



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

MECANISMOS INMUNOLÓGICOS DE LA RESPUESTA INMUNE QUE  
CONDUCE EL DESARROLLO DE CÁNCER DE COLON ASOCIADO A  
COLITIS EN LA AUSENCIA DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR LA CADENA  
ALFA DEL RECEPTOR DE INTERLEUCINA 4 EN UN MODELO MURINO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

GUADALUPE ITZEL MEDINA ANDRADE

TUTOR

DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VÁLDES  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR

DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA  
FACULTAD DE MEDICINA

DR. JORGE MORALES MONTOR  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, FEBRERO DE 2022



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.

El presente trabajo fue financiado por las siguientes instituciones y proyectos:

CONACYT (México). Beca 609521.

DGAPA- PAPIIT IN226519

CONACYT A-S1 37879

CONACYT 315817 (2021)

## **Agradecimientos**

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica:  
la voluntad” **Albert Einstein.**

Han pasado ya varios años desde que al salir de la Lic. en Enfermería tome la decisión de que me quería dedicar a la investigación. Sin embargo, el tomar esta decisión no me ha involucrado únicamente a mi, ya que a lo largo de este amplio recorrido personas muy importantes han puesto su granito de arena para permitirme estar en donde me encuentro ahora. Y a ellos son a quienes agradezco y dedico este trabajo.

Gracias, mamá y papá por todo su esfuerzo, sus desvelos y sus consejos. Este logro también es suyo y me siento profundamente orgullosa de ser su hija. Los amo.

Gracias al Dr. Javier Alonso Trujillo usted ha sido un parteaguas muy importante en mi vida profesional, usted me enseñó y ánimo a perseguir mis sueños y además me dio las herramientas para construirlos.

Gracias Dr. Terrazas por haber aceptado ser mi tutor, usted me abrió la puerta de su laboratorio, me permitió integrarme a su grupo, me guió en mi preparación académica y me enseñó la importancia de la paciencia.

Dr. Efraín Olguín creo que el recorrido para la elaboración de este proyecto de tesis no hubiera sido el mismo sin tí en el, es más ni siquiera creo que esta tesis hubiese sido escrita por mi. Existieron muchos momentos en los que no me creí capaz y momentos en los que quise renunciar, sin embargo tú siempre me acompañaste y alentaste a seguir adelante. Me impulsaste en cada proceso y me mostraste que el valor de una persona no viene de donde proviene, si no de lo que pueda aportar. Gracias por los consejos, por las horas de enseñanza, por las horas dedicadas a mis experimentos, por tu compañía, por los debates, y sobretodo por tu amistad. Gracias por estar desde los comienzos y aún seguir hasta el día de hoy ¡Simplemente, Gracias totales!

Gracias Alonso, Vicky y Eli. Sin duda, su compañía en el laboratorio hizo que las cosas fluyeran más rápido durante el trabajo. Los tres siempre han sido muy comprometidos y a su manera han sabido adaptarse en el laboratorio. Me siento muy afortunada de haberlos conocido y de haber compartido muy bonitas experiencias con ustedes, desde un café y una buena plática, una película e incluso hasta una boda. Gracias por haberme acompañado en este recorrido y por favor recuerden que pueden llegar tan lejos como ustedes lo deseen. Los quiero.

Gracias Fanny por tú dedicación, por tú compromiso y por tus horas de esfuerzo para poder realizar este trabajo. Gracias por ser mi apoyo y buena consejera. De ti he aprendido grandes cualidades y te admiro como mujer. Nunca dejes de soñar.

Gracias a mi esposo Sam, por animarme a seguir adelante con mis proyectos, por arriesgarte junto conmigo y dejarlo todo por mí, tú familia, tus amigos e incluso tú estabilidad. No hay forma en la que pueda agradecerte todo esto. Eres mi mejor equipo de vida. Te amo!.

Por último, pero no menos importante, ¡Gracias Itzel Medina!

## Contenido

<b>1. Resumen.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción .....</b>	<b>6</b>
<b>3. Antecedentes .....</b>	<b>8</b>
3.1 Cáncer Colorrectal.....	8
3.2 Factores Etiológicos asociados al desarrollo de cáncer colorrectal.....	9
3.3 Enfermedades Inflammatorias del Intestino (IBD) .....	10
3.4 La inflamación como proceso homeostático .....	11
3.5 Inflamación y la anti-inflamación durante el desarrollo de CAC.....	13
3.7 Macrófagos en la homeostasis intestinal .....	17
3.8 Macrófagos y cáncer de colon asociado a colitis. ....	20
<b>4.0 Hipótesis .....</b>	<b>24</b>
<b>5.0 Objetivo General .....</b>	<b>25</b>
5.1 Objetivos específicos.....	25
<b>6.0 Materiales y métodos.....</b>	<b>27</b>
6.1 Ratones.....	27
6.3 Modelo de inducción CAC.....	28
6.4 Análisis Histológico. ....	28
6.5 Inmunofluorescencia de tejido. ....	29
6.6 Aislamiento de células de tumores de colon para citometría deflujo.....	30
6.7 Citometría de Flujo.....	31
6.8 Factores de transcripción en células de colon para citometría deflujo.....	31
6.9 Cultivo celular y cuantificación de citocinas. ....	32
6.10 Aislamiento de ARN y RT- PCR. ....	32
6.11 Análisis estadístico. ....	33
<b>7.0 Resultados .....</b>	<b>34</b>

<b>7.2 La ausencia de IL-4R<math>\alpha</math> favorece el reclutamiento de macrófagos M1 en colon que pueden promover una respuesta inflamatoria protectora.....</b>	<b>37</b>
7.3 La expresión de IL-4R $\alpha$ en macrófagos no está directamente relacionada con el desarrollo de tumores en el CAC.....	40
7.4 La infiltración en colon de macrófagos M1 en ratones LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-/lox</sup> -CAC no es suficiente para evitar el desarrollo de tumores en colon.....	42
<b>8.0 Discusión .....</b>	<b>51</b>
<b>9.0 Referencias .....</b>	<b>59</b>

## 1. Resumen

En las últimas dos décadas se ha sugerido una relación estrecha entre la inflamación y el riesgo de desarrollar cáncer de colon. De hecho, se ha estimado que los pacientes diagnosticados con algún tipo de enfermedad inflamatoria del intestino como la colitis ulcerante o la enfermedad de Crohn tienen un riesgo elevado de desarrollar cáncer de colon asociado a colitis (CAC). Por el contrario, hay evidencia que demuestra que las vías antiinflamatorias como la mediada por la cadena  $\alpha$  del receptor de *IL-4* (*IL4R $\alpha$* ) pueden favorecer el desarrollo de tumores. En un modelo experimental de CAC, nosotros encontramos que la disminución en el desarrollo de tumores, en ratones con *knock-out* global del *IL-4R $\alpha$* , podía asociarse con una respuesta inflamatoria mediada por la infiltración en colon de macrófagos *M1* (*F480<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup>STAT1<sup>+</sup>iNOS*) así como por la producción de *IFN- $\gamma$*  y *TNF $\alpha$* . Sin embargo, en ratones con un *knock-out* específico del *IL-4R $\alpha$*  en macrófagos (*LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-/lox</sup>*) expuestos al CAC, a pesar de tener una infiltración elevada de macrófagos *M1* en el colon, estos ratones eran susceptibles al desarrollo de tumores al igual que los ratones *wild-type*. Estos datos nos sugirieron que en el microambiente tumoral tanto la ausencia de la expresión del *IL-4R $\alpha$*  en macrófagos, así como la presencia de macrófagos *M1* en colon no se asociaban directamente con un papel protector que impidiera el desarrollo de tumores. Por lo cual, es posible que la expresión del



*IL-4R $\alpha$*  en otros tipos celulares como las células epiteliales, podrían tener un papel más crítico como promotores del desarrollo tumoral en el CAC.

## Abreviaturas

CCR	Cáncer colorectal
AOM	Azoximetano
CAC	Cáncer de colon asociado a colitis
DSS	Dextrán sulfato de sodio
<i>IL-4R</i> □	Cadena alfa del receptor de interleucina 4
IL-4R	Receptor de interleucina 4
IL-4	Interleucina 4
IBDs	Enfermedades Inflammatorias del Intestino
UC	Colitis ulcerante
CD	Enfermedad de Crohn
TAMs	Macrófagos asociados a tumores
M2	Macrófagos alternativamente activados
M1	Macrófagos clásicamente activados
<i>FAP</i>	Síndrome de poliposis adenomatosa familiar
<i>HNPCC</i>	Enfermedad de Lynch (Cáncer colorectal no polipósico hereditario)
<i>APC</i>	Gen Poliposis adenomatosa coli
<i>CD</i>	Células dendríticas
<i>TLRs</i>	Receptores tipo toll
<i>ROS</i>	Especies reactivas del oxígeno
<i>RNI</i>	Intermediarios reactivos del oxígeno
<i>IL-13</i>	Interleucina 13
<i>STAT6</i>	Transductor de señal y activador de la señal 6
<i>JAKs</i>	Proteínas cinasas jano
<i>PGE2</i>	Prostaglandina E2
<i>IL-12</i>	Interleucina 12
<i>IL-1</i>	Interleucina 1
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	Factor de Necrosis Tumoral
<i>IL-10</i>	Interleucina 10
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	Interferon gamma

<i>LPS</i>	Lipopolisacárido
<i>TGF-B</i>	Factor de crecimiento transformante beta
<i>TREM2</i>	Receptores activadores expresados en células mieloides
<i>TNBS</i>	Ácido trinitrobencenosulfónico
<i>CSF-1</i>	Factor estimulante de colonias
<i>GM-CSF</i>	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
<i>CCL2/MCP1</i>	Ligando de quimiocina 2
<i>IDO</i>	Enzima indolamina 2,3- dioxigenasa
<i>PD1</i>	Proteína de muerte celular programada 1
<i>MMP4</i>	Metaloproteasa 4
<i>VEGF</i>	Factor de crecimiento endotelial- vascular
<i>PDGF</i>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<i>EGF</i>	Factor de crecimiento epidérmico
<i>bFGF</i>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<i>iNOS</i>	Óxido nítrico sintasa inducible
<i>Arg</i>	Arginasa
<i>STAT1</i>	Transductor de señal y activador de la señal 1
<i>WT</i>	Tipo silvestre
<i>I.P</i>	Intraperitoneal
<i>H&amp;E</i>	Tinción con hematoxilina y eosina
<i>PBS</i>	Buffer fosfato salino
<i>BSA</i>	Albúmina de suero bovino
<i>FACS</i>	Buffer de tinción para citometría de flujo
<i>MLN</i>	Células de ganglios linfáticos mesentéricos
<i>RPMI</i>	Medio Roswell Park Memorial Institute
<i>Relma</i>	Molécula alfa similar a la resistencia
<i>DAPI</i>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<i>GAPDH</i>	Enzima Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
<i>pSTAT6</i>	Transductor de señal y activador de la señal 6, fosforilado
<i>IL13Ra2</i>	Receptor de la interleucina 13 tipo 2
<i>IEC</i>	Células epiteliales intestinales secretoras

*BrdU*

Bromodesoxiuridina

*VCAM-1/alfa4*

Integrina de células endoteliales

## **2. Introducción**

En el mundo se diagnostican alrededor de 14.1 millones de nuevos casos por cáncer y cerca de 8.2 millones de muertes relacionadas con algún tipo de cáncer. Entre los 5 tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad en el mundo se encuentra el cáncer colorectal (**CCR**) (1). El desarrollo de **CCR** tiene diferentes orígenes relacionados con factores genéticos, ambientales y esporádicos. Sin embargo, entre un 15 y un 20% de los casos totales de **CCR** se han asociado con procesos inflamatorios, como lo son las enfermedades inflamatorias del intestino (**IBD**) como la colitis ulcerante (**UC**) y la enfermedad de Crohn (**CD**) (2). Las cuales, incrementan hasta en un 20% el riesgo de desarrollar cáncer de colon asociado a colitis (**CAC**) en pacientes diagnosticados con algún tipo de **IBD**. De esta forma, en las últimas dos décadas se comenzó a sugerir una relación estrecha entre la inflamación y los procesos tumorigénicos ya que para el año 2000 había indicios de que la inflamación podía ayudar a las neoplasias incipientes a adquirir diferentes habilidades para crecer. Por lo cual, la inflamación se ha considerado como uno de los 10 hallmarks of cáncer (3, 4). Por el contrario, también se ha demostrado que una respuesta antiinflamatoria, mediada por la interleucina 4 (**IL-4**), es capaz de promover la proliferación y el crecimiento de células tumorales mientras que, la expresión de su receptor, el receptor de **IL-4** (**IL-4R**), se ha observado altamente expresado en modelos *in vivo* e *in vitro* de cáncer de colon (5, 6). En

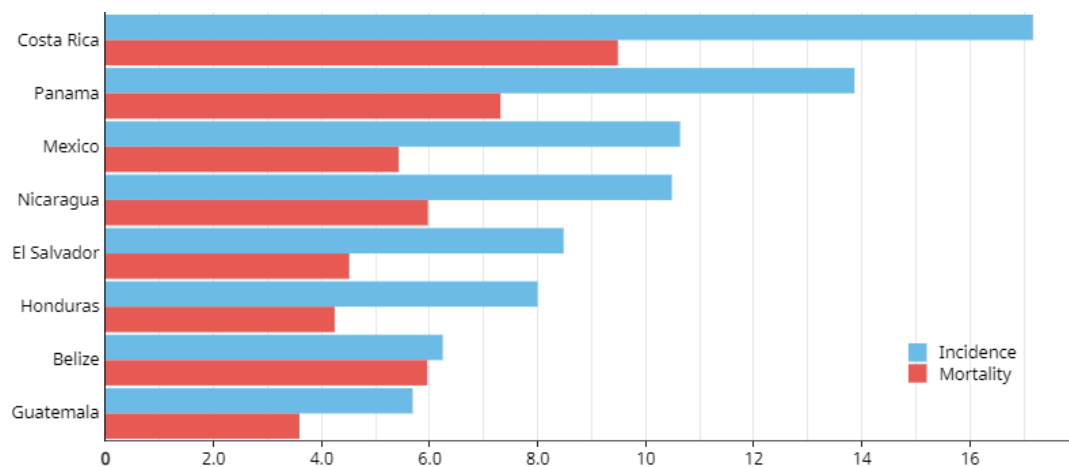
el tumor, el microambiente es capaz de favorecer que los macrófagos infiltrados que expresan el *IL-4R* adquieran fenotipos protumorales como los macrófagos asociados a tumores (*TAM*), generalmente asociados a macrófagos de un perfil de activación alternativo o *M2*, los cuales son capaces de promover el crecimiento y el desarrollo tumoral a través de la inmunosupresión, la angiogénesis y la remodelación de la matriz extracelular (7-9). De forma interesante, también existe evidencia sobre el papel de macrófagos tumorocidas pertenecientes a un perfil de activación clásico o *M1*, capaces de disminuir la progresión tumoral. Sin embargo, en el cáncer de colon los macrófagos infiltrados son en su mayoría *TAMs* (10) cuyo fenotipo protumoral se ve favorecido por la expresión del *IL-4R* (11) así como por la producción de *IL-4* en el microambiente tumoral (12, 13) tanto por células tumorales (14) como por células inmunes (15) (16) (6, 17). Por lo cual, la infiltración elevada de macrófagos ha sido considerada como un predictor de baja supervivencia en pacientes diagnosticados con cáncer de colon (18, 19).

