue evidente en los grupos sometidos al modelo AOM/DSS, sin embargo, no se observaron diferencias entre los grupos WT CAC 68 días y STAT1^{-/-} CAC 68 días (Fig. 8A).

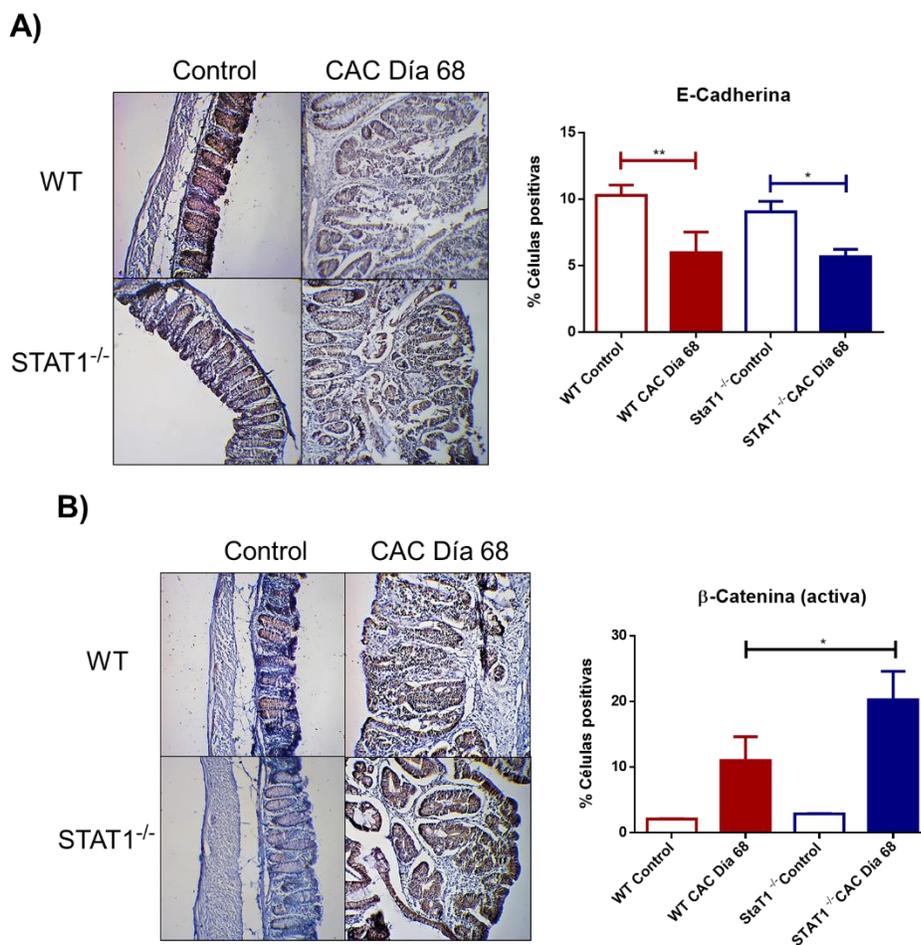


Figura 8. Los ratones STAT1^{-/-} presentan sobre expresión de marcadores asociados a gravedad. Para confirmar la gravedad del CAC se realizaron inmunohistoquímicas y se identificaron diferentes marcadores moleculares asociados al desarrollo de CAC exacerbado como (A) la pérdida de E-cadherina y (B) la activación de β -catenina. Datos representativos de 3 experimentos independientes (media \pm SD, n=4/grupo/experimento). Las diferencias significativas obtenidas por prueba ANOVA de una vía y prueba Tukey representan la comparación entre los grupos WT control contra WT CAC día 68 (barra roja), STAT1^{-/-} control contra STAT1^{-/-} CAC día 68 (barra azul) y WT CAC día 68 contra STAT1^{-/-} CAC día 68 (barra negra). $\alpha=0.05$ * $p=0.02$, ** $p=0.008$.

La acumulación de β -catenina en el citoplasma de las células tumorales es favorecida por la pérdida de E-cadherina y la inactivación del complejo proteico de destrucción de β -catenina. Dicho complejo promueve la degradación de este factor de transcripción a través de su fosforilación y destrucción en el proteasoma. Al no estar fosforilada, β -catenina se transloca al núcleo y promueve la transcripción de genes como c-myc y ciclina D1¹³⁰. De acuerdo con lo esperado, se observó un incremento en la expresión de β -catenina activa en ambos grupos. No obstante, el aumento fue mayor en el grupo STAT1^{-/-} CAC 68 días (Fig. 8B). De manera interesante, este grupo también exhibió un incremento en la expresión de ciclina D1 (Fig. 9D).

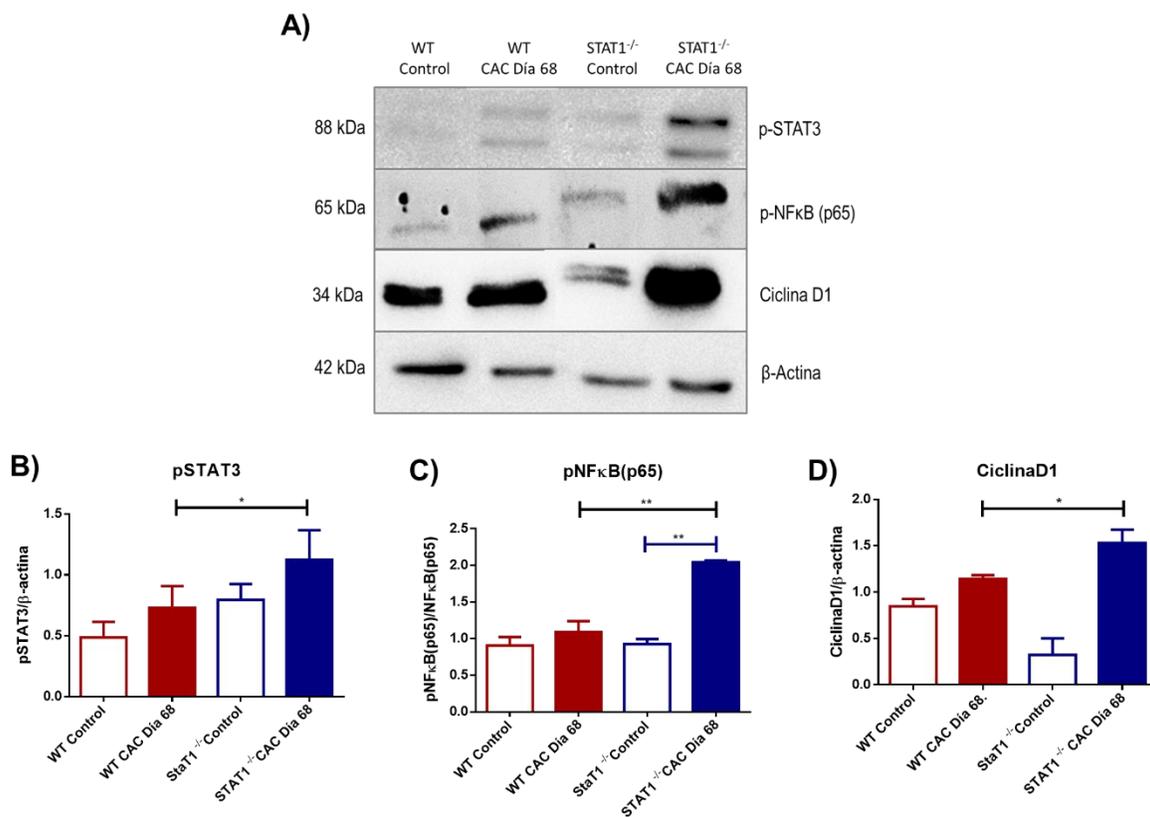


Figura 9. STAT1 impide la sobre activación de STAT3 y NF- κ B. Se realizó *western blot* (A) para identificar diferentes marcadores moleculares enriquecidos en los tumores STAT1^{-/-} al día 68. Se muestran los gráficos de (B) la fosforilación de STAT3, (C) la fosforilación de NF- κ B (p65) y (D) la expresión de ciclina D1. Datos representativos de 3 experimentos independientes (media \pm SD, n=4/grupo/experimento). Las diferencias significativas obtenidas por prueba ANOVA de una vía y prueba Tukey representan la comparación entre los grupos STAT1^{-/-} control contra STAT1^{-/-} CAC día 68 (barra azul) y WT CAC día 68 contra STAT1^{-/-} CAC día 68 (barra negra). $\alpha=0.05$ * $p=0.04$, ** $p=0.001$.

La inflamación crónica del intestino representa un proceso fundamental en el desarrollo del CAC. Los cambios en el infiltrado inflamatorio generan diferencias en el microambiente intestinal a través de la producción de mediadores inflamatorios^{10,11}. Estos mediadores favorecen la activación de proteínas que promueven el progreso tumoral incluyendo a STAT3 y NF-κB. Estos factores de transcripción controlan procesos en común y regulan la expresión de proteínas antiapoptóticas, de ciclo celular, proliferación y angiogénesis^{131,132}. De acuerdo con lo esperado, se observó que los ratones STAT1^{-/-} CAC 68 días, presentaron mayor fosforilación de STAT3 y NF-κB (p65), en comparación con sus contrapartes WT (Fig. 9B y 9C). En conjunto, estos resultados sugieren que la ausencia de STAT1 favorece la activación de STAT3 y NF-κB.

4. Los ratones STAT1^{-/-} exhiben reducción significativa de linfocitos T CD8⁺ intratumorales

El sistema inmune evita el establecimiento de tumores a través de mecanismos citotóxicos llevados a cabo por células NK y CTLs. Los CTLs surgen a partir de la activación de linfocitos T CD8⁺ vírgenes mediante diversos estímulos incluyendo la presentación de antígeno¹³³. Además, se ha demostrado que la estimulación con IFN-γ es necesaria para mantener el funcionamiento de estas células^{134,135,136,137}. Estos hallazgos sugieren que STAT1 juega un papel importante en la activación y funcionamiento de los CTLs. Notablemente, los ratones STAT1^{-/-} sometidos al modelo AOM/DSS, mantuvieron constante el número de linfocitos T CD8⁺ en sangre (Fig. 10B) y bazo al día 48 (Fig. 10D), en comparación con sus contrapartes WT, donde se observa una disminución de esta población celular con respecto al tiempo. No obstante, en el día 68 no hubo diferencia entre el ratón WT y el deficiente en STAT1 ya que éste último presentó una reducción significativa de esta población celular (Fig. 10D).