En el presente trabajo evaluamos si en un modelo murino de *CAC*, la ausencia del *IL4R $\alpha$*  y por tanto del fenotipo de *TAMs* podría estar asociada con un menor desarrollo tumoral debido a una respuesta tumorocida mediada por macrófagos *M1*, cuyo perfil de activación se vería favorecido por la ausencia de *IL4R $\alpha$* .

### 3. Antecedentes

#### 3.1 Cáncer Colorrectal.

El cáncer es una de las principales causas de muerte alrededor del mundo tan solo en el 2020 se registraron cerca de 10 millones de fallecimientos. Según datos de Globocan 2020, el cáncer colorrectal (*CCR*) es uno de los tres tipos de cáncer con mayor incidencia y mortalidad entre ambos sexos con casi 1,93 millones de nuevos casos y cerca de 935,000 mil muertes. En América latina, México ocupa el tercer lugar en incidencia y mortalidad por *CCR*, siendo el cuarto tipo de cáncer más común entre la población mexicana con cerca de 11,191 nuevos casos y con casi 6,245 muertes relacionadas. Nuevo León, Baja California sur, Ciudad de México y Chihuahua son los estados en donde se registran el mayor número de muertes por este tipo de cáncer (20).



**Imagen 2.** Tasas estimadas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad en América latina 2020, ambos sexos, todas las edades. Tasa representativa por cada <sup>6</sup> 100, 000 personas.

### **3.2 Factores Etiológicos asociados al desarrollo de cáncer colorectal.**

El desarrollo de *CCR* tiene diferentes orígenes relacionados con factores genéticos, esporádicos y procesos inflamatorios. Los factores genéticos, como el síndrome de poliposis adematoso familiar (*FAP*), la enfermedad de Lynch (Cáncer colorectal no polipósico hereditario/ *HNPCC*) y el síndrome de poliposis hartomatosa representan entre el 2 y el 5% de los casos totales asociados al desarrollo de *CCR* (21). En el mundo, las poblaciones con un riesgo mayor de desarrollar *CCR* asociado a factores genéticos son los judíos israelíes de nacimiento europeo (ashkenazi) debido a una mutación en el gen *APC* (22). En nuestro país, hasta el momento se carecen de registros y datos estadísticos sobre la incidencia de *HNPCC*, *FAP* o enfermedad de *Lynch* que precedan el desarrollo de *CCR* (4). Por otra parte, los factores esporádicos representan aproximadamente el 65% de la mayoría de los casos totales de *CCR* (4), lo que significa que los cambios genéticos que promueven el desarrollo de *CCR* pueden aparecer por casualidad después del nacimiento de una persona y pueden asociarse ya sea a la dieta, al estilo de vida, a la edad o a factores ambientales (23). Mientras que, entre el 10 y el 15% de los casos totales de *CCR* se han asociado con procesos inflamatorios como lo son las enfermedades inflamatorias del intestino (*IBD*) como la colitis ulcerante y la



enfermedad de Crohn, las cuales predisponen el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis (CAC) (24).

### **3.3 Enfermedades Inflamatorias del Intestino (IBD)**

En diversos trabajos se ha demostrado que el riesgo de desarrollar *CAC* cuando se diagnostica una *IBD* es del 2% a los 10 años, del 8% a los 20 años y del 18% a los 30 años (25). Por lo cual, los pacientes diagnosticados con alguna *IBD* se encuentran bajo constante vigilancia médica después de su diagnóstico (25, 26). Sin embargo, nuevos estudios también han demostrado que, el riesgo de desarrollar *CAC* en pacientes con algún tipo de *IBD* no recae exclusivamente en la inflamación, ya que factores como por ejemplo el género, los antecedentes familiares de *CCR* esporádico, el tiempo de seguimiento de la *IBD*, los tratamientos farmacológicos, la exposición a cualquier intervención quirúrgica, o incluso la coexistencia de enfermedades primarias como la colangitis esclerosante pueden aumentar el riesgo de desarrollar *CAC* independientemente del diagnóstico de una *IBD* (27, 28). Por lo cual, la asociación entre las *IBD* y el riesgo de desarrollar *CAC* ha comenzado a cambiar. Por ejemplo, en estudios más recientes se muestra que la incidencia acumulada de desarrollar *CAC* en pacientes con colitis ha sido de aproximadamente 0% a los 10 años, 2,5% a los 20 años, 7,6% a los 30 años, 10,8% a los 40 años y 13,5% a los 45 años, a partir de que se diagnosticó la colitis (29, 30). Por lo cual, es posible que la inflamación no sea la única

responsable de promover el desarrollo de *CAC* y que en realidad su participación tenga un papel paradójico.

### **3.4 La inflamación como proceso homeostático**

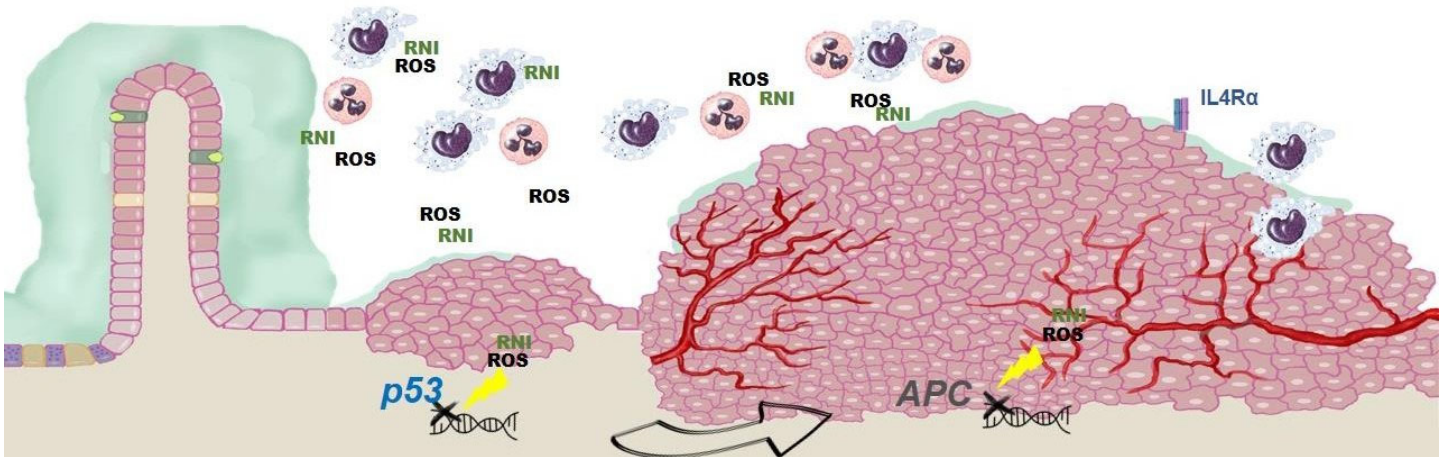
El colon es la porción final del tracto gastrointestinal que cumple las funciones de reabsorber agua, electrolitos y algunos nutrientes que no fueron digeridos y absorbidos en el intestino delgado. El epitelio del colon es cilíndrico simple y se renueva continuamente por células inmaduras que surgen de invaginaciones conocidas como criptas de Lieberkühn que, a su vez también albergan células caliciformes y células enteroendócrinas (31). Histológicamente, las capas del colon son: la submucosa, la muscular de la mucosa, la lámina propia y la mucosa. La lámina propia es la región que alberga tanto a células del sistema inmune innato como macrófagos, eosinófilos, células dendríticas (*DC*) así como a células del sistema inmune adaptativo como linfocitos *T CD4*<sup>+</sup> y *CD8*<sup>+</sup> (31). La mucosa, es la región que da forma a la luz intestinal favoreciendo la interacción constante entre el sistema inmune y la microbiota del colon, que está formada por billones de bacterias de especies diferentes (4). La interacción entre las bacterias y las células del sistema inmune en el colon genera un ambiente de simbiosis entre ambas poblaciones. Por un lado, la microbiota contribuye a la protección previniendo el crecimiento de patógenos mientras que, el sistema inmune permite que la microbiota se establezca (32). Sin embargo, cuando la mucosa colónica sufre algún tipo de

daño físico, químico o biológico, la microbiota puede interactuar con los receptores de la respuesta inmune innata, como los receptores tipo Toll (*TLRs*), que se ubican en la superficie de células del sistema inmune en la lámina propia, como macrófagos y *DC*, lo cual induce una rápida activación de las células de la respuesta inmune hacia un perfil inflamatorio. Una vez, que la respuesta inflamatoria se ha establecido y cumple su propósito, que es la eliminación de su agente causal, el siguiente paso es la resolución inflamatoria. La cual, limita las señales inflamatorias y promueve la reparación de la mucosa a través de mediadores de la inflamación (33, 34). De esta forma, la inflamación también es un proceso fisiológico de rápida respuesta al daño. Sin embargo, la respuesta inflamatoria prolongada puede dar paso a la inflamación crónica distintiva de las IBD que predisponen el desarrollo de CAC.

### **3.5 Inflamación y la anti-inflamación durante el desarrollo de CAC**

En las últimas dos décadas se ha sugerido una relación estrecha entre la inflamación y los procesos tumorigénicos. Ya que, el sello distintivo de la inflamación crónica es su capacidad para causar mutaciones (35) debido a la constante infiltración al colon de células inmunes como macrófagos y neutrófilos, los cuales son una de las principales fuentes productoras de especies reactivas del oxígeno (*ROS*) e intermediarios reactivos del nitrógeno (*RNI*) (35). Las *ROS* y las *RNI*, son muy reactivas debido a que poseen electrones no apareados. Lo anterior, genera daño al *DNA* de células epiteliales del intestino y promueve la adquisición de mutaciones en genes como *p53*, un gen supresor tumoral y en el gen de poliposis adenomatosa coli (*APC*) (36-38), un gen que regula la transcripción de numerosos genes implicados en la proliferación celular (39). La mutación en *p53*, evita que las células sean capaces de reparar el daño generado al *DNA* y de responder a los estímulos de apoptosis y a las señales de detención del ciclo celular. Lo anterior, provoca la acumulación de mutaciones en las células epiteliales del intestino, que además adquieren la habilidad de proliferar debido a mutaciones en el gen *APC* (40). De esta forma, hoy en día la asociación entre las enfermedades inflamatorias del intestino y el riesgo elevado de desarrollar CAC es ampliamente aceptada. Sin embargo, también hay evidencia que demuestra que las vías antiinflamatorias como la mediada por la expresión del receptor de interleucina-4 (*IL-4R*)

puede promover el desarrollo tumoral a través de la promoción de fenotipos tumorales en células inmunes infiltradas en el sitio del tumor.

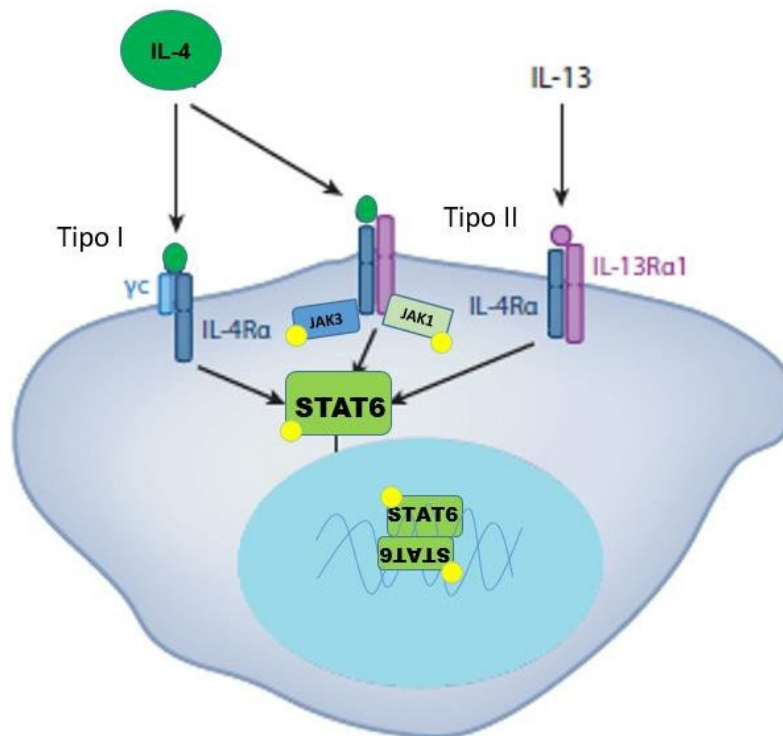


**Imagen 2. Papel de la Inflamación en el CAC.** El ambiente inflamatorio crónico se caracteriza por un daño sostenido al tejido por la infiltración de células de la respuesta inmune como macrófagos y neutrófilos principales productores de *ROS* y de *RNI*. Los cuales, generan mutaciones en genes como *p53* y *APC* en el DNA de células epiteliales del colon. Lo anterior, promueve procesos de proliferación celular dando lugar a la generación de tumores. Particularmente, en el microambiente de diferentes tipos de tumores existen reportes sobre un incremento en la expresión del *IL4R*, asociado con una respuesta *Th2/Antinflamatorias*, capaz de promover fenotipos tumorales.

### 3.6 Señalización IL-4/IL-4R

La interleucina 4 (*IL-4*) es una citocina del perfil antiinflamatorio o *Th2*, es producida por basófilos, eosinófilos, mastocitos y linfocitos *T CD4+* (41). La *IL-4* regula funciones de proliferación, diferenciación y apoptosis en diversos tipos celulares y ejerce la mayoría de sus funciones biológicas a través del *IL-4R*. Existen dos tipos de *IL-4R*. El *IL-4R* tipo I, se conforma por la cadena  $\alpha$  del *IL-4R* y la cadena  $\gamma$  común, se expresa en células de origen hematopoyético y señala exclusivamente para la *IL-4* mientras que, el receptor tipo II se conforma por la *IL-4R $\alpha$*  y la cadena  $\alpha 1$  del receptor de *IL-13* (*IL-13R $\alpha 1$* ), se expresa en células de origen no-hematopoyético y es capaz de señalar tanto para la *IL-4* como para la interleucina- 13 (*IL-13*). Tanto el *IL-4R* tipo I como el tipo II tienen en común la vía de señalización *STAT6*, la cual es una vía que se desarrolla a partir del acoplamiento de la *IL-4* a su receptor. Lo anterior, promueve la unión de las proteínas *JAKs* y su fosforilación de forma cruzada. Una vez activadas las proteínas *JAKs*, fosforilan a los residuos de tirosina presentes en la porción intracelular del receptor de *IL-4*. Los residuos de tirosina fosforilados, proporcionan sitios de anclaje para la unión de las moléculas *STAT6* mientras que, las

proteínas *JAKs* activadas fosforilan a las moléculas *STAT6* ancladas. Lo anterior, permite que las moléculas *STAT6* se disocien y dimericen con otra molécula *STAT6* fosforilada en el citoplasma. El homodímero de *STAT6*, se transloca al núcleo y transcribe los genes respectivos para las funciones biológicas de la *IL-4* y la *IL-13* (11, 41). Sin embargo, durante algunos tipos de cáncer se ha demostrado que la señalización del *IL-4/IL-4R* en macrófagos infiltrados en el sitio del tumor, puede promover su activación hacia fenotipos tumorales que favorecen la proliferación, la supervivencia, el crecimiento y la invasión de células tumorales.



**Imagen 3. Vía de señalización de la *IL-4/IL-4R*.** Tanto el receptor de *IL-4R* tipo I y tipo II, tienen en común la vía de señalización de *STAT6*, la cual se inicia después de la unión de la *IL-4* y la *IL-*

13 a su receptor. Lo anterior, desencadena la translocación del homodímero de *STAT6* al núcleo para promover la transcripción de los genes respectivos para la *IL-4* y la *IL-13*.

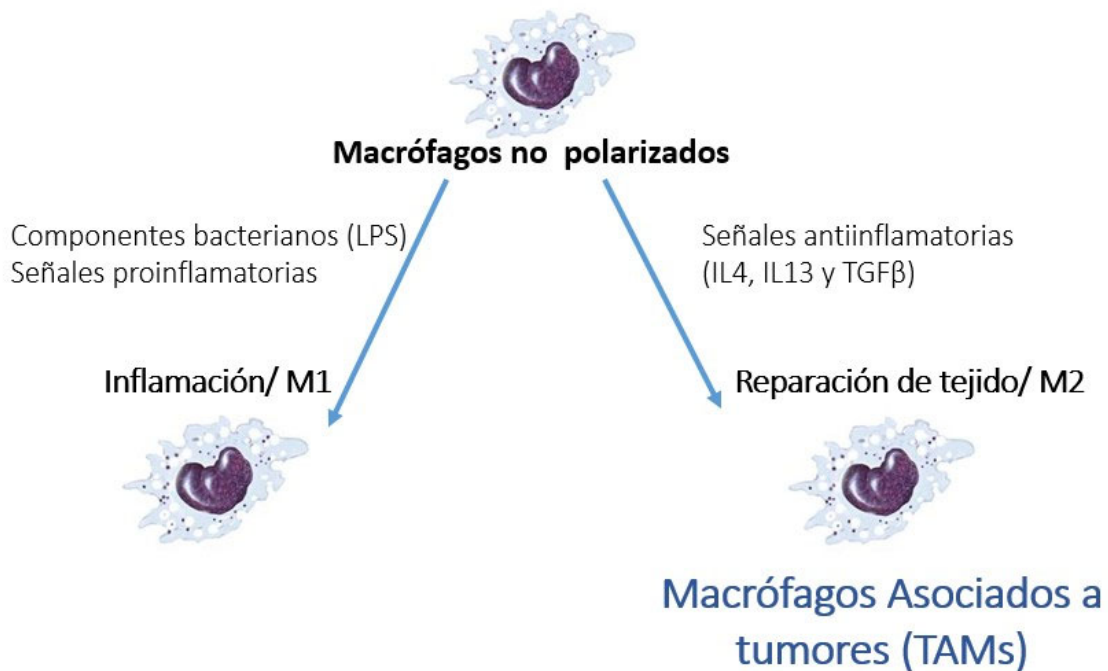
### **3.7 Macrófagos en la homeostasis intestinal**

Los macrófagos son una de las poblaciones de leucocitos más abundantes en el intestino y esta es probablemente la población de fagocitos mononucleares más abundantes en todo el cuerpo (42). En el intestino, los macrófagos residentes se localizan inmediatamente debajo del epitelio intestinal y están implicados en procesos fisiológicos como la remodelación tisular y la limpieza de células apoptóticas o senescentes. Los macrófagos intestinales contribuyen con la remodelación tisular a través de la producción de citocinas y factores solubles como la prostaglandina E2 (PGE2) que permite la proliferación de progenitores epiteliales en las criptas intestinales (43). Asimismo, los macrófagos intestinales desempeñan funciones importantes como células altamente fagocíticas y bactericidas (44). Las cuales, son funciones necesarias para la limpieza de patógenos, desechos celulares y productos bacterianos, manteniendo de esta forma un equilibrio constante entre la inmunidad contra patógenos extraños y la tolerancia a las bacterias comensales (45, 46). Sin embargo, estos macrófagos intestinales no expresan niveles elevados de las moléculas co-estimuladoras *CD80*, *CD86* o *CD40*. Además, no responden al estímulo de los receptores tipo toll (*TLRs*) para producir citocinas inflamatorias como la *IL-12*, la *IL-1* y el *TNF $\alpha$*  (44, 47) pero sí son



capaces de producir *IL-10* como citocina antiinflamatoria e interactuar con otras células de la respuesta inmune como las células dendríticas para regular la respuesta inmune intestinal a través de los linfocitos T (48). Lo anterior, es de importancia fisiológica ya que la fagocitosis de microbios mediada por macrófagos intestinales es eficiente, sin generar una respuesta inflamatoria intensa. Sin embargo, frente a agresiones físicas o biológicas la liberación de citocinas inflamatorias como el  $IFN\gamma$  o la exposición a *LPS*, estimula que los macrófagos infiltrados adquieran un perfil de activación clásico o *M1*. Los macrófagos *M1*, expresan elevados niveles de moléculas co-estimuladoras y son capaces de producir óxido nítrico, intermediarios reactivos del oxígeno, así como citocinas inflamatorias (49, 50). Después de la eliminación del agente infeccioso o inflamatorio, el intestino debe restaurar la homeostasis. Por lo cual, durante la resolución de la inflamación la producción de citocinas antiinflamatorias como la *IL-4*, la *IL-13* y el  $TGF\beta$  favorecen que los macrófagos infiltrados se activen hacia un perfil alternativo o *M2* (51, 52). Los cuales, promueven la restauración de la homeostasis, así como la reparación del epitelio intestinal a través de mecanismos que incluyen la expresión de *TREM2* (Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells), que impulsa la curación de heridas a través de la inducción de citocinas que promueven la activación de macrófagos *M2*. Además, en varios estudios se ha demostrado que la *IL-10* producida por los macrófagos intestinales es un mediador importante de la cicatrización de

heridas epiteliales. Mientras que, la expresión del factor de transcripción *STAT6* promueve la polarización de macrófagos *M2*, impulsando aún más la activación de la señalización de Wnt, para promover la reparación de la mucosa en el modelo murino de colitis inducida por TNBS (ácido trinitrobencenosulfónico) (53-56). Sin embargo, el microambiente tumoral es capaz de favorecer que los macrófagos *M2* adquieran fenotipos protumorales como los macrófagos asociados a tumores (*TAMs*). Los cuales, son capaces de promover el crecimiento y desarrollo tumoral en diferentes tipos de cáncer incluido el cáncer colorectal (8, 57, 58).



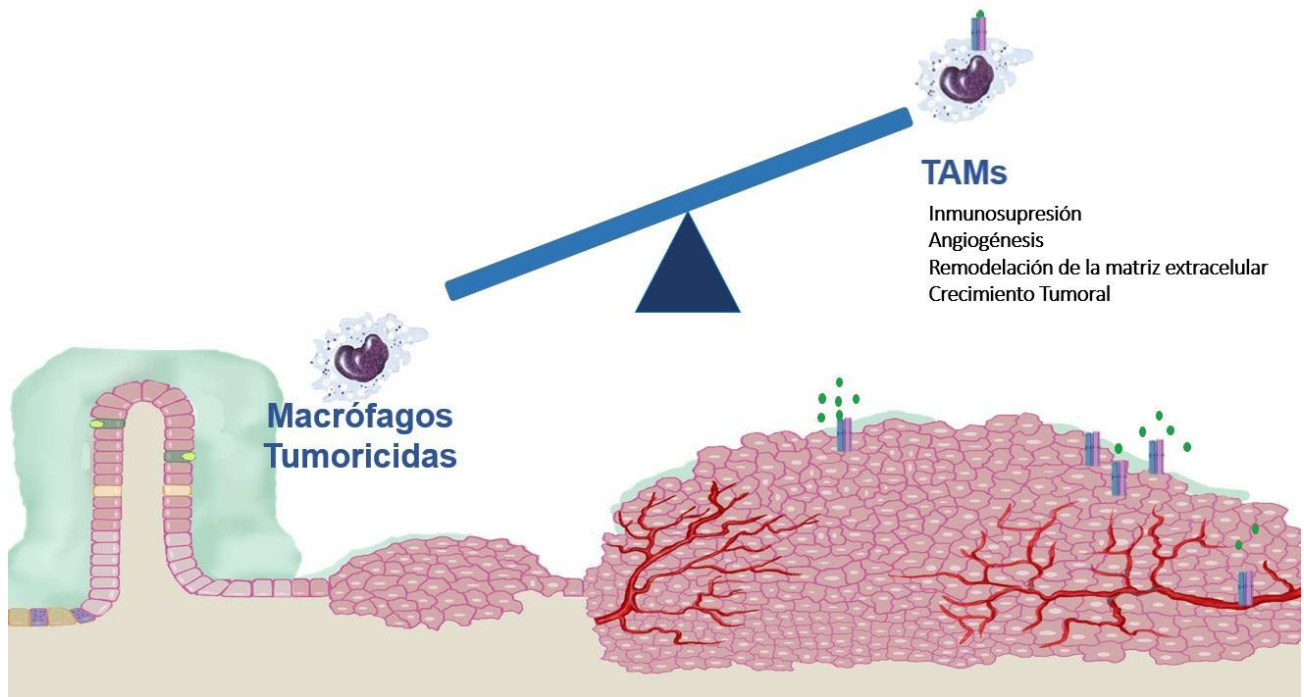
**Imagen 4. Perfil de activación de los macrófagos.** Los macrófagos no diferenciados pueden adquirir un perfil de activación *M1* o macrófagos inflamatorios a través de su interacción con señales proinflamatorias como la mediada por el *IFN-γ* o por componentes bacterianos como el *LPS*. Por otra parte, los macrófagos también pueden activarse hacia un perfil *M2* o anti-inflamatorio por su interacción con citocinas anti-inflamatorias como la *IL-4*, la *IL-13* y el *TGFβ*. Los macrófagos asociados a tumores (*TAMs*) en el microambiente tumoral comparten características similares a los macrófagos *M2*.