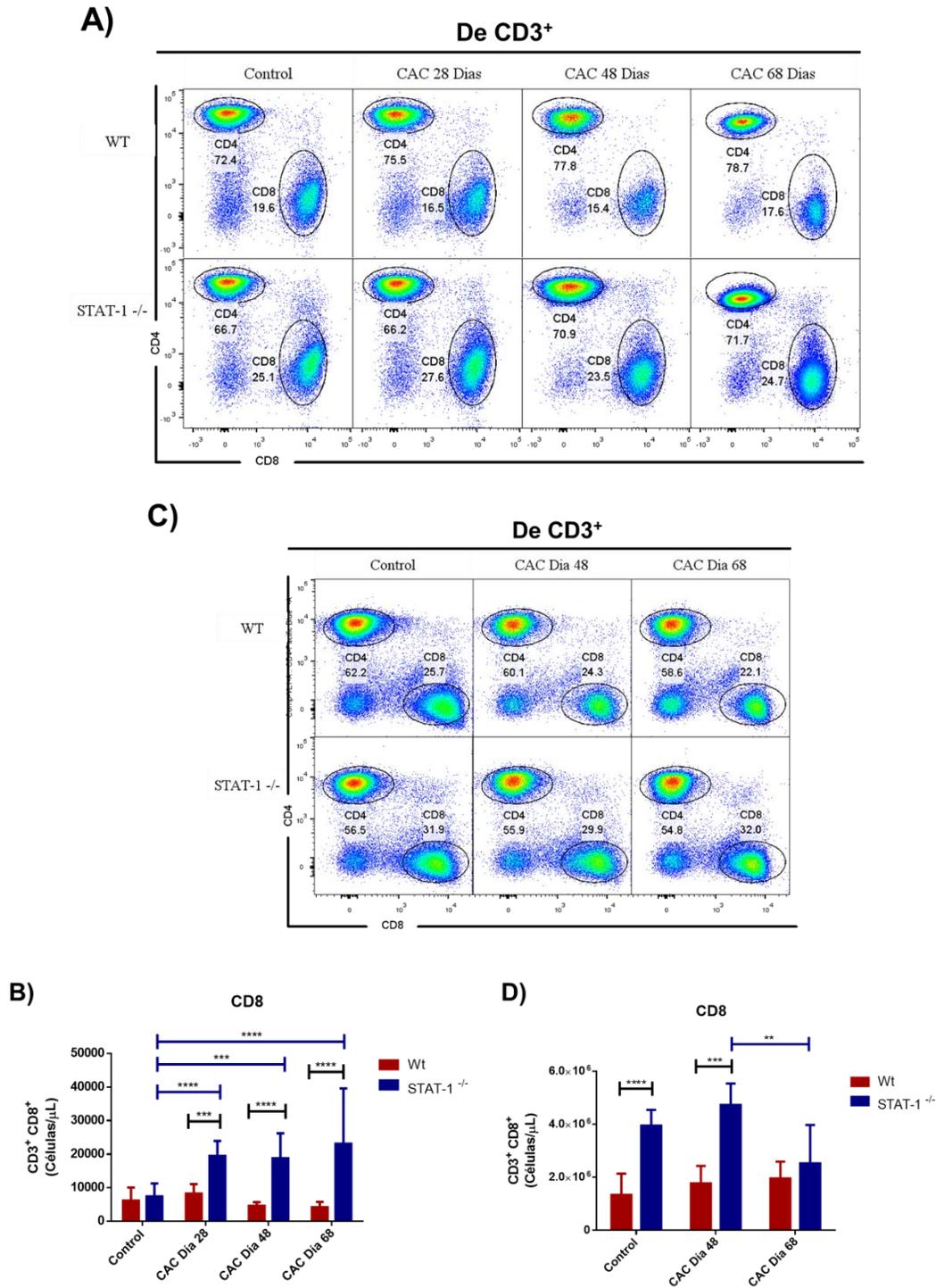


Figura 10. Los ratones STAT1^{-/-} presentan mayor número de linfocitos T CD8⁺ en sangre y bazo. Se realizó citometría de flujo con los marcadores CD3, CD4 y CD8 en (A y B) sangre y (C y D) bazo para identificar linfocitos T citotóxicos (CD3⁺ CD8⁺). Datos representativos de 3 experimentos independientes (media ± SD, n=4/grupo/experimento). Las diferencias significativas obtenidas por prueba ANOVA de dos vías y prueba Tukey representan la comparación entre los grupos WT contra STAT1^{-/-} (barra negra) y la comparación entre los diferentes tratamientos en los ratones STAT1^{-/-} (barra azul). α=0.05 **p=0.005, ***p=0.0001, ****p<0.0001.

Contrario a lo esperado, en el día 48 los tumores de los ratones STAT1^{-/-} presentaron mayor infiltración de linfocitos T CD8⁺ en comparación con los tumores de ratones WT. No obstante, para el día 68 la infiltración de linfocitos T CD8⁺ fue mayor en el grupo WT debido a que los tumores del grupo STAT1^{-/-} exhibieron reducción de esta población celular (Fig. 11). Estas observaciones sugieren que en etapas tempranas del modelo (día 48) los linfocitos T CD8⁺ limitan el desarrollo de tumores en los ratones STAT1^{-/-}. Sin embargo, en el día 68, la reducción de esta población celular se asocia con la formación de nuevos tumores.

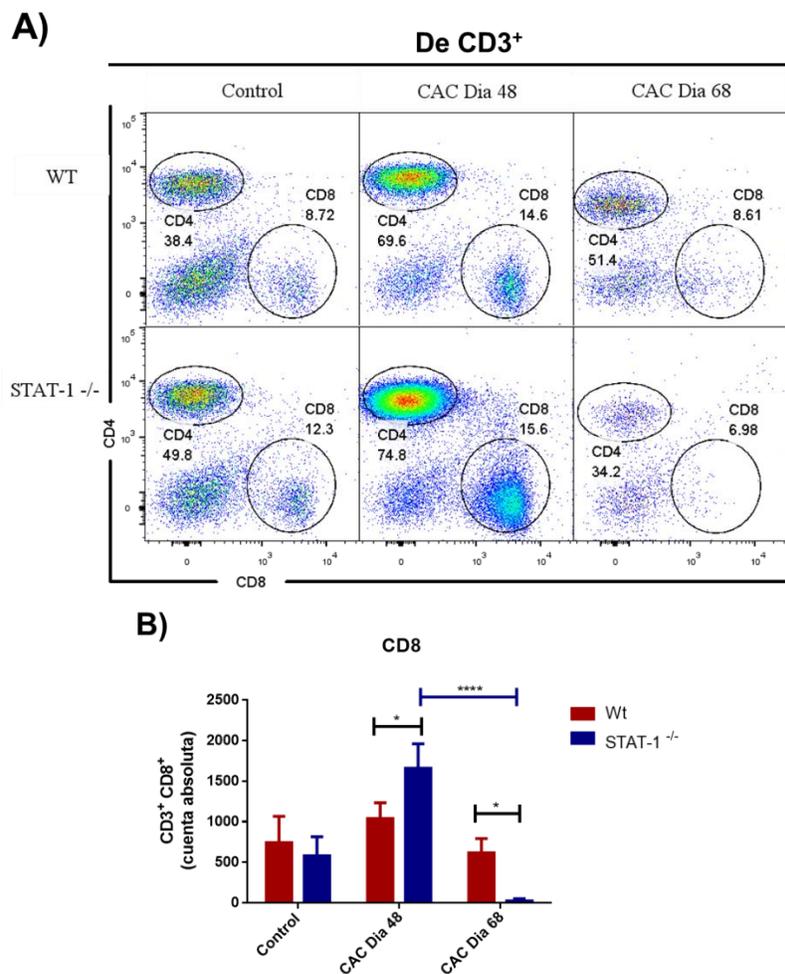
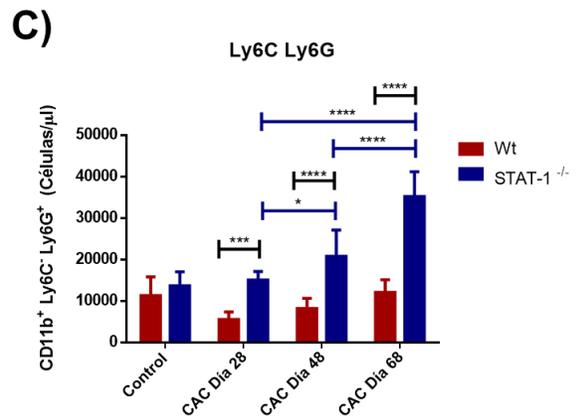
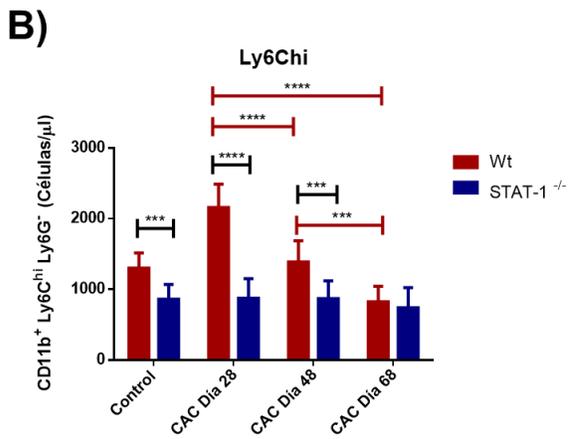
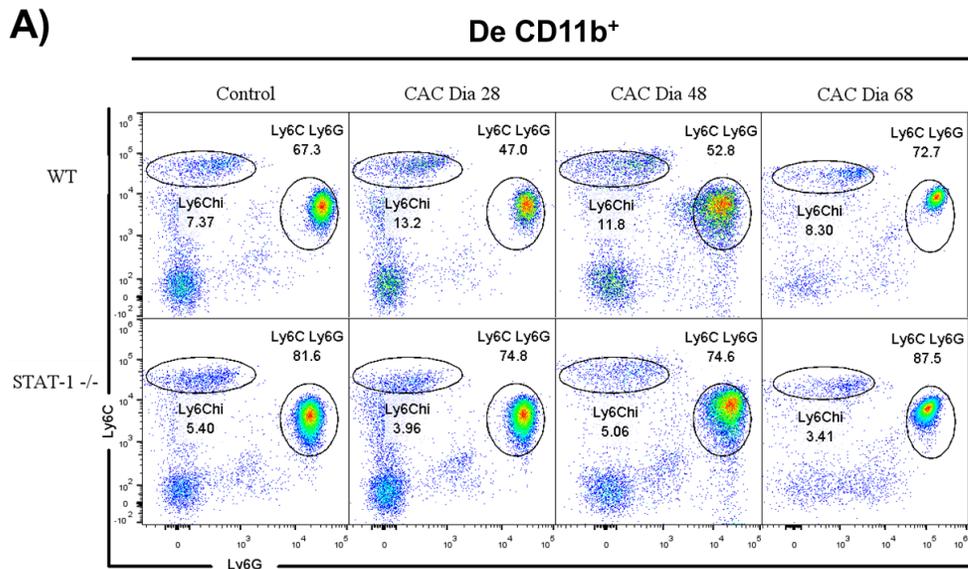


Figura 11. Los ratones STAT1^{-/-} exhiben reducción drástica de linfocitos T CD8⁺ reclutados a tumor. Se realizó citometría de flujo con los marcadores CD3, CD4 y CD8 en tumor para identificar (A y B) linfocitos T citotóxicos (CD3⁺ CD8⁺). Datos representativos de 3 experimentos independientes (media ± SD, n=4/grupo/experimento). Las diferencias significativas obtenidas por prueba ANOVA de dos vías y prueba Tukey representan la comparación entre los grupos WT contra STAT1^{-/-} (barra negra) y la comparación entre los diferentes tratamientos en los ratones STAT1^{-/-} (barra azul). $\alpha=0.05$ * $p=0.01$, **** $p<0.0001$.

5. Los ratones STAT1^{-/-} presentan mayor infiltración de neutrófilos en el tumor

La reducción de linfocitos T CD8⁺ en los tumores de ratones STAT1^{-/-} podría ser provocada por la presencia de células con actividad supresora. Diversos estudios realizados en ratones deficientes de STAT1 demuestran un aumento en el reclutamiento de células CD11b⁺ Ly6C⁺ Ly6G⁺,¹⁰⁸. Tomando en cuenta la plasticidad fenotípica de los neutrófilos y dada la controversia generada por la nomenclatura de estas células, la población CD11b⁺ Ly6C⁺ Ly6G⁺ será referida como neutrófilos.



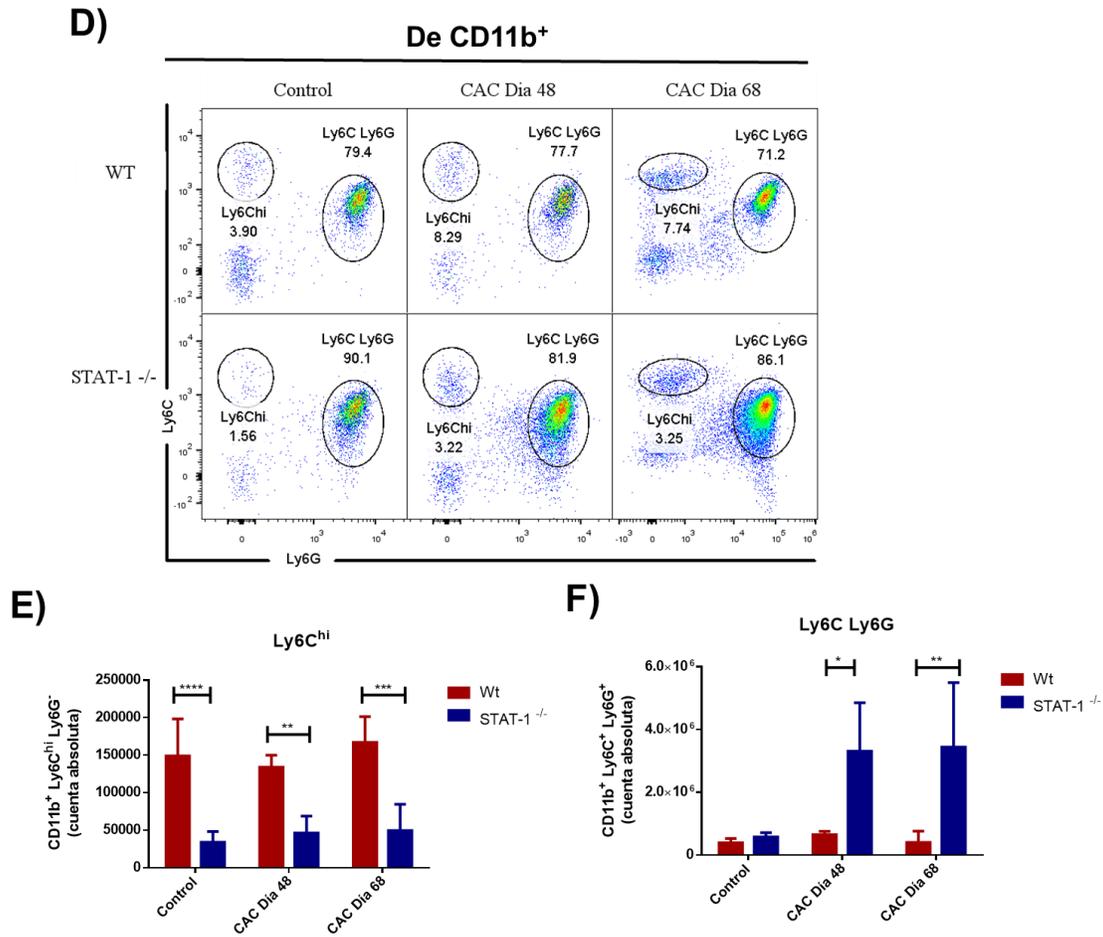


Figura 12. Los ratones STAT1^{-/-} tienen mayor número de neutrófilos en sangre y bazo. Se realizó citometría de flujo con los marcadores CD11b, Ly6C, Ly6G en (A, B y C) sangre y (D, E y F) bazo para identificar (B y E) monocitos (CD11b⁺ Ly6C^{hi}) y (C y F) neutrófilos (CD11b⁺ Ly6C⁺ Ly6G⁺). Datos representativos de 3 experimentos independientes (media ± SD, n=4/grupo/experimento). Las diferencias significativas obtenidas por prueba ANOVA de dos vías y prueba Tukey representan la comparación entre los grupos WT contra STAT1^{-/-} (barra negra) y la comparación entre los diferentes tratamientos en los ratones WT (barra roja) y STAT1^{-/-} (barra azul). $\alpha=0.05$ * $p=0.01$, *** $p=0.0006$, **** $p<0.0001$.