### **3.8 Macrófagos y cáncer de colon asociado a colitis.**

En tumores pequeños, los macrófagos residentes de tejido se acumulan en el tumor liberando moléculas quimioatrayentes derivadas de células tumorales como el factor estimulante de colonias (*CSF-1*), el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (*GM-CSF*) así como *CCL2/MCP1* (59-61) que contribuyen con el reclutamiento inicial de poblaciones celulares que más adelante promoverán el desarrollo del tumor. Posteriormente, durante el crecimiento tumoral la formación de nuevos vasos permite que los monocitos circulantes del torrente sanguíneo se infiltren dentro del tejido tumoral y adquieran un fenotipo tumoral *TAM* (10). Los cuales, poseen características distintivas de los macrófagos “*M2*”, como lo son la expresión del *IL-4R*, la capacidad de regular las respuestas inflamatorias e inmunes y la de promover la angiogénesis y la remodelación tisular (62). De hecho, la *IL-4* se ha identificado como la principal reguladora de la activación tanto de macrófagos *M2* como

de TAMs (63). Por lo cual, la activación del fenotipo *TAM* dentro del microambiente tumoral puede ser promovida por la *IL-4* producida tanto por linfocitos T como por células tumorales (8, 62, 63). En cáncer de colon, los *TAMs* han surgido como un tipo de célula reguladora crítica en el microambiente tumoral, que promueve funciones tumorigénicas como: 1) Inmunosupresión a través de la liberación de: la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (*IDO*), la IL-10, el Factor de crecimiento transformante beta (*TGFβ*) y la proteína de muerte celular programada 1 (*PD1*). 2) Angiogénesis a través de la liberación de metaloproteasa 4 (*MMP4*), el factor de crecimiento endotelial-vascular (*VEGF*) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGF*). 3) Remodelación de la matriz extracelular a través de la producción de *MMP2/4* y 4) Crecimiento tumoral a través de la liberación de Factor de crecimiento epidérmico (*EGF*), el factor de crecimiento de fibroblastos (*bFGF*) y el *VEGF*, lo que facilita la progresión y la metástasis tumoral (7-9, 64). Por lo cual, la infiltración de macrófagos se ha asociado con un bajo pronóstico de supervivencia en pacientes diagnosticados con cáncer de colon (18). De forma interesante, también hay evidencia que demuestra que la infiltración de macrófagos de un perfil de activación *M1* puede disminuir el crecimiento tumoral a través de funciones tumoricidas como lo es la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (*iNOS*) (65-67), la activación de linfocitos *T* citotóxicos (68, 69) y la producción de *IFNγ* (70). De hecho, se han propuesto

nuevas terapias enfocadas tanto en el bloqueo de la *IL4R* en *TAMs* [46] como en la supresión de la activación de macrófagos *M2* para mejorar la actividad de macrófagos *M1* (10).



**Imagen 5. Papel de los TAMs en el CAC.** Durante el CAC el mayor porcentaje de macrófagos infiltrados en el sitio del tumor pertenece al fenotipo TAM, los cuales promueven el crecimiento y desarrollo tumoral a través de 4 funciones principales: La inmunosupresión, la angiogénesis, la remodelación de la matriz extracelular y el crecimiento tumoral.

De manera importante, aunque en múltiples estudios se ha sugerido el papel del *IL-4R* como promotor del desarrollo tumoral hasta el momento se desconoce si la expresión del *IL-4R* en

macrófagos asociados al fenotipo TAM son directamente responsables del desarrollo tumoral durante el CAC.

#### **4.0 Hipótesis**

La ausencia del *IL-4R* evitará la activación de *TAMs*, lo cual repercutirá directamente en la disminución del desarrollo de tumores en el modelo de CAC debido a que prevalecerá una respuesta inflamatoria con funciones antitumorales mediada principalmente por macrófagos *M1*.

## **5.0 Objetivo General**

Conocer el impacto de los macrófagos M1 en ausencia de la señalización mediada por la *IL4R $\alpha$*  durante el desarrollo de *CAC*.

### **5.1 Objetivos específicos**

- Evaluar el impacto de la administración de AOM/DSS en los ratones a través de la toma de peso semanal (A partir de la administración de AOM hasta el final de la administración del tercer ciclo con *DSS*).
- Evaluar el desarrollo tumoral en el colon (número de tumores, tamaño y peso del colon).
- Determinar la infiltración de macrófagos *M1* y *M2* en colon a través de *RT-PCR* y citometría de flujo.
- Confirmar el perfil de activación *M1* y *M2* en colon a través de inmunofluorescencia de tejido de colon.
- Evaluar la activación de las vías de señalización de macrófagos *M1* y *M2* a través de los factores de transcripción *STAT1* para macrófagos *M1* y *STAT6* para macrófagos *M2* a través de citometría de flujo.
- Evaluar el daño a nivel tisular en colon asociado con la administración de AOM/DSS a través de la tinción con azul Alcian y hematoxilina y eosina.



- Analizar el perfil de citocinas asociadas a inflamación y anti-inflamación en suero, cultivo de células de bazo, nódulos mesentéricos y colon a través de citometría de flujo.
- Analizar el porcentaje de linfocitos  $CD4^+$  y  $CD8^+$  en bazo y nódulos mesentéricos.
- Realizar cruces para obtener un ratón con un *knock-out* condicional de la cadena alfa del receptor de *IL4* en macrófagos ( $LysM^{Cre} IL4R\alpha^{lox/-}$ ).
- Evaluar el impacto del modelo *AOM/DSS* en ratones  $LysM^{Cre} IL4R\alpha^{lox/-}$ .

## **6.0 Materiales y métodos**

### **6.1 Ratones.**

Ratones hembra *wild type*, Knock-out de la cadena alfa del receptor de IL-4 (*IL-4R $\alpha$ KO*) y Knock-out específica de la *IL-4R $\alpha$*  bajo el promotor de lisozima M (*LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-/lox</sup>*) de 8 a 10 semanas de edad. Estos ratones se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos en las instalaciones de animales de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Todos los procedimientos experimentales se realizaron estrictamente bajo las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (EE. UU.). Además, fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentos con Animales, FES-I (UNAM), con el número CE/ FESI / 102016/1096 (18/10/16). Los ratones *IL-4R $\alpha$ KO*, *LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-/lox</sup>* e *IL-4R $\alpha$ <sup>-/lox</sup>* fueron amablemente donados por el Dr. Frank Brombacher.

### **6.2 Generación de ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-/lox</sup>*.**

Los ratones *LysMcre* bajo el promotor de lisozima *M* se retrocruzaron por primera vez con ratones *BALB/c* durante nueve generaciones. Posteriormente, se cruzaron con ratones *IL-*

*4RαKO* con fondo genético *BALB/c*, como resultado se obtuvieron ratones *LysMcreIL-4RαKO BALB/c* doblemente transgénicos. Adicionalmente, estos ratones se cruzaron con ratones *IL-4Rα lox/lox* fondo genético *BALB/c* para generar ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox</sup> BALB/c* específicos (71).

### **6.3 Modelo de inducción CAC.**

La inducción de *CAC* se realizó según el modelo ampliamente utilizado de *AOM* (azoximetano)/*DSS* (dextrano sulfato de sodio) (72). En resumen, se administró una única dosis intraperitoneal (i.p.) de 12.5 mg por Kg de peso corporal de *AOM* (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.). Posteriormente, se administro *DSS* al 2% (PM: 35.000-50.000, MP Biomedicals, Solon, OH, EE. UU.) en el agua de beber durante 7 días y al finalizar este periodo los ratones permanecieron con agua *ad-libitum* durante 14 días. El ciclo con *DSS* se repitió dos veces más. Los ratones fueron sacrificados 2 semanas después de finalizar el tercer ciclo con *DSS*.

### **6.4 Análisis Histológico.**

Secciones del colon distal fueron fijadas en etanol al 100%, se procesaron a travésde un tratamiento con alcoholes y xilol. Posteriormente, los tejidos se incluyeron en parafina y se realizaron cortes con un grosor de 5 μm. Los cortes de tejido se tiñeron con hematoxilina

y eosina (*H&E*) para visualizar la morfología celular o con *azul Alcian* para visualizar la producción de moco por células caliciformes. Se utilizó un microscopio óptico (*Axio Vert. A1, Carl Zeiss*) para visualizar las tinciones del tejido.

### **6.5 Inmunofluorescencia de tejido.**

Secciones de corte de cuatro micrones de grosor de tejido de colon fueron rehidratadas mediante gradientes de alcohol y se incubaron con DIVA Decloaker 10x (Biocare Medical; CA, EE. UU.) A una dilución 1:10. Los portaobjetos se lavaron con PBS 1x (8.06g de NaCl, 0.2g de KCl, 1.15g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2g de KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 3 veces durante 5 min y se realizó la permeabilización de la membrana con *PBS1x* +Tritón al 0.05% (Reasol; Ciudad de México, México). Posteriormente, las secciones de colon se lavaron con *PBS1x* (3 x 5 min) y se bloquearon con *PBS+BSA* al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron diferentes secciones de tejido durante toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios purificados: conejo anti-ratón *STAT6p* (*STAT6p*, fosforilato) (Abcam AB28829) a una dilución 1:100, rata anti-ratón *F480* (TONBO, San Diego, CA, EE. UU.) a una dilución 1:300, conejo anti-ratón *Arg* (Cell Signalling, Danvers, MA, EE.UU.) a una dilución 1:50, conejo anti-ratón *iNOS* (Cell Signalling) a una dilución 1:400. A continuación, los secciones de colon se lavaron con *PBS1x* 3 veces y posteriormente se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios anti-rata hecho en cabra (*alexa fluor*®

647, Abcam, MA, EE. UU.) A una dilución de 1:600 y el anticuerpo anti- conejo hecho en cabra, *alexa fluor*® 546 (Thermo Fisher Scientifics) a una dilución de 1:900. Las secciones de tejido se lavaron 3 veces con PBS1x durante 1 minuto y se deshidrataron a través de un gradiente de alcoholes. Posteriormente, los portaobjetos se montaron con una gota de medio de montaje Fluoroshield con *DAPI* (Abcam) por sección de tejido. La evaluación de las laminas de inmunofluorescencia se realizó usando un microscopio LSM10 DUO (Carl Zeiss GmBH).

### **6.6 Aislamiento de células de tumores de colon para citometría de flujo.**

El colon se extrajo y se lavó con solución salina, posteriormente se cortó longitudinalmente y luego lateralmente en trozos de aproximadamente 0,5 cm de longitud. Continuamos con los pasos recomendados en el kit de disgregación tumoral *MACs Miltenyi Biotec* el cual consistía en dos pasos principales. Paso 1. Incubación y digestión de proteínas en el tejido a través de una serie de enzimas. Paso 2. Disgregación completa del tejido a través del equipo gentleMACS Dissociators, que permite obtener un mayor número de células que los procesos convencionales.

### **6.7 Citometría de Flujo.**

1x10<sup>6</sup> millones de células de bazo, sangre, nódulos mesentéricos e intestino fueron teñidas con los anticuerpos *BV421- F4/80*, *APC- TLR2*, *PECy7- PDL1* de Biolegend® y posteriormente incubadas por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Las células se lavaron una vez con 1 ml de solución *FACS Sheat* (BD®) y se centrifugaron a 277 XG por 5 minutos. El sobrenadante se decantó y las células se resuspendieron en 350µl de *FACS Sheat* (BD®). Posteriormente, las células se analizaron en el citómetro de flujo *Attune NxT* (ThermoFisher®). 10,000 eventos fueron capturados. El análisis de los datos se realizó con el programa *FlowJo software V X* (Tree Star).

### **6.8 Factores de transcripción en células de colon para citometría de flujo.**

Se preparó una suspensión celular de 10x10<sup>6</sup> células de tejido de colon por ml en tampón de tinción de citometría de flujo. Se incubaron 100 µl de células por tubo con anticuerpos fluorescentes (*F480*) durante 30 minutos a una temperatura de 2- 8°C. Posteriormente, continuamos con los pasos recomendados en el conjunto de tampones para factores de transcripción de BD Pharmingen™ (562574).

### **6.9 Cultivo celular y cuantificación de citocinas.**

Las células del bazo y las células MLN (Ganglios linfáticos mesentéricos) se ajustaron a  $3 \times 10^5$  células/ml, se estimularon con anticuerpo *anti-CD3* ( $5 \mu\text{g/ml}$  por pocillo) recubierto en placas de 96 pocillos y se incubaron en medio *RPMI* completo en una atmósfera humidificada que contenía 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 h. Los sobrenadantes se recogieron y almacenaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta que se requirió el análisis. La cuantificación del sobrenadante de citocinas se determinó usando el kit de inflamación de ratón *CBA (BD)*, de acuerdo con las instrucciones descritas por el proveedor.

### **6.10 Aislamiento de ARN y RT-PCR.**

Secciones de la región distal del colon (0.5cm) se homogenizaron en  $500 \mu\text{l}$  de *TRIzol*. El RNA fue extraído por la técnica de cloroformo. El cDNA fue sintetizado a partir del RNA extraído usando SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen; CA, USA). El RT-PCR se realizó usando la enzima KAPA Taq (Kapa Biosystems, Woburn, MA, EE. UU). Las secuencias de los primers para amplificar los genes de interés se enlistan en la siguiente tabla:

Genes	Forward primer	Reverse primer
IL4Ra Wild Type	TGACCTACAAGGAACCCAGGC	CTCGGCGCACTGACCCATCT. (1)
IL4Ra Deleted	GGCTGCTGACCTGGAATAACC	CCTTTGAGAACTGCGGGCT.(1)

IL4Ra lox	CCCTTCCTGGCCCTGAATTT	GTTTCCTCCTACCGCTGATT.(1)
LysMcre	CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC	CCCAGAAATGCCAGATTACG.(1)
IL13Ralfa2	ATACGTACGCATTTGTCAGAGCA	CCAAGCCCTCATACCAGAAAAAC.(2)
Arginase 1	CAGAAGAATGGAAGAGTCAG	CAGATATGCAGGGAGTCACC.(1)
Relma	GGTCCCAGTGCATATGGATGAGACCA TAGA	CACCTCTTCACTCGAGGGACAGTTGG CAGC.(3)
iNOS	CTGGAGGAGCTCCTGCCTCATG	GCAGCATCCCCTCTGATGGTG.(3)
Ym1	TCACAGGTCTGGCAATTCTTCTG	TTTGTCCCTTAGGAGGGCTTCCTC.(3)
GAPDH	CTCATGACCACAGTCCATGC	CACATTGGGGGTAGGAACAC.(3)

La expresión de los genes fue normalizada a la expresión de un gen de referencia (GAPDH).

### **6.11 Análisis estadístico.**

Las diferencias estadísticas entre los grupos se determinaron mediante ANOVA de una vía con la prueba de comparación múltiple de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software PRISM 5 (GraphPad).