En el presente estudio se observó que, durante el desarrollo de CAC, los ratones STAT1^{-/-} presentan incremento de neutrófilos y reducción de monocitos Ly6C^{hi} en sangre (Fig. 12B y 12C) y bazo (Fig. 12E y 12F). Así mismo, mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica se demostró que los ratones STAT1^{-/-}, sometidos al modelo AOM/DSS, presentan mayor infiltración de neutrófilos al tumor en comparación con el grupo WT (Fig. 13).

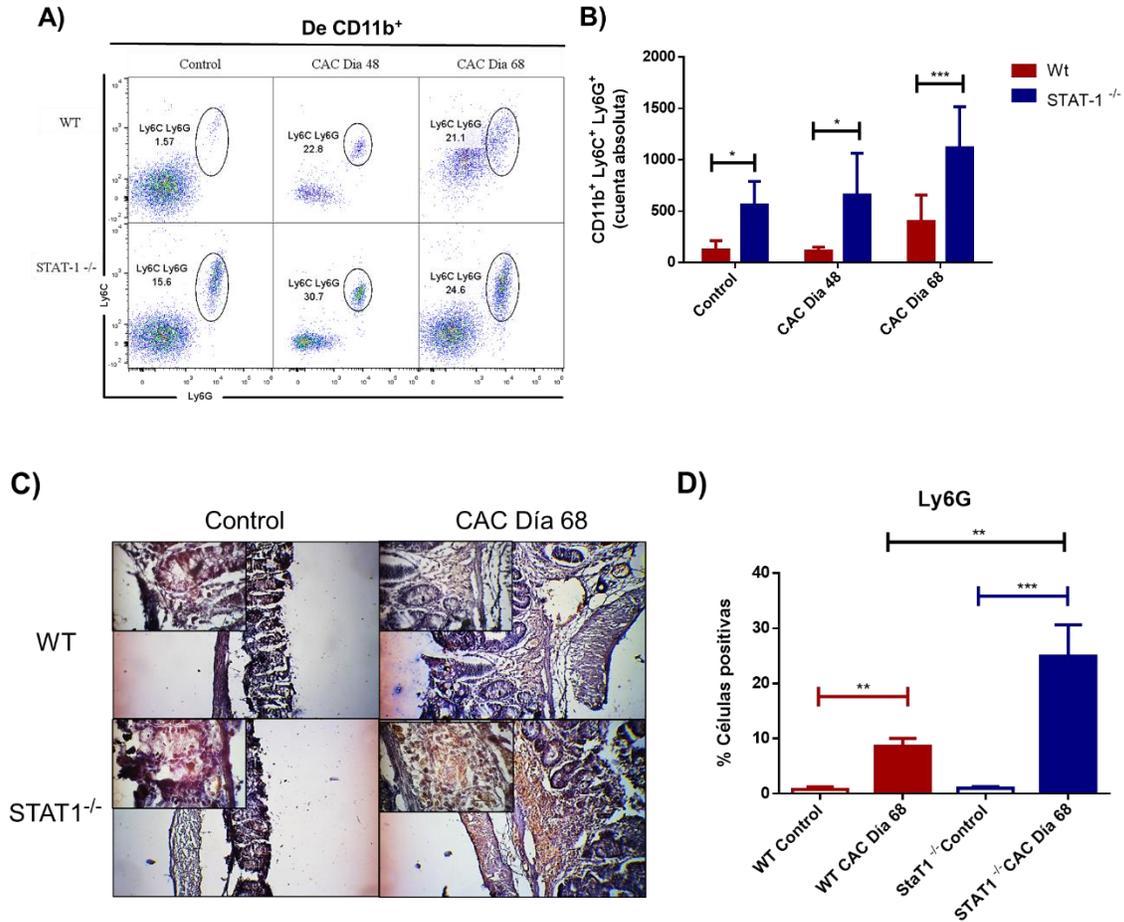


Figura 13. Los ratones STAT1^{-/-} presentan mayor infiltración de neutrófilos a tumor. Se realizó (A) citometría de flujo con los marcadores CD11b, Ly6C y Ly6G e (C) inmunohistoquímica con el marcador Ly6G en tumor para identificar (B y D) neutrófilos. Datos representativos de 3 experimentos independientes (media \pm SD, n=4/grupo/experimento). Las diferencias significativas obtenidas por prueba ANOVA de dos vías (B), ANOVA de una vía (D) y prueba Tukey representan la comparación entre los grupos WT contra STAT1^{-/-} (barra negra) y la comparación entre los diferentes tratamientos en los ratones WT (barra roja) y STAT1^{-/-} (barra azul). $\alpha=0.05$ * $p=0.01$, ** $p=0.001$, *** $p<0.0001$.

6. Los neutrófilos deficientes de STAT1 suprimen la proliferación de linfocitos T CD8⁺

En conjunto, los resultados anteriores apoyan que, en ausencia de STAT1, los neutrófilos reclutados al tumor podrían ser responsables de la supresión de los linfocitos T CD8⁺. Para comprobar esto, se analizó la proliferación de células de bazo (ratones WT sanos) en presencia de neutrófilos aislados del bazo de ratones WT CAC día 68 y STAT1^{-/-} CAC día 68.

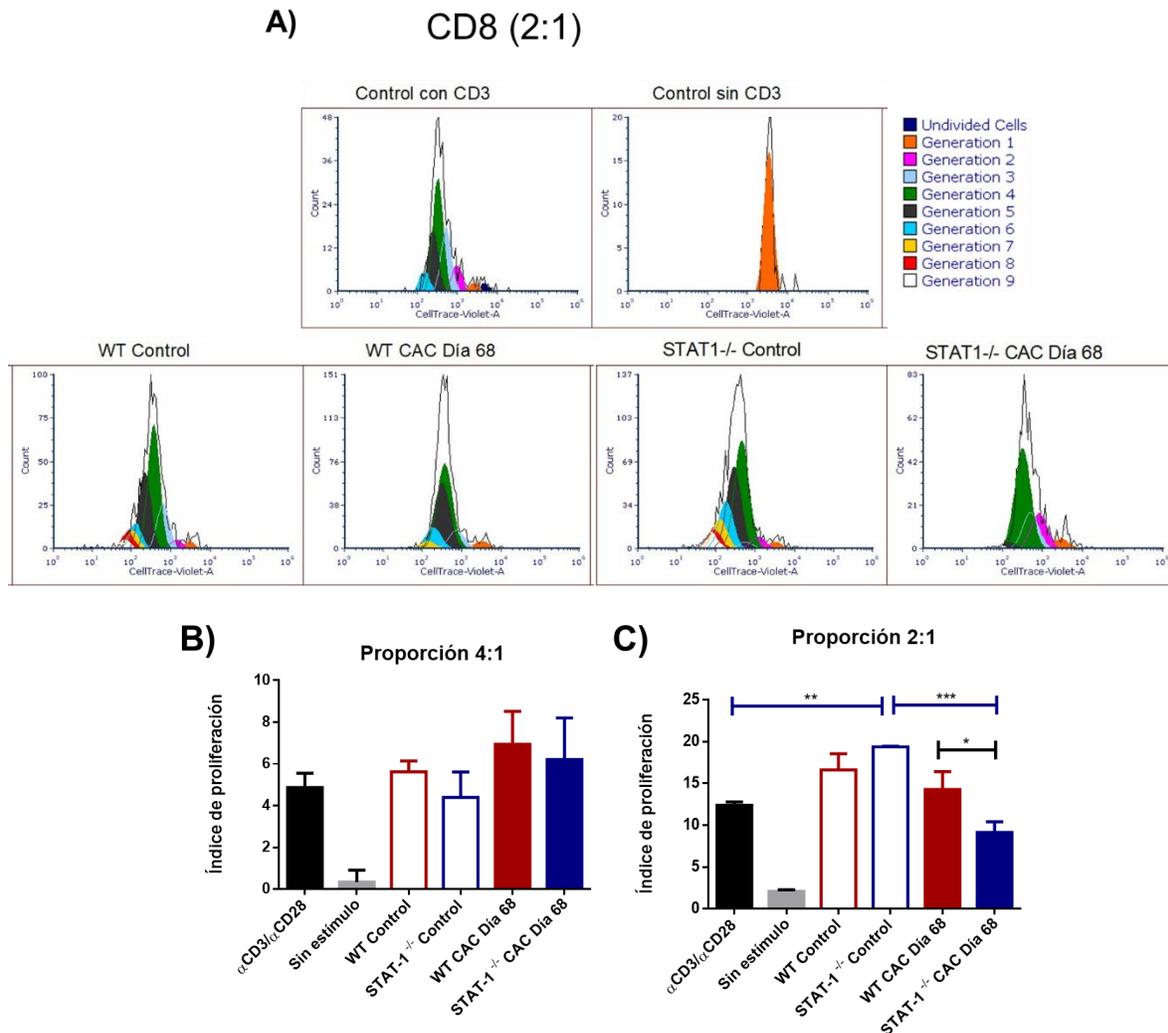


Figura 14. Los neutrófilos deficientes de STAT1 suprimen la proliferación de linfocitos T CD8⁺. Se realizaron cocultivos de células de bazo y neutrófilos aislados de bazos de ratones WT y STAT1^{-/-} en proporciones (B) 4:1 y (A y C) 2:1 para determinar el índice de proliferación de linfocitos T CD8⁺. Datos representativos de 2 experimentos independientes (media ± SD, n=4/grupo/experimento). Las diferencias significativas obtenidas por prueba ANOVA de una vía y prueba Tukey representan la comparación entre los diferentes grupos $\alpha=0.05$ * $p=0.01$, ** $p=0.001$, *** $p=0.0001$.

En los cocultivos en proporción 4:1 (células de bazo:neutrófilos) se demostró que los neutrófilos provenientes de ratones WT y STAT^{-/-} no suprimen la proliferación de linfocitos T CD8⁺ (Fig. 14B). Sin embargo, en los cocultivos en proporción 2:1 se observó que los neutrófilos del grupo STAT1^{-/-} CAC día 68 suprimen la proliferación de esta población celular (Fig. 14C).

Notablemente, los neutrófilos provenientes de los grupos WT control y STAT1^{-/-} control no suprimieron la proliferación de linfocitos T CD8⁺ en ninguna proporción. Estas observaciones sugieren que la actividad supresora de los neutrófilos depende de los estímulos generados durante el desarrollo del CAC en ausencia de STAT1 y del número de células que participan en el proceso. Esto coincide con el incremento de neutrófilos observado en los ratones deficientes de STAT1.

7. Los neutrófilos deficientes de STAT1 muestran alteraciones en sus funciones efectoras

STAT1 juega un papel importante en el reclutamiento, activación y muerte de los neutrófilos. Diversos reportes sugieren que la señalización por IFN- γ actúa como un potenciador de las funciones efectoras de los neutrófilos. Además, esta citocina mejora la transcripción de p47^{phox} y gp91^{phox}, subunidades de la NADPH oxidasa, enzima responsable de la producción de ROS¹¹⁰⁻¹¹².

A través del ensayo DCFH, se midió la producción y liberación de ROS en neutrófilos aislados de médula ósea de ratones WT y STAT1^{-/-}. Mediante la estimulación con PMA 100 nM, se observó que en comparación con los neutrófilos WT, los neutrófilos deficientes de STAT1 presentaron menor producción de ROS intracelular (Fig. 15A y 15B) y disminución en la liberación de estas moléculas al medio (Fig. 15C).

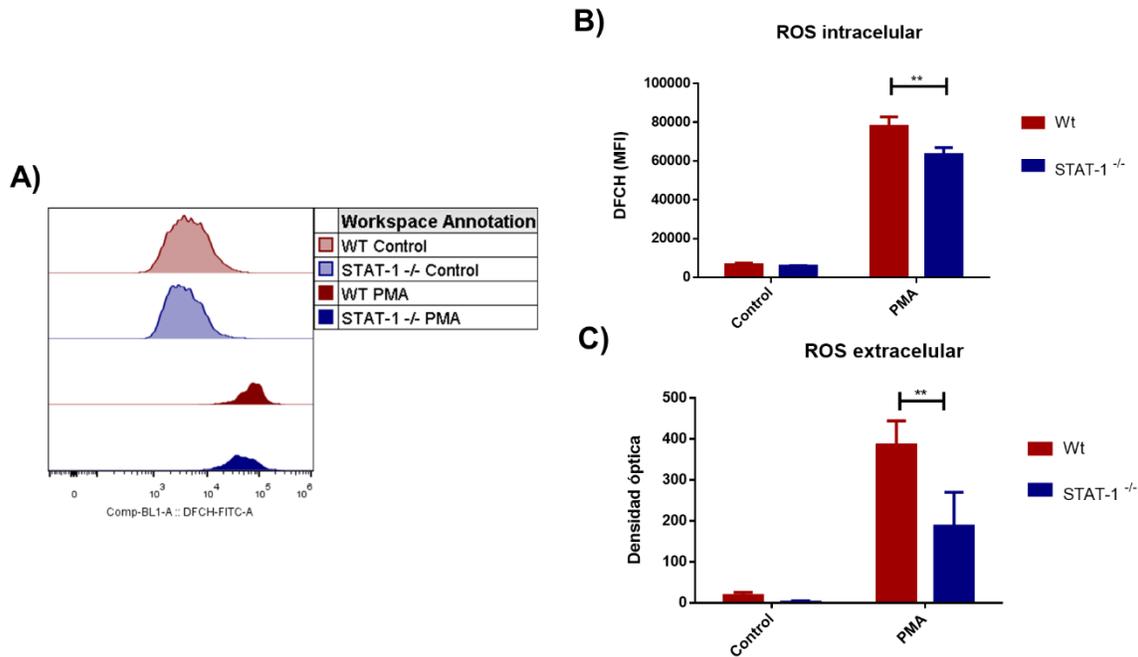


Figura 15. Los neutrófilos deficientes de STAT1 tienen menor estallido respiratorio. A través del (A) ensayo DCFH se comparó la (B) producción y (C) liberación de ROS al medio. Datos representativos de 2 experimentos independientes (media \pm SD, n=4/grupo/experimento). Las diferencias significativas obtenidas por prueba ANOVA de dos vías y prueba Tukey representan la comparación entre los diferentes grupos $\alpha=0.05$, ** $p=0.001$.

Además de participar en la destrucción de patógenos, se ha comprobado que las ROS juegan un papel importante en la inducción de NETs por la vía clásica¹³⁸. Esto sugiere que la reducción de estos agentes oxidantes podría traducirse en una disminución de la liberación de estas trampas de DNA. Por otra parte, se ha demostrado que los interferones de tipo I y tipo II inducen la producción de NETs en neutrófilos maduros¹¹⁴.

Para evaluar la producción de NETs, se estimularon neutrófilos aislados de médula ósea con PMA 100 nM + LPS 1 μ g/mL durante 4 horas. A través de microscopía de fluorescencia, se observó que los neutrófilos deficientes de STAT1 exhibieron menor producción de NETs en comparación con los neutrófilos WT (Fig. 16). Este resultado contrasta con el papel protumoral descrito para las NETs, sugiriendo que estas estructuras no participan en el desarrollo de CAC inducido por AOM/DSS. Sin embargo, es importante realizar otros experimentos para confirmar esto.

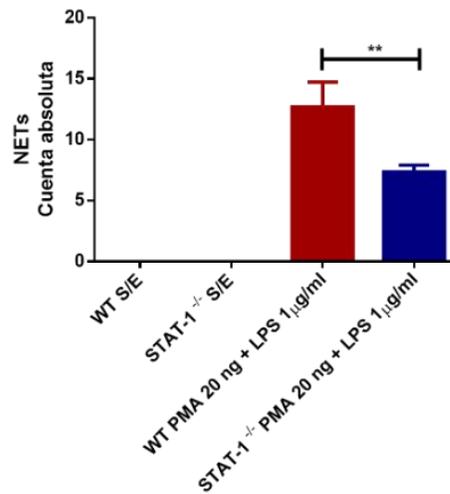
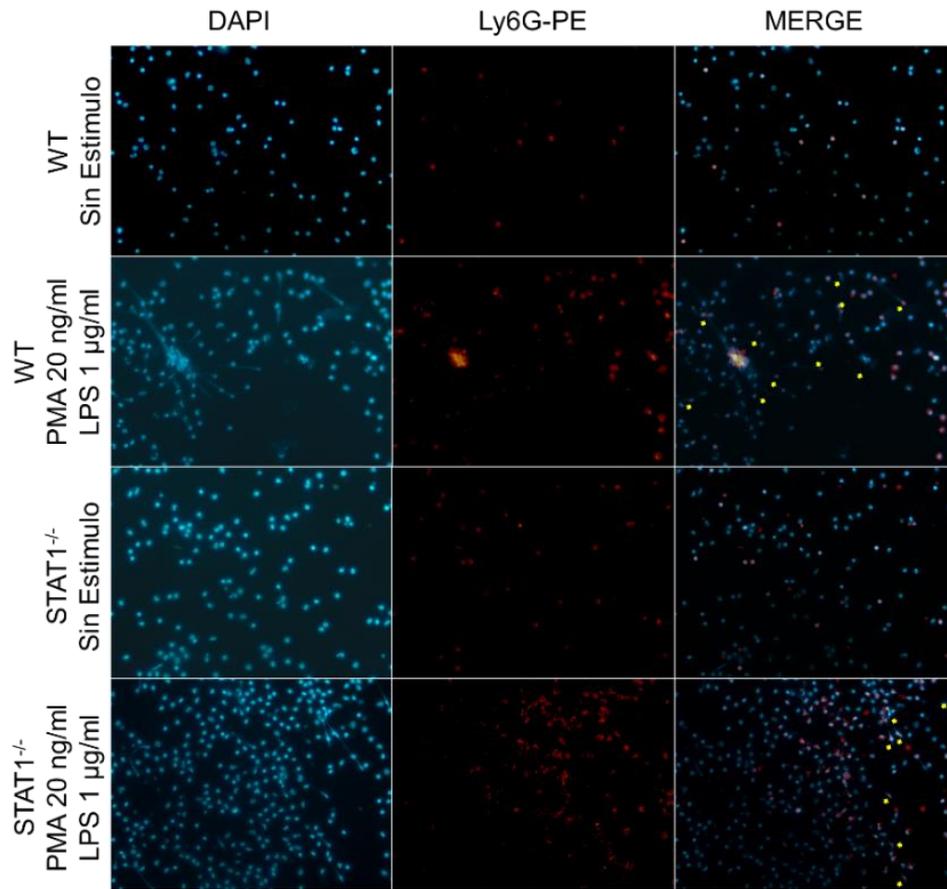


Figura 16. Los neutrófilos deficientes de STAT1 liberan menos NETs. Se realizó inmunofluorescencia con anti-Ly6G y marcaje de DNA con DAPI para identificar NETs (flechas amarillas). Datos representativos de 2 experimentos independientes (media ± SD, n=4/grupo/experimento). Las diferencias significativas obtenidas por prueba ANOVA de una vía y prueba Tukey representan la comparación entre los diferentes grupos $\alpha=0.05$, $**p=0.001$.

Hasta hace algunos años, los neutrófilos eran considerados células de vida media corta (3-24 h)¹⁵. No obstante, estudios recientes han demostrado que pueden vivir hasta 5 o más días⁸⁴. Como se ha mencionado, STAT1 juega un papel medular en la promoción de muerte celular. No obstante, diversos reportes indican que los interferones de tipo I, tipo II y G-CSF alargan la vida de los neutrófilos^{110,111}. En el presente estudio, se cultivaron neutrófilos sin estimular durante 24 h y se observó un mayor porcentaje de neutrófilos muertos en el grupo WT, en comparación con el grupo STAT1^{-/-}. En conjunto, estos resultados sugieren que la ausencia de STAT1 disminuye la actividad efectora de los neutrófilos y favorece su acumulación al promover su supervivencia.

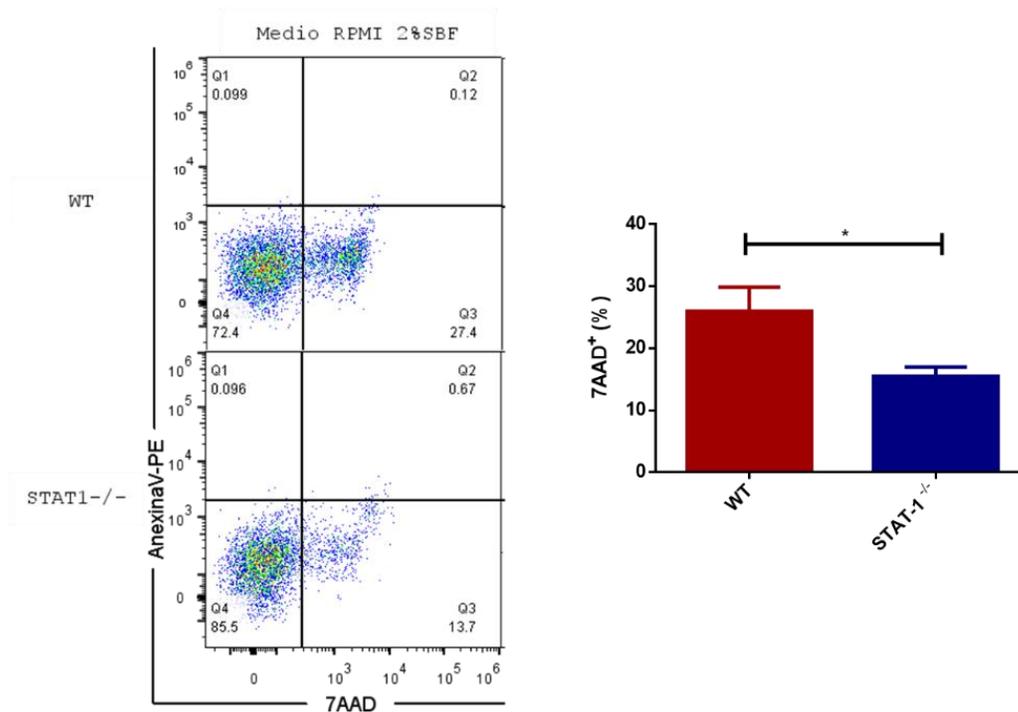


Figura 17. La ausencia de STAT1 favorece la sobrevivencia de neutrófilos no activados. Durante 24 horas, se incubaron neutrófilos aislados de médula ósea de ratones WT y STAT1^{-/-} en medio RPMI completo y se realizó citometría de flujo para los marcadores CD11b, Ly6C, Ly6G, Anexina V y 7AAD para determinar muerte celular. Datos representativos de 2 experimentos independientes (media±SD, n=4/grupo/experimento). Las diferencias significativas obtenidas por prueba ANOVA de una vía y prueba Tukey representan la comparación entre los diferentes grupos $\alpha=0.05$, ** $p=0.001$.

Discusión

La presencia de STAT1 se considera como marcador de buen pronóstico en el CRC, ya que diversos estudios reportan que su translocación al núcleo y el aumento de su mRNA se traducen en mayor supervivencia global de los pacientes⁵⁻⁸. No obstante, evidencia reciente demuestra que en tumores con características específicas (MSI⁵⁶ y mutaciones en KRAS⁵⁷) este factor de transcripción se relaciona con un mal pronóstico. Esto sugiere que la participación de STAT1 varía en función de las características genéticas del CRC.