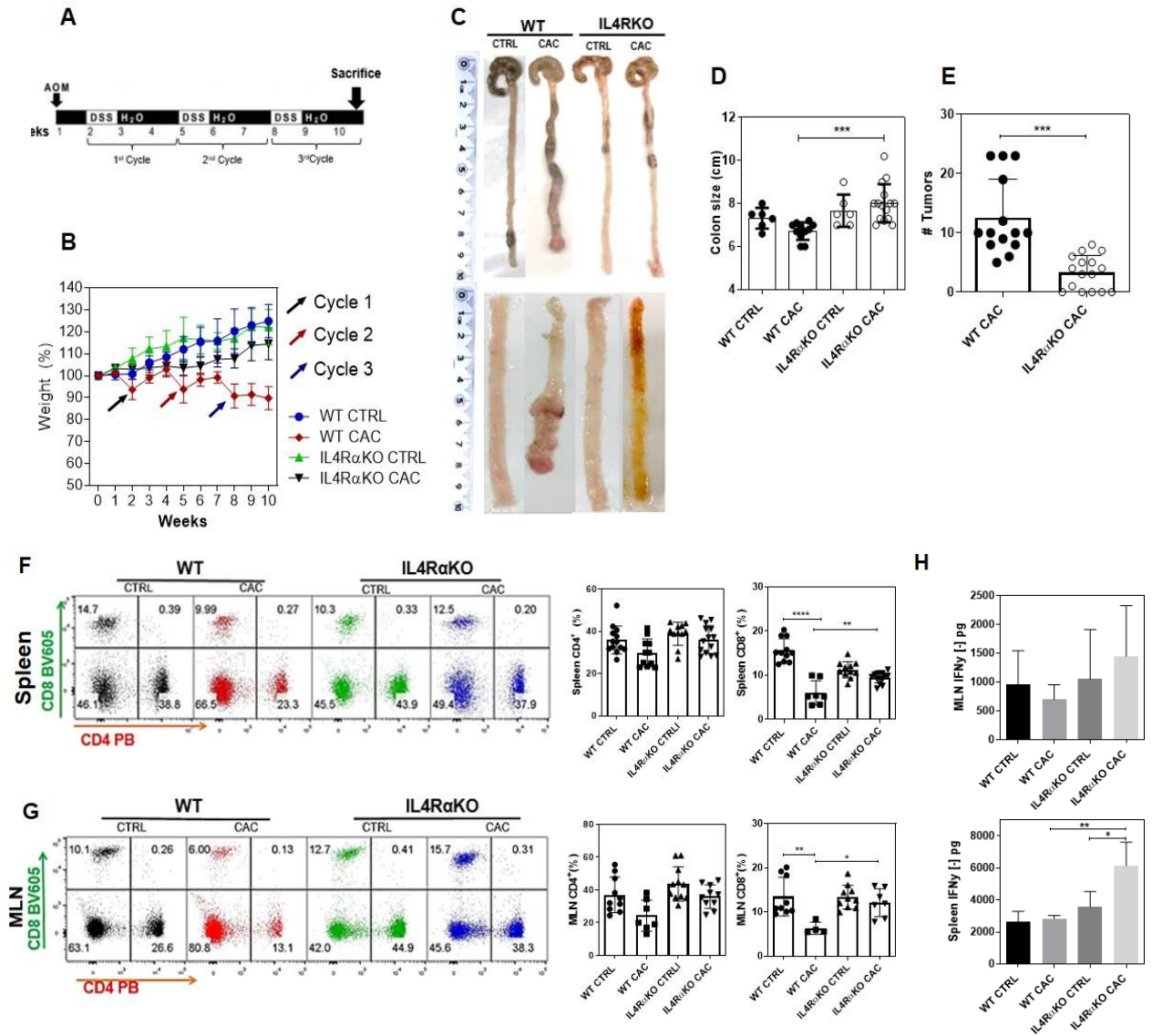
## 7.0 Resultados

### **7.1 La ausencia total de la cadena $\alpha$ del receptor de IL-4 inhibe el desarrollo de tumores de colon.**

Estudios anteriores han sugerido que la *IL-4R $\alpha$*  participa en la promoción del desarrollo de tumores en cáncer de colon [4, 5]. Para confirmar esto, utilizamos el modelo de *AOM/DSS* (Fig. 1A) para la inducción de *CAC* en ratones con Knock-out global de la *IL-4R $\alpha$*  (*IL-4R $\alpha$ KO-CAC*). Inicialmente monitoreamos semanalmente el peso de los ratones desde la administración del *AOM* hasta el final del tercer ciclo con *DSS*. En particular, los ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* no mostraron ninguna pérdida de peso durante el transcurso de los 3 ciclos con *DSS* en comparación con los ratones *WT-CAC* que perdieron hasta el 20% de su peso (Fig. 1B). Consistente con lo anterior, no se observó el acortamiento esperado del colon por la administración de *DSS* en ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* (Fig.1C, D). Además, estos ratones tenían significativamente menos tumores que los ratones *WT-CAC* (Fig.1C, E) e incluso había ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* libres de tumores (Fig. 1E).

Estos resultados nos indicaron que la expresión de la *IL-4R $\alpha$*  estaba directamente relacionada con el desarrollo de tumores en el *CAC*. Para definir el impacto de la ausencia de *IL-4R $\alpha$*  en nuestro modelo de *CAC*, decidimos explorar las

poblaciones de linfocitos T  $CD4^+$  y  $CD8^+$  en bazo *MLN*, nosotros no encontramos diferencias en los porcentajes de células T  $CD4^+$  entre ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* y ratones *WT-CAC* (Fig. 1F y G). Sin embargo, se observó un cambio notable en el porcentaje de células T  $CD8^+$ . Mientras que, el *CAC* indujo una reducción significativa en el porcentaje de las células T  $CD8^+$  tanto en bazo como en *MLN* en ratones *WT*, nosotros no encontramos una disminución en el porcentaje de esta población celular en ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* (Fig. 1F y G). El *IFN- $\gamma$*  es una citocina involucrada en la función eficiente de las células T  $CD8^+$  y también en la polarización de macrófagos *M1* (73). Por lo tanto, evaluamos si en ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* los linfocitos podrían estar induciendo la activación de fenotipos tumorocidas en macrófagos *M1* a través de la producción de *IFN- $\gamma$* . Por lo cual, evaluamos la producción de *IFN- $\gamma$*  en cultivos celulares de células totales de *MLN* y bazo estimuladas con el anticuerpo anti-*CD3*. Nosotros no encontramos diferencias en la producción de *IFN- $\gamma$*  en células de *MLN* (Fig. 1H panel superior). Sin embargo, las células de bazo de ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* mostraron una mayor producción de *IFN- $\gamma$*  (Fig. 1H panel inferior). Estos datos nos sugirieron que los ratones *IL-4R $\alpha$ KO* tenían un perfil antiinflamatorio más alto, que podía estar asociado con el menor número de tumores observados en colon.



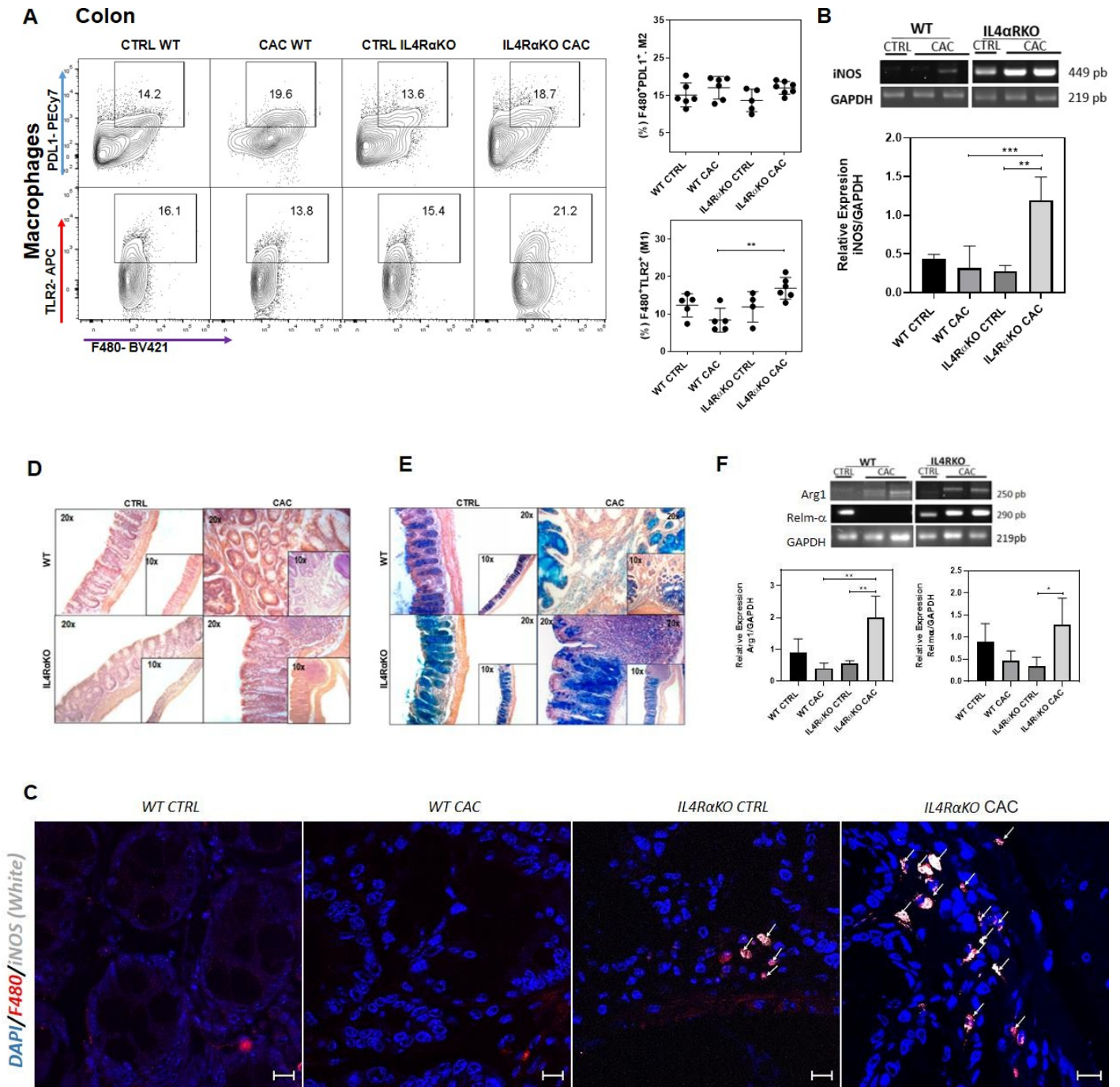
**Figura 1.** La ausencia del receptor alfa de IL4 inhibe la tumorigénesis del colon. A) El modelo *AOM/DSS*. B) Pérdida de peso por semana expresada como porcentaje desde la inducción con *AOM* hasta el final del 3er ciclo con *DSS* en ratones *WT* e *IL-4R $\alpha$ KO CTRL* y *CAC*. C) Fotografías representativas de la longitud del colon de ratones *WT* e *IL-4R $\alpha$ KO CAC* al final del tercer ciclo con *DSS*, mostrando el colon desde el ciego hasta la región rectal y el colon sin ciego y con sección longitudinal. D) Tamaño del colon, E) Número de tumores presentes en la región distal del colon. Diagramas de puntos y gráficos de porcentajes totales de células T *CD4<sup>+</sup>* y *CD8<sup>+</sup>* en F) bazo y G) ganglios linfáticos mesentéricos (*MLN*) de ratones *WT*, *IL-4R $\alpha$ KO CTRL* y *CAC*. H) Se estimularon  $1 \times 10^5$  células de bazo y *MLN* con anti-*CD3* durante 48 horas para analizar la producción de *IFN- $\gamma$*  en sobrenadante usando el *kit BD CBA Mouse Inflamación*. Datos de 3 experimentos diferentes con al menos 3 ratones por grupo. Se realizó un *ANOVA* de una vía para todos los paneles y la

media se presentó con barras de error de desviación estándar (desviación estándar media) para cada grupo experimental. Valor de significancia  $p=0.05$  (\*),  $p=0.01$  (\*\*),  $p=0.001$  (\*\*\*),  $p=0.0001$  (\*\*\*\*).

### **7.2 La ausencia de *IL-4R $\alpha$* favorece el reclutamiento de macrófagos *M1* en colon que pueden promover una respuesta inflamatoria protectora**

Posteriormente, para determinar si los macrófagos *M1* podrían ser responsables de la reducción de tumores en ratones *IL-4R $\alpha$ KO*, nosotros evaluamos en colon el perfil de activación de macrófagos *M1* asociados con la expresión de *TLR2* (74) así como el perfil de activación de macrófagos *M2* asociados con la expresión de *PDL1* (75). Nosotros encontramos que el porcentaje de macrófagos *M1* (*F480<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup>*) infiltrados en colon era mayor en ratones *IL-4R $\alpha$ KO* que en ratones *WT* durante el *CAC* (Fig. 2A). Sin embargo, no encontramos cambios en el porcentaje de macrófagos *M2* (*F480<sup>+</sup>PDL1<sup>+</sup>*) infiltrados (Fig. 2A). Esto nos sugirió que los macrófagos *M1* podrían estar interviniendo en la reducción de tumores en ratones *IL-4R $\alpha$ KO*. Por lo cual, nosotros decidimos evaluar si los macrófagos *M1* podrían estar contribuyendo con la reducción de tumores a través de la expresión de la molécula óxido nítrico sintasa (*iNOS*), ya que a través de diversos reportes se ha demostrado que la expresión elevada de *iNOS* puede ejercer efectos citotóxicos en células tumorales (66, 76, 77). Nosotros observamos que a diferencia de los ratones *WT-CAC* en los ratones *IL-4R $\alpha$ KO* había una expresión elevada del gen *iNOS* en tejido de colon durante el cáncer (Fig. 2B). Por lo cual, a través de Inmunofluorescencia confirmamos

que los macrófagos infiltrados en colon co-expresaban *iNOS* y por tanto pertenecían a un perfil de activación *M1* (Fig. 2C). Lo anterior, nos sugirió que se estaba promoviendo una respuesta inflamatoria. Por lo cual, evaluamos si esta respuesta inflamatoria podría estar generando algún daño tisular. Sin embargo, la estructura y la arquitectura del epitelio intestinal (Fig. 2D) así como la producción de moco por células caliciformes (Fig. 2E) estaban conservadas en ratones *IL-4R $\alpha$ KO* aún durante el CAC. Además, había una expresión elevada de *Arg1* y *Relm $\alpha$*  en colon (Fig. 2F), los cuales son genes que se han asociado con la reparación del daño causado por procesos inflamatorios tempranos (57). Todos estos resultados nos sugirieron que los ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* muestran una alta infiltración de macrófagos *M1* y una fuerte respuesta inflamatoria, pero también muestran mecanismos tisulares reparadores independientes de la vía de señalización *IL-4R $\alpha$ /STAT6* que previene el desarrollo de tumores en colon.