El presente estudio evaluó el papel de STAT1 en el desarrollo de CRC bajo condiciones inflamatorias generadas por el DSS a través del daño a la barrera epitelial. En el modelo de CAC, inducido por AOM/DSS, se demostró que la ausencia de STAT1 favorece el establecimiento de tumores (Fig. 6). Notablemente, estos tumores exhibieron mayor grado de dediferenciación y sobre expresión de marcadores asociados a gravedad, incluyendo β -catenina (Fig. 8), STAT3 y NF- κ B (Fig. 9). Una posible explicación es que STAT1 reprime la activación de estas proteínas. Por ejemplo, en fibroblastos STAT1 actúa como un antagonista de la activación de STAT3^{139, 140}. Además, en líneas celulares de CRC la activación de STAT1 es inversamente proporcional a la activación de STAT3⁶. Por otra parte, en células HeLa se observó que STAT1 se une al complejo TNFR1-TRADD e inhibe la activación de NF- κ B¹⁴¹. Finalmente, en hepatocitos la señalización por IFN- γ reprime la translocación de β -catenina al núcleo a través de la sobre expresión de la proteína DKK1, la cual inhibe la activación de la vía Wnt- β -catenina¹⁴².

STAT1 controla diversos mecanismos que impiden el establecimiento de tumores, entre ellos, el arresto del ciclo celular a través de la degradación de ciclina D1 por vía del proteasoma y la activación de p53⁵¹. En el presente estudio, los ratones deficientes de STAT1 exhiben mayor expresión de ciclina D1 (Fig. 9). Esto sugiere que en ausencia de STAT1 ciclina D1 no es degradada por el proteasoma. Además, es importante destacar que STAT1 favorece la activación de STAT3 y NF- κ B, factores de transcripción que promueven la transcripción de ciclina D1.

Otro mecanismo controlado por STAT1 es la muerte celular, esta proteína promueve la apoptosis mediante la transcripción y activación de caspasa 2, 3 y 7⁴⁵, así mismo, reprime la expresión de señales antiapoptóticas como algunas proteínas de la familia Bcl2⁴⁸. No obstante, STAT1 también controla mecanismos apoptóticos extrínsecos incluyendo los mediados por el sistema inmune como la expresión de ligandos de muerte (FAS y TRAIL)^{46,47}, la maduración y actividad de las células NK⁵² y la regulación de la expresión del MCH-I, complejo necesario para la presentación de antígenos a los linfocitos T CD8⁺⁵³. De manera interesante, los cambios identificados en el número y tamaño tumoral entre ratones WT y STAT1^{-/-} (Fig. 6) coinciden con la disminución de células CD8⁺ en el tumor, particularmente a tiempos tardíos (Fig. 11).

El papel de STAT1 en el funcionamiento de los linfocitos citotóxicos resulta complejo. Por una parte, la señalización por interferones de tipo I¹³⁴ y tipo II¹³⁵ no es necesaria para la expansión clonal de linfocitos T CD8⁺; sin embargo, esta señal es requerida para mantener su funcionamiento y promover la formación de células de memoria^{134,135,136}. Por otra parte, se ha demostrado que la señalización constante de estas citocinas puede deteriorar la respuesta citotóxica de esta población celular¹³⁵ y suprimir su proliferación^{134,135}. Ante estos reportes, resulta importante evaluar el reclutamiento, activación y funcionamiento de los linfocitos T CD8⁺ dentro del modelo de CAC inducido por AOM/DSS en ratones STAT1^{-/-}.

De manera interesante los ratones STAT1^{-/-} presentaron mayor número de linfocitos T CD8⁺ en sangre, bazo y tumores al día 48, en comparación con los ratones WT (Fig. 10). No obstante, en el día 68, el número de células CD8⁺ decae en los tumores de ratones STAT1^{-/-} (Fig. 11). Esto sugiere que en etapas tempranas del modelo (día 48) los linfocitos T CD8⁺ limitan el establecimiento de tumores en los ratones STAT1^{-/-}. Sin embargo, en el día 68, la reducción de esta población celular podría favorecer la formación de nuevos tumores.

Los resultados demuestran un aumento en el número de neutrófilos en sangre, bazo y tumor, durante el desarrollo de CAC, en ausencia de STAT1 (Fig. 12 y 13). Una posible explicación es que los ratones deficientes de STAT1 presentan mayor producción y movilidad de neutrófilos. Notablemente, diversos reportes demuestran un incremento de IL-17 en ausencia de STAT1^{9,108,143,144}. De manera interesante, esta citocina favorece la producción de G-CSF, proteína clave en la inducción de la granulopoyesis^{78,145}. Por otra parte, trabajos realizados en macrófagos demuestran que STAT1 actúa como un represor de CXCL1 y CXCL2, quimiocinas implicadas en el reclutamiento de neutrófilos^{106,107}. Además, STAT3 favorece la expresión de CXCR2¹⁴⁶. Sugiriendo que la relación STAT1/STAT3 es importante en la producción y movilización de neutrófilos.

El presente estudio propone que en ausencia de STAT1, las células CD11b⁺ Ly6C⁺ Ly6G⁺ suprimen la actividad de los linfocitos T CD8⁺ (Fig. 14). No obstante, la expresión de estos marcadores engloba a las G-MDSCs y a los neutrófilos, generando controversia alrededor de la nomenclatura de esta población celular. Hasta hace algunos años, se pensaba que la principal diferencia entre estas células era que solo las G-MDSCs suprimían la activación de los linfocitos T. Sin embargo, evidencia reciente sugiere que existen subpoblaciones de neutrófilos con capacidad supresora¹². Una limitante de este tipo de estudios es la dificultad de distinguir entre neutrófilos y G-MDSCs. A la fecha no existe un marcador o un método universalmente aceptado para hacerlo, y la literatura se basa en un panel de marcadores como el utilizado en este estudio, el cual incluye a ambos tipos celulares.

Los principales mecanismos de supresión descritos en neutrófilos involucran la expresión de moléculas supresoras como PDL1 y la producción de ROS. Llama la atención que, de acuerdo con diferentes autores, la expresión de PDL1 en neutrófilos es dependiente de STAT1^{43,44,116-118}. Por otra parte, se ha sugerido que STAT1 juega un papel importante en la producción de ROS debido a que la señalización por IFN- γ favorece la expresión p47^{phox} y gp91^{phox}¹¹⁰⁻¹¹².

Esta propuesta coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde, se demostró que los neutrófilos STAT1^{-/-} muestran reducción de la producción y liberación de ROS, en comparación con los neutrófilos WT (Fig. 15). En conjunto, esto sugiere que otros mecanismos podrían estar involucrados en la supresión mediada por neutrófilos deficientes de STAT1^{-/-}, incluyendo la producción de arginasa1¹⁴⁷.

Se ha comprobado que las ROS juegan un papel importante en la inducción de NETs por la vía clásica¹³⁸. Coincidiendo con esto, en el presente estudio se observó que la producción de NETs se redujo en neutrófilos STAT1^{-/-}. Estos resultados sugieren que los neutrófilos STAT1^{-/-} tienen defectos en las principales funciones efectoras asociadas al control de patógenos. Por otra parte, la evidencia indica que el control de la microbiota impide el establecimiento de tumores en el modelo AOM/DSS²⁰. Por esta razón, el presente estudio sugiere analizar la interacción de los neutrófilos STAT^{-/-} y la microbiota intestinal en etapas tempranas del desarrollo de CAC. Aunque se ha descrito que las NETs tienen un papel protumoral, es importante recordar que estas estructuras se han asociado a procesos metastásicos y que en el modelo AOM/DSS no hay desarrollo de metástasis¹²¹.

En el presente estudio, se cultivaron neutrófilos sin estimular durante 24 h y se observó un mayor porcentaje de neutrófilos muertos en el grupo WT, en comparación con el grupo STAT1^{-/-}. Apoyando la idea que STAT1 juega un papel medular en la promoción de muerte de estas células. No obstante, es importante realizar estudios en neutrófilos activados, ya que diversos reportes indican que los interferones de tipo I y tipo II y G-CSF alargan la vida de los neutrófilos^{110,111}.

Finalmente, El presente estudio demostró que los mecanismos inmunes juegan un papel importante en el establecimiento de tumores, en ausencia de STAT1. No obstante, es importante tomar en cuenta los mecanismos que controla STAT1 en las células tumorales. Por esta razón, se sigue el uso de ratones con silenciamiento selectivo de STAT1 incluyendo células epiteliales y células inmunes.

Conclusiones

1. Los ratones deficientes de STAT1 presentan mayor desarrollo de tumores en el día 68 post inducción de tumores.
2. La ausencia de STAT1 favorece la expresión de β -catenina, STAT3 y NF- κ B.
3. Los tumores de ratones STAT1^{-/-} presentan mayor infiltración de neutrófilos y menor de linfocitos T CD8⁺.
4. Los neutrófilos deficientes de STAT1 suprimen la proliferación de linfocitos T CD8⁺.
5. Los neutrófilos deficientes de STAT1 presentan disminución en la producción de ROS y liberación de NETs. Así como aumento de la supervivencia.

Perspectivas

El presente estudio propone realizar el análisis de la formación de neutrófilos en médula ósea de ratones $STAT1^{-/-}$, el estudio de la proporción CXCR4/CXCR2 y la producción de quimiocinas (CXCL1, 2 y 5) como posible explicación del aumento de neutrófilos en ratones deficientes de STAT1. Por otra parte, se propone el estudio de mecanismos de reparación del DNA y procesos apoptóticos en las células epiteliales deficientes de STAT1, para ampliar el conocimiento sobre el establecimiento de nuevos tumores. Además, se propone el análisis del microambiente tumoral y el balance STAT1/STAT3 en neutrófilos para entender la actividad supresora de esta población celular. Finalmente, se propone el uso de nuevas tecnologías como la secuenciación single Cell RNA, para entender las diferencias en el transcriptoma entre los neutrófilos WT y $STAT1^{-/-}$ (Fig. 18).

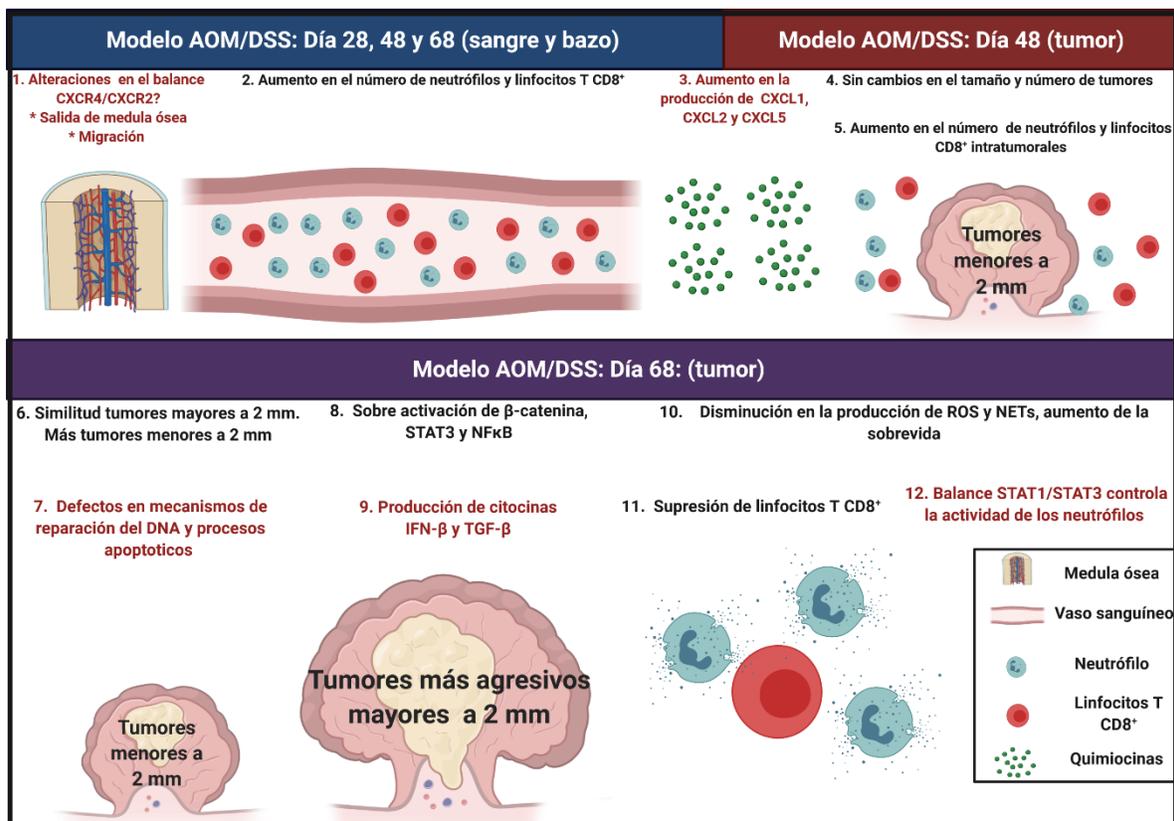


Figura 18. Desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis en ausencia de STAT1. Se muestran eventos comprobados en el modelo AOM/DSS (negro) y se proponen nuevos fenómenos para analizar (rojo).