**Figura 2.** La ausencia de *IL-4Rα* promueve los macrófagos *M1* y una respuesta inflamatoria protectora. A) Citometría de flujo, diagramas de puntos y gráficos que representan el porcentaje de macrófagos *M1* ( $F480^+TLR2^+$ ) y macrófagos *M2* ( $F480^+PDL1^+$ ) infiltrados en el colon en ratones *WT* e *IL-4RαKO CTRL* y *CAC*, sacrificados al final de la tercera ciclo de administración de *DSS*. B) Datos de *RT-PCR* de *iNOS* representativos y totales de muestras de colon normalizadas con el genconstitutivo de *GAPDH*. C) Imagen combinada representativa confocal de la tinción de inmunofluorescencia del tejido del colon de *WT CTRL*, *WT-CAC*, *IL-4RαKO CTRL* e *IL-4RαKO-CAC* utilizando un tinte de unión al ADN (DAPI) en azul, *F4/80*<sup>+</sup>

en rojo e iNOS en blanco. Las fotografías se tomaron con un objetivo de 63X. D, E) Tinción con *H&E* y azul Alcian de cortes de la región distal del colon en ratones *WT* e *IL-4R $\alpha$ KO CTRL* y *CAC*. F) Datos de *RT-PCR* representativos y totales para *Arg1*, *Relm- $\alpha$*  de muestras de colon normalizadas con el gen constitutivo *GAPDH*. Datos de 2 experimentos diferentes con al menos 3 ratones por grupo. Se realizó un ANOVA de una vía para todos los paneles y la media se presentó con barras de error de desviación estándar (desviación estándar media) para cada grupo experimental. Valor de significancia  $p= 0.05$  (\*),  $p= 0.01$  (\*\*),  $p= 0.001$  (\*\*\*)). Las barras de escala indican 10  $\mu$ m.

### **7.3 La expresión de *IL-4R $\alpha$* en macrófagos no está directamente relacionada con el desarrollo de tumores en el CAC.**

Con base en los resultados anteriores, nosotros encontramos que en ausencia de la *IL-4R $\alpha$* , el reclutamiento de macrófagos *M1* en colon podía tener un papel importante en la protección durante el *CAC*. Sin embargo, no sabíamos si el papel protector de los macrófagos *M1* y la disminución en el desarrollo de tumores en colon en ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* podría estar relacionado con la ausencia de la *IL-4R $\alpha$*  en macrófagos y por tanto de la ausencia de un fenotipo protumoral *TAM*. Para probar esto, trabajamos con un modelo de ratones con un *Knock-out* específico de la cadena  $\alpha$  del receptor de *IL-4* en macrófagos (*LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-</sup>/lox*) (78) (Fig. 3A), los cuales fueron sometidos al modelo *AOM/DSS* del *CAC* (Fig. 3B). Nosotros observamos que tanto los ratones *WT* como los ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-</sup>/lox* perdieron peso al final de cada ciclo con *DSS* (Fig. 3C). Además, el colon de los ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-</sup>/lox-CAC* se acortaron como los colon de los ratones *WT-CAC*, mientras que los ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* mantuvieron un peso y un tamaño de colon normales



como los ratones sanos (Fig. 3C-E). De manera interesante, los ratones *LysMcreIL4Rα<sup>-lox-</sup>*-CAC desarrollaron tumores en números similares a los de los ratones *WT-CAC*. Sin embargo, los tumores eran más pequeños en los ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox-</sup>-CAC* (Fig. D, F y G). Estos resultados nos sugirieron que los macrófagos que carecen de la *IL-4Rα* no eran directamente responsables de la inhibición del desarrollo tumoral en ratones *IL-4RαKO-CAC*.

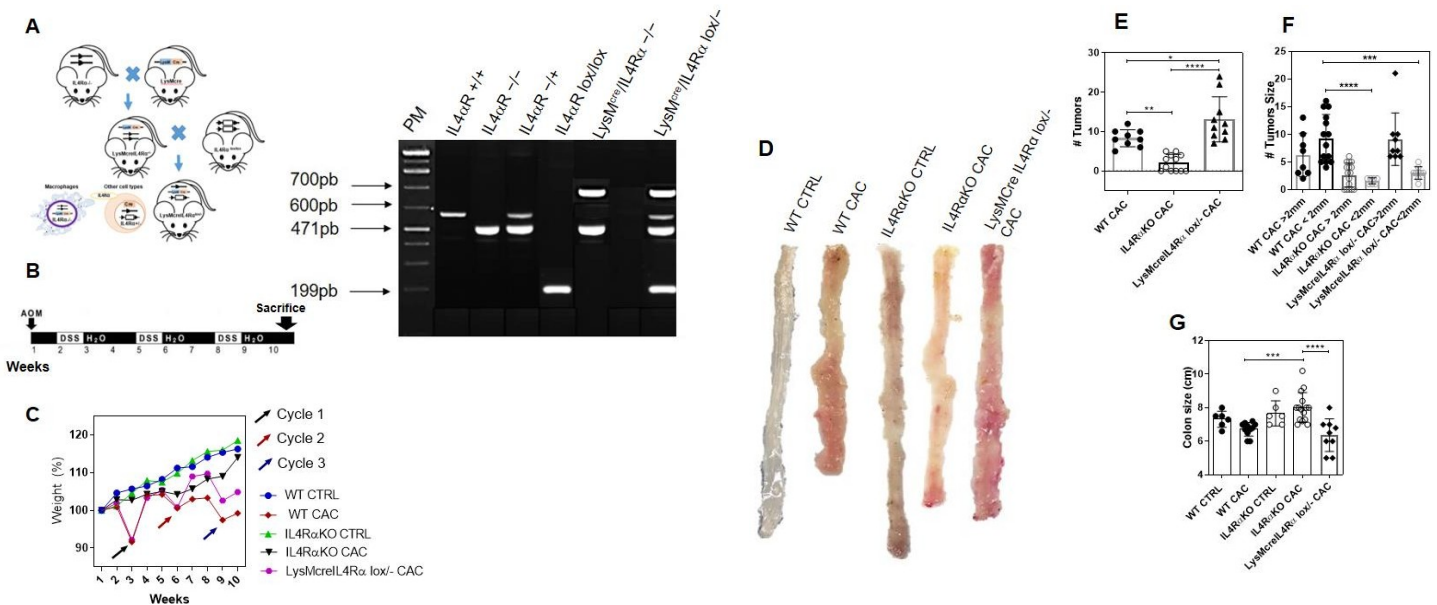


Figura 3. La falta de expresión de *IL-4Rα* en macrófagos no está directamente relacionada con la protección en CAC. A) Se cruzaron ratones con fondo genético *BALB/c*. knock-out global de la *IL-4Rα* (*IL-4Rα<sup>-/-</sup>*) y ratones que expresaban la recombinasa *cre* (*LysMcre*) para generar ratones *LysMcreIL4Rα<sup>-/-</sup>BALB/c*. Posteriormente, estos ratones fueron cruzados con ratones *IL-4Rα<sup>lox/lox</sup>* para generar los ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox</sup>*. B) Genotipado de ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox</sup>*. La PCR de *IL-4Rα* eliminado es de 471 pares de bases, *loxP* es de 190 pares de bases (floxed) y el *Cre* específico es de 700 pares de bases. C) Peso por semana expresado en porcentaje desde la inducción con AOM hasta el final del tercer ciclo de DSS en ratones *WT*, *IL-4RαKO* y *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox</sup>*. D) Fotografías representativas de colon completo desde ciego hasta recto y sección longitudinal de colon sin ciego y libre de materia fecal en ratones *WT*, *IL-4RαKO* y *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox</sup>* con CAC. E) Tamaño del colon, F) Número de tumores en el colon y G) Tamaño del tumor <2 mm y > 2 mm. Datos

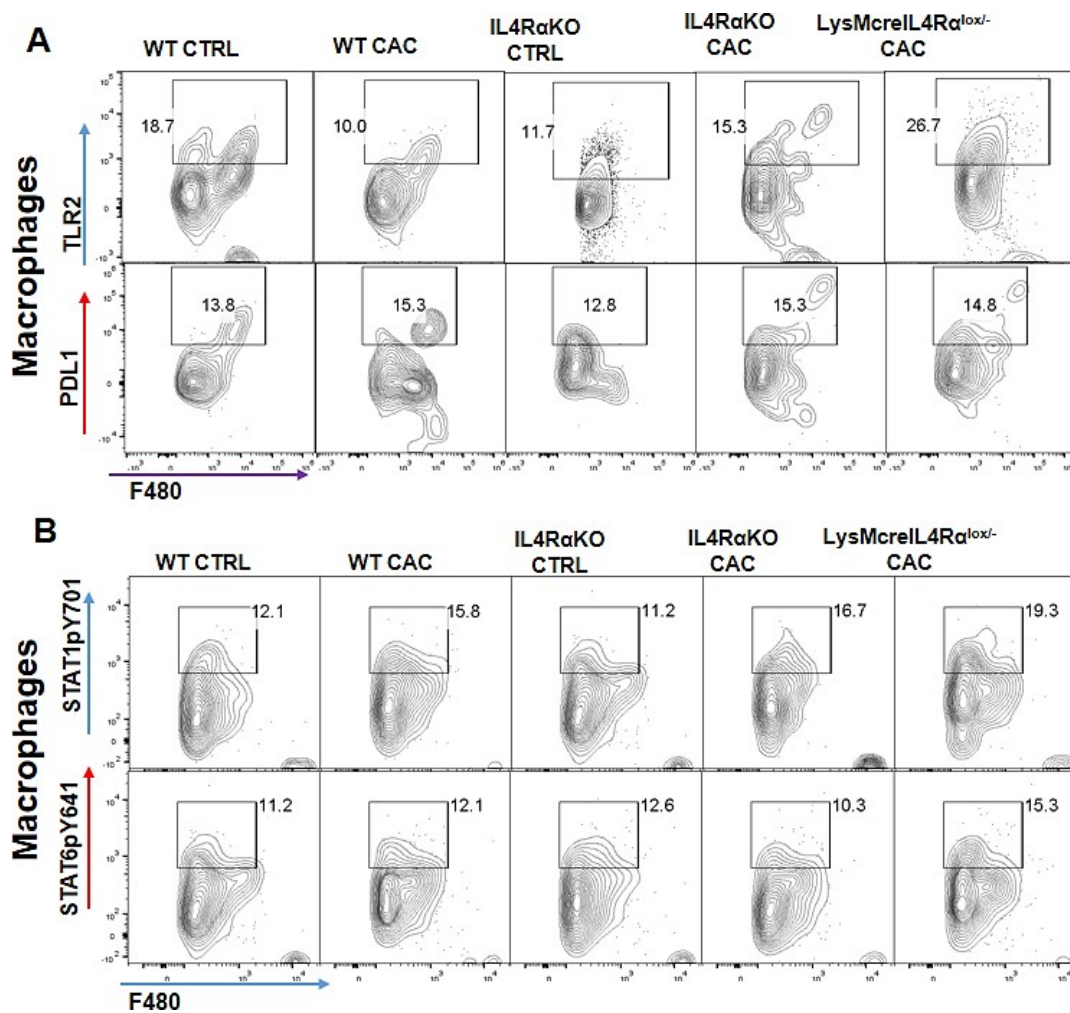


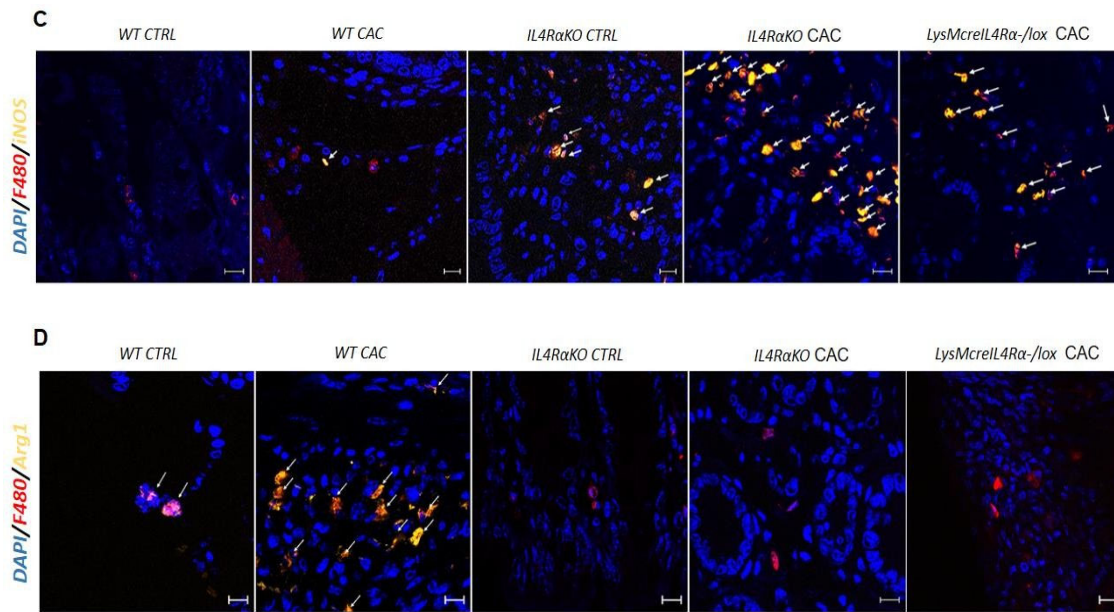
de 3 experimentos diferentes con al menos 3 ratones por grupo. Se realizó un ANOVA de una vía para todos los paneles y la media se presentó con barras de error de desviación estándar (desviación estándar media) para cada grupo experimental. Valor de significancia  $p=0.05$  (\*),  $p=0.01$  (\*\*),  $p=0.001$  (\*\*\*)

#### **7.4 La infiltración en colon de macrófagos M1 en ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-lox</sup>-CAC* no es suficiente para evitar el desarrollo de tumores en colon.**

A continuación, evaluamos el perfil de activación de macrófagos infiltrados en el colon y encontramos que en ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-lox</sup>-CAC* había un mayor porcentaje de macrófagos *M1 F480<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup>* (Fig.4A), pero no observamos diferencias en el porcentaje de macrófagos *M2 F480<sup>+</sup>PDL1<sup>+</sup>* en comparación con los ratones *WT-CAC* (Fig. 4A). Para evaluar la funcionalidad en la vía de señalización de los macrófagos *M1* o *M2* en el colon, analizamos la fosforilación del factor de transcripción *STAT1* (*pSTAT1*), asociado con una respuesta inflamatoria y con la activación de macrófagos *M1*, así como la fosforilación del factor de transcripción *STAT6* (*pSTAT6*) río abajo del *IL-4R $\alpha$* , asociado con una respuesta antiinflamatoria y con la activación de macrófagos *M2*. El porcentaje de macrófagos *M1 STAT1<sup>+</sup>* infiltrados en el colon fue alto en ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC*, sin embargo, los ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-lox</sup>-CAC* mostraron el mayor reclutamiento de macrófagos *M1 STAT1<sup>+</sup>* en colon mientras que su porcentaje de macrófagos *M2 STAT6<sup>+</sup>* no cambió en comparación con los ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* y *WT-CAC* (Fig. 4B). Además, mediante Inmunofluorescencia confocal confirmamos que tanto los ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-lox</sup>-CAC*

como los ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* tenían macrófagos *M1* (*F480*<sup>+</sup>*iNOS*<sup>+</sup>) infiltrados en colon (Fig.4C), sin embargo, la presencia de macrófagos *M2* (*F480*<sup>+</sup>*Arg1*<sup>+</sup>) solo se observó en ratones *WT-CAC* (Fig. 4D). Estos datos nos indicaron que la alta infiltración de macrófagos *M1* en ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-lox</sup>-CAC* no fue suficiente para prevenir el desarrollo de tumores en colon.





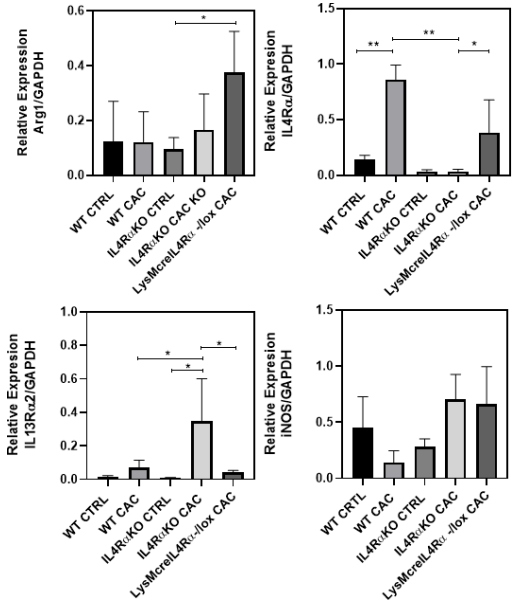
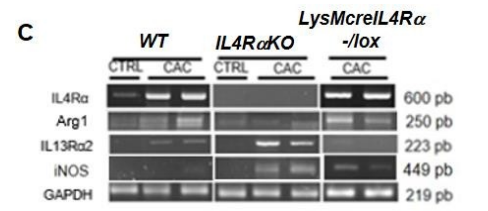
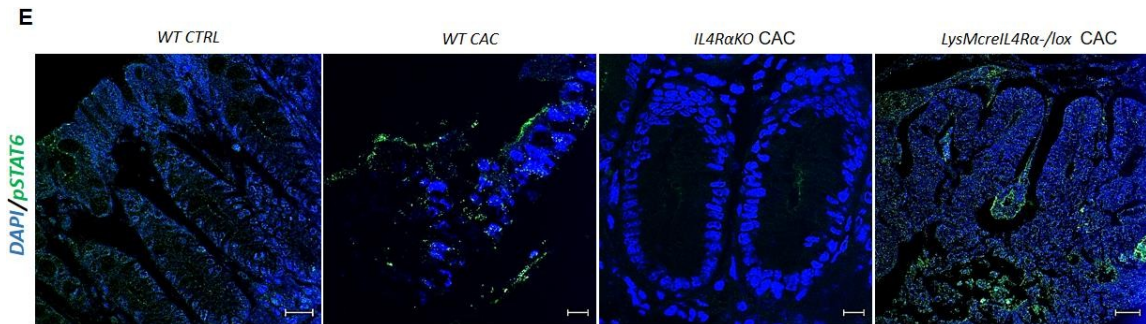
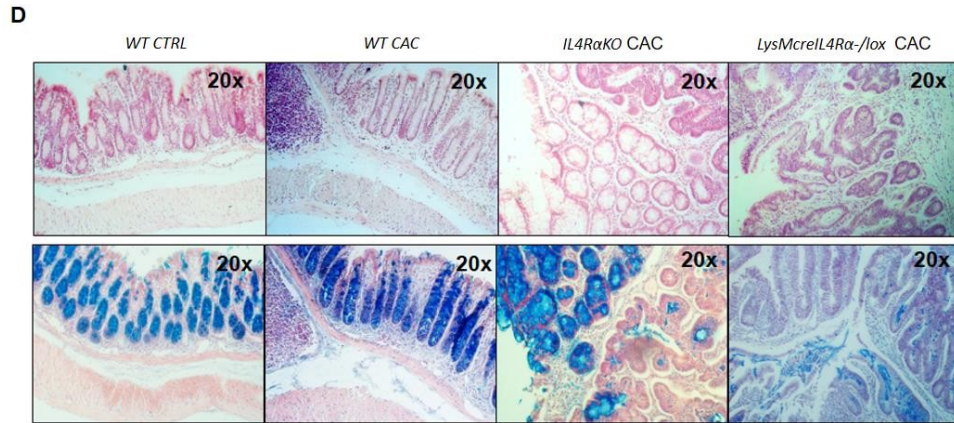
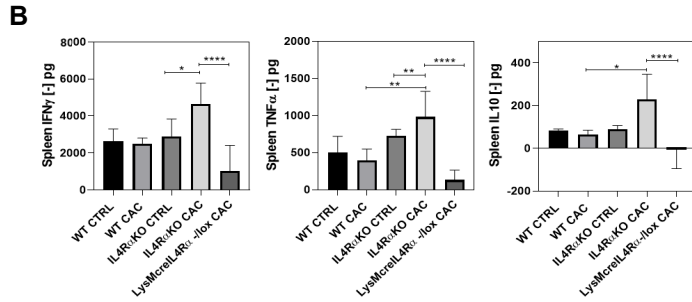
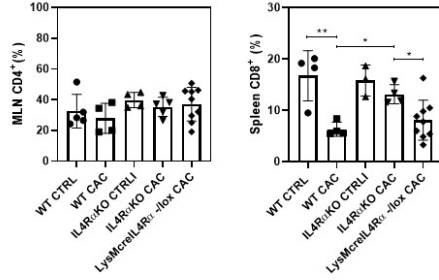
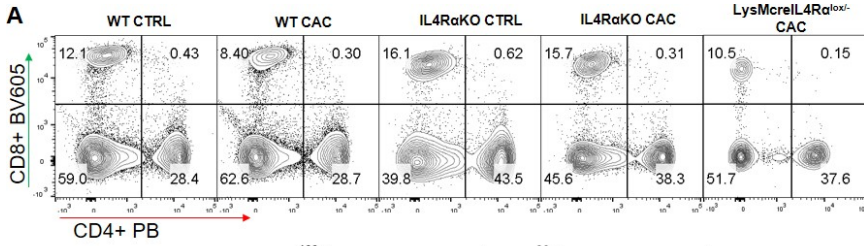
**Figura 4.** La infiltración de macrófagos *M1* en ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>-/lox</sup>-CAC* no es suficiente para evitar la tumorigénesis de colon. A) Citometría de flujo de células de colon, diagramas de puntos y gráficos que representan el porcentaje de macrófagos *M1* ( $F480^{+}TLR2^{+}$ ), *M2* ( $F480^{+}TLR2^{+}$ ) y B) macrófagos *M2* ( $F480^{+}STAT6^{+}$ ), *M1* ( $F480^{+}pSTAT1^{+}$ ) infiltrados en colon de ratones *WT*, *IL4RαKO* y *LysMcreIL4Rα<sup>-/lox</sup>-CAC*, sacrificados al final del tercer ciclo de administración de *DSS*. C) Marcador de activación de macrófagos *M1* en tejido de colon evaluado por inmunofluorescencia. Datos microscópicos de cortes de colon de ratones *WT CTRL*, *WT-CAC*, *IL4RαKO CTRL*, *IL-4RαKO-CAC* y *LysMcreIL4Rα<sup>-/lox</sup>-CAC*, teñidos con el tinte de unión al ADN (DAPI) en azul, *F480* en rojo e *iNOS* en amarillo. D) Marcadores de activación de macrófagos *M2* en tejido de colon evaluados por inmunofluorescencia. Datos microscópicos de secciones de colon de *WT CTRL*, *WT-CAC*, *IL-4RαKO-CAC* y *LysMcreIL-4Rα<sup>-/lox</sup>-CAC*, teñidas con el tinte de unión al ADN (DAPI) en azul, *F480* en rojo y *Arg1* en amarillo. Las fotografías se tomaron con un objetivo de 63X. Datos de 3 experimentos diferentes con al menos 3 ratones por grupo. Se realizó un ANOVA de una vía para todos los paneles y la media se presentó con barras de error de desviación estándar (desviación estándar media) para cada grupo experimental. Valor de significancia  $p=0.05$  (\*),  $p=0.01$  (\*\*),  $p=0.001$  (\*\*\*)). Las barras de escala indican 10  $\mu\text{m}$ .

### **7.5 Los macrófagos M1 en ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$* <sup>-lox</sup> no tienen un papel protector durante el CAC.**

Posteriormente, evaluamos diferentes parámetros inmunológicos con el fin de definir mejor el posible papel de los macrófagos *M1* infiltrados en colon en ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$* <sup>-lox</sup>-CAC. Nosotros no encontramos diferencias en el porcentaje de células T *CD4*<sup>+</sup> en *MLN* (Fig. 5A) en ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$* <sup>-lox</sup>-CAC. Sin embargo, el porcentaje de células T *CD8*<sup>+</sup> era menor en ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$* <sup>-lox</sup>-CAC a niveles similares que en los ratones *WT*-CAC (Fig. 5A). Además, observamos que en ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$* <sup>-lox</sup>-CAC había una disminución en la producción de *IFN*- $\gamma$  (Fig. 5B), por lo que decidimos evaluar si los cambios en el porcentaje de poblaciones de células T en ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$* <sup>-lox</sup>-CAC podría estar relacionado con otras citocinas como la *IL-10*, una citocina antiinflamatoria con efectos en la inmunorregulación y el *TNF*- $\alpha$ , una citocina inflamatoria involucrada en la activación y en la proliferación de células T vírgenes y efectoras (79). Nosotros encontramos que los ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$* <sup>-lox</sup>-CAC mostraban niveles bajos de estas citocinas, mientras que los ratones *IL-4R $\alpha$* *KO*-CAC mostraban una mayor producción de *IFN*- $\gamma$  y de *TNF*- $\alpha$ , así como de *IL-10* (Fig. 5B). Posteriormente, nosotros evaluamos si los resultados anteriores en ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$* <sup>-lox</sup>-CAC podrían estar asociados con la expresión del *IL-4R $\alpha$*  en otros tipos de células. Nosotros observamos que tanto los ratones *LysMcreIL4R $\alpha$* <sup>-lox</sup>-CAC como los ratones *WT*-CAC sobre expresaban la *IL-4R $\alpha$*  en colon (Fig.5C), de acuerdo

con esta observación, la expresión de *Arg1* también fue mayor en ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox</sup>-CAC* que en ratones *IL-4RαKO-CAC* (Fig. 5C). En consecuencia, evaluamos si la expresión elevada de *Arg1* en ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox</sup>-CAC* también podría estar asociada con la expresión del receptor monomérico de tipo 2 de *IL-13 (IL13Rα2)*. Nuestros resultados nos indicaron que los ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox</sup>-CAC* no expresaban *IL13Rα2* (Fig. 5C). Por tanto, la expresión elevada de *Arg1* en ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox</sup>-CAC* era promovida por la expresión de la *IL-4Rα* y no por la expresión *IL13Rα2*. Asimismo, no encontramos diferencias en la expresión del gen iNOS en colon (Fig. 5C). Además, los ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox</sup>-CAC* mostraron un mayor daño en la estructura y en la arquitectura del epitelio del colon (Fig. 5D), así como una disminución en la producción de moco por células caliciformes (Fig. 5D). Lo cual, podría estar asociado con la alta expresión de la *IL-4Rα* en ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox</sup>-CAC* en tejido de colon así como con la fosforilación de *STAT6 (pSTAT6)* (80). Por el contrario, en ratones *IL-4RαKO-CAC*, como se esperaba, no se observó a *pSTAT6* en tejido de colon (Fig. 5E). Estos resultados nos sugirieron que los macrófagos *M1* infiltrados en colon en ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox</sup>-CAC* no eran suficientes para ejercer una función protectora que impidiera el desarrollo de tumores durante el *CAC*.