Referencias bibliográficas

1. Plataniias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*, 5(5), 375–386.
2. Bromberg, J. & Darnell, J. E. Jr (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*, 19(21), 2468–2473.
3. Zhang, Y., & Liu, Z. (2017). STAT1 in cancer: friend or foe?. *Discovery Medicine*, 24(130), 19–29.
4. Meissl, K., Macho-Maschler, S., Müller, M., & Strobl, B. (2017). The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours. *Cytokine*, 89, 12–20.
5. 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*, 109(1), 138–146.
6. Nivarthi, H., Gordziel, C., Themanns, M., Kramer, N., Eberl, M., Rabe, B., Schlederer, M., Rose-John, S., Knösel, T., Kenner, L., Freund, P., Aberger, F., Han, X., Kralovics, R., Dolznig, H., Jennek, S., Friedrich, K., & Moriggl, R. (2016). The ratio of STAT1 to STAT3 expression is a determinant of colorectal cancer growth. *Oncotarget*, 7(32), 51096–51106.
7. Simpson, J. A., Al-Attar, A., Watson, N. F., Scholefield, J. H., Ilyas, M., & Durrant, L. G. (2010). Intratumoral T cell infiltration, MHC class I and STAT1 as biomarkers of good prognosis in colorectal cancer. *Gut*, 59(7), 926–933.
8. Zhang, J., Wang, F., Liu, F., & Xu, G. (2020). Predicting STAT1 as a prognostic marker in patients with solid cancer. *Therapeutic Advances In Medical Oncology*, 12, 1-16.
9. Leon-Cabrera, S., Vázquez-Sandoval, A., Molina-Guzman, E., Delgado-Ramirez, Y., Delgado-Buenrostro, N. L., Callejas, B. E., Chirino, Y. I., Pérez-Plasencia, C., Rodríguez-Sosa, M., Olguín, J. E., Salinas, C., Satoskar, A. R., & Terrazas, L. I. (2018). Deficiency in STAT1 signaling predisposes gut inflammation and prompts colorectal cancer development. *Cancers*, 10(9), 341.
10. Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101–2114.
11. Lasry, A., Zinger, A., & Ben-Neriah, Y. (2016). Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nature Immunology*, 17(3), 230–240.
12. Sagiv, J. Y., Michaeli, J., Assi, S., Mishalian, I., Kisos, H., Levy, L., Damti, P., Lumbroso, D., Polyansky, L., Sionov, R. V., Ariel, A., Hovav, A. H., Henke, E., Fridlender, Z. G., & Granot, Z. (2015). Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Reports*, 10(4), 562–573.
13. Fridlender, Z. G., & Albelda, S. M. (2012). Tumor-associated neutrophils: friend or foe?. *Carcinogenesis*, 33(5), 949–955.
14. Uribe-Querol, E., & Rosales, C. (2015). Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *Journal of Immunology Research*, 2015(1), 1-21.
15. Wu, L., Saxena, S., Awaji, M., & Singh, R. K. (2019). Tumor-Associated Neutrophils in Cancer: Going Pro. *Cancers*, 11(4), 564-584.

16. Andzinski, L., Kasnitz, N., Stahnke, S., Wu, C. F., Gereke, M., von Köckritz-Blickwede, M., Schilling, B., Brandau, S., Weiss, S., & Jablonska, J. (2016). Type I IFNs induce anti-tumor polarization of tumor associated neutrophils in mice and human. *International Journal of Cancer*, 138(8), 1982–1993.
17. Pylaeva, E., Lang, S., & Jablonska, J. (2016). The essential role of Type I interferons in differentiation and activation of tumor-associated neutrophils. *Frontiers In Immunology*, 7, 1-13.
18. Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., & Albelda, S. M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell*, 16(3), 183–194.
19. Tanaka, Y., Ito, S., & Isobe, K. (2016). Vancomycin-sensitive bacteria trigger development of colitis-associated colon cancer by attracting neutrophils. *Scientific Reports*, 6, 1-13.
20. Triner, D., Devenport, S. N., Ramakrishnan, S. K., Ma, X., Frieler, R. A., Greenson, J. K., Inohara, N., Nunez, G., Colacino, J. A., Mortensen, R. M., & Shah, Y. M. (2019). Neutrophils restrict tumor-associated microbiota to reduce growth and invasion of colon tumors in mice. *Gastroenterology*, 156(5), 1467–1482.
21. Shang, K., Bai, Y. P., Wang, C., Wang, Z., Gu, H. Y., Du, X., Zhou, X. Y., Zheng, C. L., Chi, Y. Y., Mukaida, N., & Li, Y. Y. (2012). Crucial involvement of tumor-associated neutrophils in the regulation of chronic colitis-associated carcinogenesis in mice. *Plos One*, 7(12), e51848.
22. Wang, Y., Wang, K., Han, G. C., Wang, R. X., Xiao, H., Hou, C. M., Guo, R. F., Dou, Y., Shen, B. F., Li, Y., & Chen, G. J. (2014). Neutrophil infiltration favors colitis-associated tumorigenesis by activating the interleukin-1 (IL-1)/IL-6 axis. *Mucosal Immunology*, 7(5), 1106–1115.
23. Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J. E., Jr, & Kuriyan, J. (1998). Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*, 93(5), 827–839.
24. Ramana, C. V., Chatterjee-Kishore, M., Nguyen, H., & Stark, G. R. (2000). Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene*, 19(21), 2619–2627.
25. Kalliolias, G. D., & Ivashkiv, L. B. (2008). IL-27 activates human monocytes via STAT1 and suppresses IL-10 production but the inflammatory functions of IL-27 are abrogated by TLRs and p38. *Journal of Immunology*, 180(9), 6325–6333.
26. Ma, Y., Chen, L., Xie, G., Zhou, Y., Yue, C., Yuan, X., Zheng, Y., Wang, W., Deng, L., & Shen, L. (2016). Elevated level of interleukin-35 in colorectal cancer induces conversion of T cells into iT₃₅ by activating STAT1/STAT3. *Oncotarget*, 7(45), 73003–73015.
27. Krämer, O. H., Knauer, S. K., Greiner, G., Jandt, E., Reichardt, S., Gührs, K. H., Stauber, R. H., Böhmer, F. D., & Heinzl, T. (2009). A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling. *Genes & Development*, 23(2), 223–235.

28. Jitschin, R., Böttcher, M., Saul, D., Lukassen, S., Bruns, H., Loschinski, R., Ekici, A. B., Reis, A., Mackensen, A., & Mougiakakos, D. (2019). Inflammation-induced glycolytic switch controls suppressivity of mesenchymal stem cells via STAT1 glycosylation. *Leukemia*, 33(7), 1783–1796.
29. Goh, K. C., Haque, S. J., & Williams, B. R. (1999). p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons. *The EMBO Journal*, 18(20), 5601–5608.
30. Uddin, S., Sassano, A., Deb, D. K., Verma, A., Majchrzak, B., Rahman, A., Malik, A. B., Fish, E. N., & Platanias, L. C. (2002). Protein kinase C-delta (PKC-delta) is activated by type I interferons and mediates phosphorylation of Stat1 on serine 727. *The Journal Of Biological Chemistry*, 277(17), 14408–14416.
31. Xing, F., Matsumiya, T., Shiba, Y., Hayakari, R., Yoshida, H., & Imaizumi, T. (2016). Non-canonical role of IKK α in the regulation of STAT1 phosphorylation in antiviral signaling. *Plos One*, 11(12), e0168696.
32. Shuai K. (2006). Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins. *Cell Research*, 16(2), 196–202.
33. Croker, B. A., Kiu, H., & Nicholson, S. E. (2008). SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(4), 414–422.
34. Rusinova, I.; Forster, S.; Yu, S.; Kannan, A.; Mase, M.; Cumming, H.; Chapman, R.; Hertzog, P.J. (2013). INTERFEROME v2. 0: an updated database of annotated interferon-regulated genes. *Nucleic Acids Research*. 41 (database issue): D1040-D1046.
35. Cochet, O., Frelin, C., Peyron, J. F., & Imbert, V. (2006). Constitutive activation of STAT proteins in the HDLM-2 and L540 Hodgkin lymphoma-derived cell lines supports cell survival. *Cellular Signalling*, 18(4), 449–455.
36. Lee, J., Jung, H. H., Im, Y. H., Kim, J. H., Park, J. O., Kim, K., Kim, W. S., Ahn, J. S., Jung, C. W., Park, Y. S., Kang, W. K., & Park, K. (2006). Interferon-alpha resistance can be reversed by inhibition of IFN-alpha-induced COX-2 expression potentially via STAT1 activation in A549 cells. *Oncology Reports*, 15(6), 1541–1549.
37. Bozeman, R., Abel, E. L., Macias, E., Cheng, T., Beltran, L., & DiGiovanni, J. (2015). A novel mechanism of skin tumor promotion involving interferon-gamma (IFN γ)/signal transducer and activator of transcription-1 (Stat1) signaling. *Molecular Carcinogenesis*, 54(8), 642–653.
38. Samardzic, T., Jankovic, V., Stosic-Grujicic, S., & Trajkovic, V. (2001). STAT1 is required for iNOS activation, but not IL-6 production in murine fibroblasts. *Cytokine*, 13(3), 179–182.

39. Nishiya, T., Uehara, T., Edamatsu, H., Kaziro, Y., Itoh, H., & Nomura, Y. (1997). Activation of Stat1 and subsequent transcription of inducible nitric oxide synthase gene in C6 glioma cells is independent of interferon-gamma-induced MAPK activation that is mediated by p21ras. *Febs Letters*, 408(1), 33–38.
40. Hix, L. M., Karavitis, J., Khan, M. W., Shi, Y. H., Khazaie, K., & Zhang, M. (2013). Tumor STAT1 transcription factor activity enhances breast tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(17), 11676–11688.
41. Poe, S. L., Arora, M., Oriss, T. B., Yarlagadda, M., Isse, K., Khare, A., Levy, D. E., Lee, J. S., Mallampalli, R. K., Chan, Y. R., Ray, A., & Ray, P. (2013). STAT1-regulated lung MDSC-like cells produce IL-10 and efferocytose apoptotic neutrophils with relevance in resolution of bacterial pneumonia. *Mucosal Immunology*, 6(1), 189–199.
42. Kusmartsev, S., & Gabrilovich, D. I. (2005). STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *Journal of Immunology*, 174(8), 4880–4891.
43. Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Moreno, B. H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G. A., Zaretsky, J. M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., Parisi, G., Saus, C. P., Torrejon, D. Y., Graeber, T. G., Comin-Anduix, B., Hu-Lieskovan, S., Damoiseaux, R., Lo, R. S., & Ribas, A. (2017). Interferon receptor signaling pathways regulating PD-L1 and PD-L2 expression. *Cell Reports*, 19(6), 1189–1201.
44. Xiao, W., Klement, J. D., Lu, C., Ibrahim, M. L., & Liu, K. (2018). IFNAR1 controls autocrine type I IFN regulation of PD-L1 expression in myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Immunology*, 201(1), 264–277.
45. Xu, X., Fu, X. Y., Plate, J., & Chong, A. S. (1998). IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Research*, 58(13), 2832–2837.
46. Choi, E. A., Lei, H., Maron, D. J., Wilson, J. M., Barsoum, J., Fraker, D. L., El-Deiry, W. S., & Spitz, F. R. (2003). Stat1-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and the cell-surface death signaling pathway by interferon beta in human cancer cells. *Cancer Research*, 63(17), 5299–5307.
47. Sironi, J. J., & Ouchi, T. (2004). STAT1-induced apoptosis is mediated by caspases 2, 3, and 7. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4066–4074.
48. Cao, Z. H., Zheng, Q. Y., Li, G. Q., Hu, X. B., Feng, S. L., Xu, G. L., & Zhang, K. Q. (2015). STAT1-mediated down-regulation of Bcl-2 expression is involved in IFN- γ /TNF- α -induced apoptosis in NIT-1 cells. *Plos One*, 10(3), e0120921.

49. Ma, Z., Qin, H., & Benveniste, E. N. (2001). Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-9 gene expression by IFN-gamma and IFN-beta: critical role of STAT-1alpha. *Journal of Immunology*, 167(9), 5150–5159.
50. Youlyouyz-Marfak, I., Gachard, N., Le Clorennec, C., Najjar, I., Baran-Marszak, F., Reminieras, L., May, E., Bornkamm, G. W., Fagard, R., & Feuillard, J. (2008). Identification of a novel p53-dependent activation pathway of STAT1 by antitumour genotoxic agents. *Cell Death and Differentiation*, 15(2), 376–385.
51. Dimco, G., Knight, R. A., Latchman, D. S., & Stephanou, A. (2010). STAT1 interacts directly with cyclin D1/Cdk4 and mediates cell cycle arrest. *Cell Cycle*, 9(23), 4638–4649.
52. Meissl, K., Simonović, N., Amenitsch, L., Witalisz-Siepracka, A., Klein, K., Lassnig, C., Puga, A., Vogl, C., Poelzl, A., Bosmann, M., Dohnal, A., Sexl, V., Müller, M., & Strobl, B. (2020). STAT1 isoforms differentially regulate NK cell maturation and anti-tumor activity. *Frontiers in Immunology*, 11, 2189.
53. Zhou F. (2009). Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *International Reviews of Immunology*, 28(3-4), 239–260.
54. Ma, D., Huang, H. & Huang, Z. (2010). STAT1 signaling is required for optimal Th1 cell differentiation in mice. *Chinese Science Bulletin*. 55, 1032–1040.
55. Vicetti Miguel, R. D., Cherpes, T. L., Watson, L. J., & McKenna, K. C. (2010). CTL induction of tumoricidal nitric oxide production by intratumoral macrophages is critical for tumor elimination. *Journal of Immunology*, 185(11), 6706–6718.
56. Tanaka, A., Zhou, Y., Ogawa, M., Shia, J., Klimstra, D. S., Wang, J. Y., & Roehrl, M. H. (2020). STAT1 as a potential prognosis marker for poor outcomes of early stage colorectal cancer with microsatellite instability. *Plos One*, 15(4), e0229252.
57. Wang, S., Darini, C., Désaubry, L., & Koromilas, A. E. (2016). STAT1 promotes KRAS colon tumor growth and susceptibility to pharmacological inhibition of translation initiation factor eIF4A. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(12), 3055–3063.
58. Zaki, M. H., Vogel, P., Body-Malapel, M., Lamkanfi, M., & Kanneganti, T. D. (2010). IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. *Journal of Immunology*, 185(8), 4912–4920.
59. Flood, B., Manils, J., Nulty, C., Flis, E., Kenealy, S., Barber, G., Fay, J., Mills, K., Kay, E. W., & Creagh, E. M. (2019). Caspase-11 regulates the tumor suppressor function of STAT1 in a murine model of colitis-associated carcinogenesis. *Oncogene*, 38(14), 2658–2674.
60. Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal For Clinicians*, Advance online publication.

61. Snyder, C., & Hampel, H. (2019). Hereditary colorectal cancer syndromes. *Seminars in Oncology Nursing*, 35(1), 58–78.
62. Stastna, M., Janeckova, L., Hrckulak, D., Kriz, V., & Korinek, V. (2019). Human colorectal cancer from the perspective of mouse models. *Genes*, 10(10), 788.
63. Johnson, C. M., Wei, C., Ensor, J. E., Smolenski, D. J., Amos, C. I., Levin, B., & Berry, D. A. (2013). Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control*, 24(6), 1207–1222.
64. Eaden, J. A., Abrams, K. R., & Mayberry, J. F. (2001). The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*, 48(4), 526–535.
65. Itzkowitz, S. H., & Yio, X. (2004). Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *American journal of physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 287(1), G7–G17.
66. Schneider, M. R., Dahlhoff, M., Horst, D., Hirschi, B., Trüzlusch, K., Müller-Höcker, J., Vogelmann, R., Allgäuer, M., Gerhard, M., Steininger, S., Wolf, E., & Kolligs, F. T. (2010). A key role for E-cadherin in intestinal homeostasis and Paneth cell maturation. *Plos One*, 5(12), e14325.
67. Maloy, K. J., & Powrie, F. (2011). Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature*, 474(7351), 298–306.
68. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203), 436–444.
69. Frick, A., Khare, V., Paul, G., Lang, M., Ferk, F., Knasmüller, S., Beer, A., Oberhuber, G., & Gasche, C. (2018). Overt increase of oxidative stress and DNA damage in murine and human colitis and colitis-associated neoplasia. *Molecular Cancer Research: MCR*, 16(4), 634–642.
70. Yaeger, R., Shah, M. A., Miller, V. A., Kelsen, J. R., Wang, K., Heins, Z. J., Ross, J. S., He, Y., Sanford, E., Yantiss, R. K., Balasubramanian, S., Stephens, P. J., Schultz, N., Oren, M., Tang, L., & Kelsen, D. (2016). Genomic alterations observed in colitis-associated cancers are distinct from those found in sporadic colorectal cancers and vary by type of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 151(2), 278–287.
71. Robles, A. I., Traverso, G., Zhang, M., Roberts, N. J., Khan, M. A., Joseph, C., Lauwers, G. Y., Selaru, F. M., Popoli, M., Pittman, M. E., Ke, X., Hruban, R. H., Meltzer, S. J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Harris, C. C., & Papadopoulos, N. (2016). Whole-exome sequencing analyses of inflammatory bowel disease-associated colorectal cancers. *Gastroenterology*, 150(4), 931–943.
72. Fujita, M., Matsubara, N., Matsuda, I., Maejima, K., Oosawa, A., Yamano, T., Fujimoto, A., Furuta, M., Nakano, K., Oku-Sasaki, A., Tanaka, H., Shiraishi, Y., Mateos, R. N., Nakai, K., Miyano, S., Tomita, N., Hirota, S., Ikeuchi, H., & Nakagawa, H. (2017). Genomic landscape of colitis-associated cancer indicates the impact of chronic inflammation and its stratification by mutations in the Wnt signaling. *Oncotarget*, 9(1), 969–981.

73. Kraus, S., & Arber, N. (2009). Inflammation and colorectal cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(4), 405–410.
74. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
75. West, N. R., McCuaig, S., Franchini, F., & Powrie, F. (2015). Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nature Reviews Immunology*, 15(10), 615–629.
76. Rungelrath, V., Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2020). Neutrophils in innate immunity and systems biology-level approaches. *Systems Biology and Medicine*, 12(1), e1458.
77. Bronte, V., Brandau, S., Chen, S. H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., Mandruzzato, S., Murray, P. J., Ochoa, A., Ostrand-Rosenberg, S., Rodriguez, P. C., Sica, A., Umansky, V., Vonderheide, R. H., & Gabrilovich, D. I. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications*, 7, 12150.
78. Aarts, C., & Kuijpers, T. W. (2018). Neutrophils as myeloid-derived suppressor cells. *European Journal of Clinical Investigation*, 48 Suppl 2, e12989.
79. Mayadas, T. N., Cullere, X., & Lowell, C. A. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annual Review of Pathology*, 9, 181–218.
80. Borregaard N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33(5), 657–670.
81. Petri, B., & Sanz, M. J. (2018). Neutrophil chemotaxis. *Cell and Tissue Research*, 371(3), 425–436.
82. van der Linden, M., & Meyaard, L. (2016). Fine-tuning neutrophil activation: Strategies and consequences. *Immunology Letters*, 178, 3–9.
83. Kolaczowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13(3), 159–175.
84. Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., de Boer, R. J., Borghans, J. A., Tesselaar, K., & Koenderman, L. (2010). In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, 116(4), 625–627.
85. Yan, J., Kloecker, G., Fleming, C., Bousamra, M., 2nd, Hansen, R., Hu, X., Ding, C., Cai, Y., Xiang, D., Donniger, H., Eaton, J. W., & Clark, G. J. (2014). Human polymorphonuclear neutrophils specifically recognize and kill cancerous cells. *Oncoimmunology*, 3(7), e950163.
86. Sun, B., Qin, W., Song, M., Liu, L., Yu, Y., Qi, X., & Sun, H. (2018). Neutrophil suppresses tumor cell proliferation via Fas /Fas Ligand pathway mediated cell cycle arrested. *International Journal of Biological Sciences*, 14(14), 2103–2113.

87. Matlung, H. L., Babes, L., Zhao, X. W., van Houdt, M., Treffers, L. W., van Rees, D. J., Franke, K., Schornagel, K., Verkuijlen, P., Janssen, H., Halonen, P., Liefink, C., Beijersbergen, R. L., Leusen, J., Boelens, J. J., Kuhnle, I., van der Werff Ten Bosch, J., Seeger, K., Rutella, S., Pagliara, D., van den Berg, T. K. (2018). Neutrophils kill antibody-opsonized cancer cells by trogoptosis. *Cell Reports*, 23(13), 3946–3959.e6.
88. Jablonska, J., Wu, C. F., Andzinski, L., Leschner, S., & Weiss, S. (2014). CXCR2-mediated tumor-associated neutrophil recruitment is regulated by IFN- β . *International Journal of Cancer*, 134(6), 1346–1358.
89. Knaapen, A. M., Güngör, N., Schins, R. P., Borm, P. J., & Van Schooten, F. J. (2006). Neutrophils and respiratory tract DNA damage and mutagenesis: a review. *Mutagenesis*, 21(4), 225–236.
90. Gloire, G., Legrand-Poels, S., & Piette, J. (2006). NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical Pharmacology*, 72(11), 1493–1505.
91. Wen, C., Wang, H., Wu, X., He, L., Zhou, Q., Wang, F., Chen, S., Huang, L., Chen, J., Wang, H., Ye, W., Li, W., Yang, X., Liu, H., & Peng, J. (2019). ROS-mediated inactivation of the PI3K/AKT pathway is involved in the antigastric cancer effects of thioredoxin reductase-1 inhibitor chaetocin. *Cell Death & Disease*, 10(11), 809.
92. Son, Y., Cheong, Y. K., Kim, N. H., Chung, H. T., Kang, D. G., & Pae, H. O. (2011). Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways?. *Journal of Signal Transduction*, 2011, 792639.
93. Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D., & Gabrilovich, D. I. (2004). Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *Journal of Immunology*, 172(2), 989–999.
94. Felix, K., & Gaida, M. M. (2016). Neutrophil-derived proteases in the microenvironment of pancreatic cancer-active players in tumor progression. *International Journal of Biological Sciences*, 12(3), 302–313.
95. Tecchio, C., Micheletti, A., & Cassatella, M. A. (2014). Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Frontiers in Immunology*, 5, 508.
96. Queen, M. M., Ryan, R. E., Holzer, R. G., Keller-Peck, C. R., & Jorcyk, C. L. (2005). Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Research*, 65(19), 8896–8904.
97. Sharma, B., Nawandar, D. M., Nannuru, K. C., Varney, M. L., & Singh, R. K. (2013). Targeting CXCR2 enhances chemotherapeutic response, inhibits mammary tumor growth, angiogenesis, and lung metastasis. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(5), 799–808.

98. Absenger, G., Szkandera, J., Stotz, M., Postlmayr, U., Pichler, M., Ress, A. L., Schaberl-Moser, R., Loibner, H., Samonigg, H., & Gerger, A. (2013). Preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts clinical outcome in patients with stage II and III colon cancer. *Anticancer Research*, 33(10), 4591–4594.
99. Dimitriou, N., Felekouras, E., Karavokyros, I., Alexandrou, A., Pikoulis, E., & Griniatsos, J. (2018). Neutrophils to lymphocytes ratio as a useful prognosticator for stage II colorectal cancer patients. *BMC Cancer*, 18(1), 1202.
100. Rao, H. L., Chen, J. W., Li, M., Xiao, Y. B., Fu, J., Zeng, Y. X., Cai, M. Y., & Xie, D. (2012). Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. *Plos One*, 7(1), e30806.
101. Berry, R. S., Xiong, M. J., Greenbaum, A., Mortaji, P., Nofchissey, R. A., Schultz, F., Martinez, C., Luo, L., Morris, K. T., & Hanson, J. A. (2017). High levels of tumor-associated neutrophils are associated with improved overall survival in patients with stage II colorectal cancer. *Plos One*, 12(12), e0188799.
102. Zhou, G., Peng, K., Song, Y., Yang, W., Shu, W., Yu, T., Yu, L., Lin, M., Wei, Q., Chen, C., Yin, L., Cong, Y., & Liu, Z. (2018). CD177+ neutrophils suppress epithelial cell tumorigenesis in colitis-associated cancer and predict good prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 39(2), 272–282.
103. Horvath, C. M., & Darnell, J. E., Jr (1996). The antiviral state induced by alpha interferon and gamma interferon requires transcriptionally active Stat1 protein. *Journal of Virology*, 70(1), 647–650.
104. Kaplan M. H. (2013). STAT signaling in inflammation. *JAK-STAT*, 2(1), e24198.
105. Burke, S. J., Lu, D., Sparer, T. E., Masi, T., Goff, M. R., Karlstad, M. D., & Collier, J. J. (2014). NF- κ B and STAT1 control CXCL1 and CXCL2 gene transcription. *American journal of physiology: Endocrinology and Metabolism*, 306(2), E131–E149.
106. Trinchieri G. (2010). Type I interferon: friend or foe?. *The Journal Of Experimental Medicine*, 207(10), 2053–2063.
107. Rauch, I., Müller, M., & Decker, T. (2013). The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAK-STAT*, 2(1), e23820.
108. Varikuti, S., Oghumu, S., Elbaz, M., Volpedo, G., Ahirwar, D. K., Alarcon, P. C., Sperling, R. H., Moretti, E., Pioso, M. S., Kimble, J., Nasser, M. W., Ganju, R. K., Terrazas, C., & Satoskar, A. R. (2017). STAT1 gene deficient mice develop accelerated breast cancer growth and metastasis which is reduced by IL-17 blockade. *Oncoimmunology*, 6(11), e1361088.
109. Geng, S., Zhang, Y., Lee, C., & Li, L. (2019). Novel reprogramming of neutrophils modulates inflammation resolution during atherosclerosis. *Science Advances*, 5(2), eaav2309.

110. Ellis, T. N., & Beaman, B. L. (2004). Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology*, 112(1), 2–12.
111. Marchi, L. F., Sesti-Costa, R., Ignacchiti, M. D., Chedraoui-Silva, S., & Mantovani, B. (2014). In vitro activation of mouse neutrophils by recombinant human interferon-gamma: increased phagocytosis and release of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines. *International Immunopharmacology*, 18(2), 228–235.
112. Little, R., White, M. R., & Hartshorn, K. L. (1994). Interferon-alpha enhances neutrophil respiratory burst responses to stimulation with influenza A virus and FMLP. *The Journal of Infectious Diseases*, 170(4), 802–810.
113. Bertin, F. R., Rys, R. N., Mathieu, C., Laurance, S., Lemarié, C. A., & Blostein, M. D. (2019). Natural killer cells induce neutrophil extracellular trap formation in venous thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 17(2), 403–414.
114. Martinelli, S., Urosevic, M., Daryadel, A., Oberholzer, P. A., Baumann, C., Fey, M. F., Dummer, R., Simon, H. U., & Yousefi, S. (2004). Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 44123–44132.
115. Wang, G., Lin, A., Han, Q., Zhao, H., Tian, Z., & Zhang, J. (2018). IFN- γ protects from apoptotic neutrophil-mediated tissue injury during acute *Listeria monocytogenes* infection. *European Journal of Immunology*, 48(9), 1470–1480.
116. de Kleijn, S., Langereis, J. D., Leentjens, J., Kox, M., Netea, M. G., Koenderman, L., Ferwerda, G., Pickkers, P., & Hermans, P. W. (2013). IFN- γ -stimulated neutrophils suppress lymphocyte proliferation through expression of PD-L1. *Plos One*, 8(8), e72249.
117. Langereis, J. D., Pickkers, P., de Kleijn, S., Gerretsen, J., de Jonge, M. I., & Kox, M. (2017). Spleen-derived IFN- γ induces generation of PD-L1+ suppressive neutrophils during endotoxemia. *Journal of Leukocyte Biology*, 102(6), 1401–1409.
118. Sun, R., Xiong, Y., Liu, H., Gao, C., Su, L., Weng, J., Yuan, X., Zhang, D., & Feng, J. (2020). Tumor-associated neutrophils suppress antitumor immunity of NK cells through the PD-L1/PD-1 axis. *Translational Oncology*, 13(10), 100825.
119. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. (2011). Guide for the care and use of laboratory animals. (8th ed.). *National Academies Press (US)*.
120. 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 sulfate. *Cancer Science*, 94(11), 965–973.

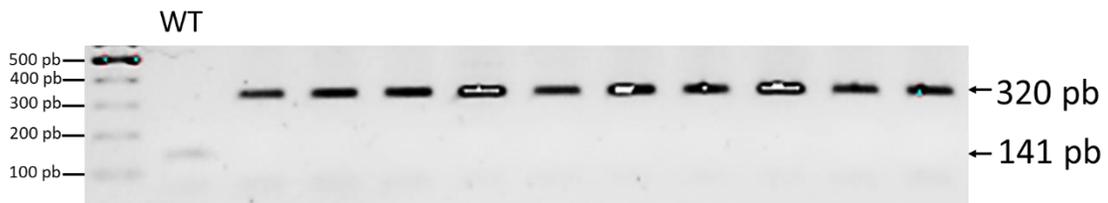
121. Thaker, A. I., Shaker, A., Rao, M. S., & Ciorba, M. A. (2012). Modeling colitis-associated cancer with azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS). *Journal of Visualized Experiments: JOVE*, (67), 4100.
122. JoVE Science Education Database: General Laboratory Techniques. (2018). Histological Sample Preparation for Light Microscopy. *Journal Of Visualized Experiments: JOVE*.
123. Sampias, C. & Rolls, G. (2018). H&E staining overview: a guide to best practices. *Leica Biosystems Division of Leica Microsystems Inc.* <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/he-staining-overview-a-guide-to-best-practices>.
124. Dong, W., Matsuno, Y. K., & Kameyama, A. (2012). A procedure for Alcian blue staining of mucins on polyvinylidene difluoride membranes. *Analytical Chemistry*, 84(20), 8461–8466.
125. Lanza, G., Messerini, L., Gafà, R., Risio, M., Gruppo Italiano Patologi Apparato Digerente (GIPAD), & Società Italiana di Anatomia Patologica e Citopatologia Diagnostica/International Academy of Pathology, Italian division (SIAPEC/IAP) (2011). Colorectal tumors: the histology report. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of The Italian Society of Gastroenterology and The Italian Association for The Study of The Liver*, 43 Suppl 4, S344–S355.
126. Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(3), 153–173.
127. Brelje, C. & Sorenson L. R. (2018). Virtual microscopy laboratory. *Histology Guide*. <http://www.histologyguide.com/>
128. Saraiva, L., Wang, L., Kammel, M., Kummrow, A., Atkinson, E., Lee, J. Y., Yalcinkaya, B., Akgöz, M., Höckner, J., Ruf, A., Engel, A., Zhang, Y. Z., O'Shea, O., Sassi, M. P., Divieto, C., Lekishvili, T., Campbell, J., Liu, Y., Wang, J., Stebbings, R., ... Vessillier, S. (2019). Comparison of volumetric and bead-based counting of CD34 cells by single-platform flow cytometry. *Clinical Cytometry*, 96(6), 508–513.
129. Christou, N., Perraud, A., Blondy, S., Jauberteau, M. O., Battu, S., & Mathonnet, M. (2017). E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis. *Oncology Letters*, 13(6), 4571–4576.
130. Tian, X., Liu, Z., Niu, B., Zhang, J., Tan, T. K., Lee, S. R., Zhao, Y., Harris, D. C., & Zheng, G. (2011). E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 567305.
131. Han, J., & Theiss, A. L. (2014). Stat3: friend or foe in colitis and colitis-associated cancer?. *Inflammatory Bowel Diseases*, 20(12), 2405–2411.
132. Patel, M., Horgan, P. G., McMillan, D. C., & Edwards, J. (2018). NF- κ B pathways in the development and progression of colorectal cancer. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 197, 43–56.

133. Ito, H., & Seishima, M. (2010). Regulation of the induction and function of cytotoxic T lymphocytes by natural killer T cell. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 641757.
134. Gil, M. P., Salomon, R., Louten, J., & Biron, C. A. (2006). Modulation of STAT1 protein levels: a mechanism shaping CD8 T-cell responses in vivo. *Blood*, 107(3), 987–993.
135. Quigley, M., Huang, X., & Yang, Y. (2008). STAT1 signaling in CD8 T cells is required for their clonal expansion and memory formation following viral infection in vivo. *Journal of Immunology*, 180(4), 2158–2164.
136. Tau, G. Z., Cowan, S. N., Weisburg, J., Braunstein, N. S., & Rothman, P. B. (2001). Regulation of IFN-gamma signaling is essential for the cytotoxic activity of CD8(+) T cells. *Journal of Immunology*, 167(10), 5574–5582.
137. Kohlmeier, J. E., Cookenham, T., Roberts, A. D., Miller, S. C., & Woodland, D. L. (2010). Type I interferons regulate cytolytic activity of memory CD8(+) T cells in the lung airways during respiratory virus challenge. *Immunity*, 33(1), 96–105.
138. Stoiber, W., Obermayer, A., Steinbacher, P., & Krautgartner, W. D. (2015). The role of reactive oxygen species (ROS) in the formation of extracellular traps (ETs) in humans. *Biomolecules*, 5(2), 702–723.
139. Qing, Y., & Stark, G. R. (2004). Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *The Journal Of Biological Chemistry*, 279(40), 41679–41685.
140. Shen, Y., Devgan, G., Darnell, J. E., Jr, & Bromberg, J. F. (2001). Constitutively activated Stat3 protects fibroblasts from serum withdrawal and UV-induced apoptosis and antagonizes the proapoptotic effects of activated Stat1. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 98(4), 1543–1548.
141. Wang, Y., Wu, T. R., Cai, S., Welte, T., & Chin, Y. E. (2000). Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF-kappaB activation. *Molecular and Cellular Biology*, 20(13), 4505–4512.
142. Li, W., Huang, X., Tong, H., Wang, Y., Zhang, T., Wang, W., Dai, L., Li, T., Lin, S., & Wu, H. (2012). Comparison of the regulation of β -catenin signaling by type I, type II and type III interferons in hepatocellular carcinoma cells. *Plos One*, 7(10), e47040.
143. Liu, L., Okada, S., Kong, X. F., Kreins, A. Y., Cypowyj, S., Abhyankar, A., Toubiana, J., Itan, Y., Audry, M., Nitschke, P., Masson, C., Toth, B., Flatot, J., Migaud, M., Chrabieh, M., Kochetkov, T., Bolze, A., Borghesi, A., Toulon, A., Hiller, J., ... Casanova, J. L. (2011). Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(8), 1635–1648.
144. 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. *Journal of Immunology*, 195(9), 4144–4153.

145. Schwarzenberger, P., Huang, W., Ye, P., Oliver, P., Manuel, M., Zhang, Z., Bagby, G., Nelson, S., & Kolls, J. K. (2000). Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *Journal of Immunology*, 164(9), 4783–4789.
146. Nguyen-Jackson, H., Panopoulos, A. D., Zhang, H., Li, H. S., & Watowich, S. S. (2010). STAT3 controls the neutrophil migratory response to CXCR2 ligands by direct activation of G-CSF-induced CXCR2 expression and via modulation of CXCR2 signal transduction. *Blood*, 115(16), 3354–3363.
147. Hix, L. M., Karavitis, J., Khan, M. W., Shi, Y. H., Khazaie, K., & Zhang, M. (2013). Tumor STAT1 transcription factor activity enhances breast tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(17), 11676–11688.

Anexos

Anexo 1: Genotipo de los ratones STAT1^{-/-}. Para la creación de los ratones STAT1^{-/-}, se insertó un casete resistente a neomicina que reemplazó 5.7 kb de la secuencia del gen de STAT1. Esta secuencia incluye tres exones y una porción de un aminoácido en posición 221-365, su alteración genera una proteína no funcional (The Jackson Laboratory). Para comprobar el genotipo de los ratones, se utilizaron los cebadores diseñados por The Jackson Laboratory, estos generan un producto de 141 bp para el gen WT y 320 bp para el gen con el casete resistente a neomicina.



Cebador	Secuencia 5'---> 3'
Mutante reverse	TGT GGT TTC CAA ATG TGT CAG
Común	TGC ACA TGA GTT TAT TCC ACC T
Wild type reverse	GGC GAG AAG CTG AGC A

Anexo 2: Aprobación del comité de ética de la FESI-UNAM. Todos los procedimientos experimentales y manejo animal fueron aprobados por el Comité de Ética de la FESI-UNAM (CE/FESI/042017/1168).



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala
COMISIÓN DE ÉTICA



Los Reyes Iztacala a 18/04/2017

Oficio: CE/FESI/042017/1168

DR. TERRAZAS VALDES LUIS IGNACIO

Presente:

En atención a su solicitud de aval, por la Comisión de Ética de esta facultad, para su proyecto denominado **Procesos Inflamatorios Asociados al Inicio y Desarrollo del Cáncer de Colon Asociado a Colitis: Papel de las Moléculas Stat6, Stat1 e IL-4Ra** que va a someter a Convocatoria CONACYT, Convocatoria PAPIIT, Convocatoria Concursos, Artículos científicos.

Esta comisión acordó la siguiente opinión técnica:

Avalado sin recomendaciones

Sin otro particular por el momento, quedamos a sus órdenes para cualquier aclaración y aprovechamos la oportunidad para enviarle un atento saludo y nuestro respeto académico.

Atentamente

M. en C. María Eugenia Isabel Heres y Pulido
Presidente