**Figura 5.** Los macrófagos *M1* en ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox</sup>* no juegan un papel protector en el desarrollo de tumores en el colon. A) Gráficos y diagramas de puntos representativos de los porcentajes totales de linfocitos T *CD4<sup>+</sup>* y *CD8<sup>+</sup>* en *MLN*. B) Producción de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 por  $1 \times 10^5$  células de bazo estimuladas con anticuerpo anti-*CD3* durante 48 horas. Las citocinas se analizaron en los sobrenadantes usando el kit de inflamación de ratón *CBA*. C) Datos de *RT-PCR* representativos y totales para *IL-4Rα*, Arginase-1, *IL-13Rα2* e *iNOS* de muestras de tejido de colon normalizadas con el gen constitutivo de *GAPDH*. D) Tinción con *H&E* para determinar la arquitectura y estructura del epitelio del colon, así como tinción con azul Alcian para determinar la producción de moco por las células caliciformes. E) Imagen representativa de la tinción por inmunofluorescencia del tejido de colon de los grupos *WT CTRL*, *WT-CAC*, *IL-4RαKO-CAC* y *LysMcreIL-4Rα<sup>-lox</sup>-CAC* utilizando colorante de unión al ADN (*DAPI*) en azul y *pSTAT6* verde. Las fotografías se tomaron con un objetivo de 63X. Datos de 3 experimentos diferentes con al menos 3 ratones por grupo. Se realizó un *ANOVA* de una vía para todos los paneles y la media se presentó con barras de error de desviación estándar (desviación estándar media) para cada grupo experimental.  $p = 0,05$  (\*),  $p = 0,01$  (\*\*),  $p = 0,001$  (\*\*\*),  $p = 0,0001$  (\*\*\*\*). Las barras de escala indican 10  $\mu\text{m}$ .

## 8.0 Discusión

Actualmente es ampliamente aceptado que un microambiente inflamatorio es uno de los principales factores de riesgo asociados con el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis (CAC). Sin embargo, las respuestas antiinflamatorias mediadas por la vía de señalización *IL-4/STAT6* pueden favorecer que las células inmunes infiltradas en el tumor adquieran fenotipos protumorales como los macrófagos asociados a tumores (TAM), que impulsan el desarrollo y establecimiento de diferentes tipos de tumores (7, 19, 81). En este trabajo nosotros confirmamos que la ausencia total del *IL-4R $\alpha$*  durante el CAC se relacionada directamente con una reducción significativa en el número de tumores en colon. Estos hallazgos estaban asociados aparentemente con la prevalencia de una respuesta inflamatoria en ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC*, caracterizados por mantener un porcentaje normal de linfocitos T *CD8<sup>+</sup>*, una mayor producción de *IFN- $\gamma$*  y *TNF- $\alpha$*  y por una mayor infiltración de macrófagos *M1 (F480<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup> STAT1<sup>+</sup>)* que sobre expresaban al gen *iNOS* en colon. Varios estudios han confirmado que la expresión de *iNOS* en macrófagos es necesaria para eliminar células tumorales (82-84), ya que *iNOS* es capaz de mejorar la quimiosensibilización a la citotoxicidad del cisplatino (67), inducir apoptosis (85) e inhibir el crecimiento de células tumorales (84, 86). En el sistema inmunológico se ha informado que la expresión de *iNOS* puede ser inducida por *IFN- $\gamma$* , una citocina inflamatoria producida



por células T  $CD8^+$  (87) y  $CD4^+$ , que contribuye con la activación de macrófagos tumorocidas (76, 87, 88). De hecho, aunque en ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* la respuesta inflamatoria en el colon podría ser capaz de generar daño en el tejido circundante debido a la infiltración de macrófagos *M1* y la expresión de *iNOS*, nosotros no encontramos daño en las células caliciformes productoras de moco, ni daño en la estructura y en la arquitectura del epitelio intestinal. De hecho, los ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* sobre expresaban *Arg1* y *Relm $\alpha$ 1*, los cuales son genes típicos de procesos inflamatorios tempranos que promueven la reparación del tejido dañado (57). Consistente con nuestros resultados, en estudios previos con ratones deficientes en *STAT6* (*STAT6*<sup>-/-</sup>), el principal factor de transcripción río abajo del *IL-4R $\alpha$* , no se observó una reducción significativa de la expresión de *Arg1* e *Ym1* en ratones *STAT6*<sup>-/-</sup> cuando fueron expuestos al modelo *DSS* (89). Sin embargo, nosotros encontramos que la sobreexpresión de *Arg1* y *Relm $\alpha$*  en ratones *IL-4R $\alpha$ KO-CAC* podría estar relacionado con otras vías anti- inflamatorias, como lo es la mediada por la expresión del *IL-13R $\alpha$ 2* en colon, el cual es el receptor monomérico tipo 2 de la *IL-13*. En el pasado, se pensaba que el *IL-13R $\alpha$ 2* actuaba solo como un receptor señuelo, pero se ha demostrado que la *IL-13* puede señalizar a través del *IL-13R $\alpha$ 2* de una manera independiente a la vía *STAT6* (90) y está involucrado en la regeneración de células epiteliales en el tracto gastrointestinal (91). De esta forma, nuestros datos sugirieron que durante el desarrollo de *CAC*, la ausencia global del *IL-*

*4Rα* generaba una respuesta inflamatoria capaz de favorecer el reclutamiento de macrófagos *M1* (*F480<sup>+</sup>TLR2<sup>+</sup>STAT1<sup>+</sup>iNOS<sup>+</sup>*) en colon, que podría asociarse con las tasas más bajas de desarrollo de tumores a través de la producción de *IFN-γ* por células *T*, las cuales pueden ser capaces de orquestar respuestas tumorocidas, mientras que el *IL-13Rα2* podría estar promoviendo procesos de reparación tisular a través de *Ag1* y *Relmα1* como un mecanismo compensatorio en ausencia del *IL-4Rα*. Hay datos que indican un papel protector del *IFN-γ* y el *TNF-α* en cáncer de colon, por ejemplo, en un modelo murino de CAC, los ratones deficientes en *IFN-γ* (*IFN-γ<sup>-/-</sup>*) desarrollaron un mayor número de tumores y niveles más altos de citocinas antiinflamatorias que los ratones de *WT* (92, 93). En el modelo murino *APC<sup>min/+</sup> IFNγ<sup>-/-</sup>*, se demostró que la ausencia de *IFN-γ* inducía un mayor número de adenomas y en consecuencia, aproximadamente el 50% de los ratones desarrollaban adenocarcinomas (93). De manera similar, en un modelo de colitis experimental inducida por *DSS*, el *TNF-α* disminuyó el daño tumoral al promover la curación a través de la vía de señalización *Wnt/β-catenina* (94-96). Asimismo, se ha sugerido que la producción sistémica de *TNF-α* protege contra el desarrollo espontáneo de colitis y *CAC* (97). Sin embargo, también hay trabajos controvertidos sobre el papel que juegan estas citocinas proinflamatorias como promotores de tumores; por ejemplo, los niveles bajos de *IFN-γ* pueden mejorar la supervivencia de las células tumorales, como las células tumorales en

cáncer de próstata y cáncer de pulmón (98). Además, la producción de *TNF- $\alpha$*  durante las primeras etapas de la inflamación se ha descrito en el origen, desarrollo, supervivencia y promoción del crecimiento tumoral en *CAC* o *CRC* (99, 100). Durante varios años se ha descrito que ciertos macrófagos, como los TAMs, tienen funciones protumorales en diferentes tipos de cáncer (7, 8, 16). Por esta razón, las nuevas terapias se han centrado tanto en dirigirse al bloqueo de *IL-4R $\alpha$*  en TAMs (101) como en la supresión de la polarización de macrófagos *M2* para mejorar la actividad de los macrófagos *M1*, por ejemplo, mediante el bloqueo del *IL-4R $\alpha$*  en TAMs junto con la administración de ácido zoledrónico, se indujo apoptosis y retraso en la progresión de tumores en cáncer de mama (102, 103). Por el contrario, en nuestro trabajo encontramos que, aunque los ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-lox</sup>* no tenían macrófagos que expresaran la *IL-4R $\alpha$*  y por tanto no se favorecía la activación del fenotipo TAM durante el *CAC*, los ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-lox</sup>* desarrollaban tumores y tenían un mayor daño en la estructura y en la arquitectura del epitelio intestinal, así como una menor producción de moco por células caliciformes. De hecho, aunque los ratones *LysMcreIL-4R $\alpha$ <sup>-lox</sup>-CAC* mostraron una mayor infiltración de macrófagos *M1* y expresaban iNOS en colon. Estos macrófagos *M1* parecían ya no tener una función tumoricida y protectora ya que había porcentajes disminuidos de células *T CD8<sup>+</sup>* y una menor producción de *IFN- $\gamma$*  y *TNF- $\alpha$*  (79, 104, 105), lo que sugirió una respuesta inflamatoria débil. Además,

en colon los ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>/lox</sup>-CAC* mostraron una expresión disminuida del *IL-13Rα2* mientras que la expresión de *IL-4Rα* se encontraba elevada, como en el caso de los ratones *WT-CAC*. Hasta ahora se desconoce el momento específico para la transformación patológica de la vía de señalización *IL-4/STAT6* que favorezca el desarrollo de *CAC*. De hecho, en condiciones normales, el factor de transcripción del *IL-4R*, *STAT6* promueve la proliferación y diferenciación de las células epiteliales intestinales secretoras (*IEC*) en colon (106). Sin embargo, la sobreactivación de *STAT6* en las *IEC* se ha asociado con la pérdida de las uniones estrechas que conduce a la desregulación de la permeabilidad, la translocación bacteriana y cambios en el microbioma, así como inflamación intestinal y la tumorigénesis (107). De acuerdo con estas observaciones, estudios previos apoyan la hipótesis de que *STAT6* es crítico en los primeros pasos del desarrollo de *CAC*. De hecho, ratones con *knock-out* global de *STAT6* exhibieron un número significativamente menor de tumores durante el *CAC* (80). De acuerdo con este hallazgo, nosotros encontramos que en tejido de colon de ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>/lox</sup>-CAC* y *WT-CAC* había una mayor fosforilación de *STAT6* (pSTAT6), sin embargo, los ratones *IL-4RαKO-CAC* no mostraron expresión de pSTAT6 en el tejido del colon. Por lo tanto, es probable que en los ratones *LysMcreIL-4Rα<sup>/lox</sup>-CAC* la respuesta inmune mediada por macrófagos *M1* no era suficiente para detener el crecimiento tumoral debido a la expresión de *IL-4Rα* y la sobreactivación de

*pSTAT6* en el tejido de colon. Por tanto, la expresión de *IL-4R $\alpha$*  en células no hematopoyéticas, tales como células epiteliales, podría ser la principal responsable del desarrollo de tumores en colon en ausencia del *IL-4R $\alpha$*  en macrófagos en ratones *LysMcreIL4R $\alpha$ <sup>-lox</sup>-CAC*. En consistencia con esta observación, un estudio reciente con el modelo *AOM/DSS* se demostró que durante la pérdida restringida del *IL-4R $\alpha$*  en *IEC* (*IL-4R $\alpha$  <sup>$\Delta$ IEC</sup>* mice) los tumores fueron significativamente más pequeños, lo que se correlacionó con una proliferación reducida detectada por la incorporación de BrdU, aunque los parámetros inmunológicos no fueron analizados (89). Sin embargo, en condiciones basales, el *IL-4R $\alpha$*  no se expresa o tiene una baja expresión en tejidos epiteliales normales, sin embargo, se ha observado una sobreexpresión del *IL-4R $\alpha$*  en la superficie de varios tumores sólidos, en donde la *IL-4* puede estimular la angiogénesis a través de la vía soluble de la integrina *VCAM-1/alfa4* de células endoteliales (108, 109), mientras que en el sistema inmunológico los niveles elevados de *IL-4* (normalmente producidos por los linfocitos que infiltran el tumor) pueden contribuir a la resistencia a la apoptosis de los tumores sólidos (110, 111). Además, la *IL-4* también es capaz de favorecer la proliferación y la supervivencia de células cancerosas, en parte al inducir la captación de glucosa (112, 113). En este sentido, nuestros resultados sugieren que la reducción significativa de los tumores de colon en ratones *IL-4R $\alpha$ KO* podría estar asociada a una respuesta inflamatoria. Sin embargo, también

encontramos que la expresión o no expresión de la *IL-4R $\alpha$*  en macrófagos y el fenotipo *TAM* en *CAC* no fueron los principales factores responsables de los cambios iniciales que condujeron a la promoción del desarrollo de tumores en colon.

Se ha prestado mucha atención al papel de los *TAMs* en diferentes tipos de cánceres. Aquí, demostramos que tanto los *TAMs* como los macrófagos *M1* no son prescindibles para la tumorigénesis de colon inducida por *AOM/DSS*. Nuestros datos sugieren que es probable que la expresión de la *IL-4R $\alpha$*  en otros tipos de células (células no inmunes), así como las citocinas y las células infiltradas en el microambiente tumoral, sean capaces de reemplazar la actividad protumoral mediada por los *TAM*. Definitivamente se necesitan más estudios para determinar el tiempo de sobreexpresión de la *IL-4R $\alpha$*  en *IEC* durante la tumorigénesis del colon, lo que puede permitir el diseño de nuevas inmunoterapias dirigidas hacia la *IL-4R $\alpha$*  en momentos específicos y en células específicas para aumentar la eficacia de los tratamientos, en lugar de dirigirse a todas las poblaciones de macrófagos *M1* o *M2* y dañar procesos homeostáticos en otros tejidos. En conclusión, nuestros datos sugieren que la expresión del *IL4Ra* en *TAMs* no se asocia directamente con el desarrollo inicial de tumores ya que aunque el perfil de macrófagos *M1* se encontraba favorecido por la ausencia de la *IL4Ra* en macrófagos, los macrófagos *M1* no ejercían un papel tumoricida que evitará el desarrollo tumoral. Sin embargo es probable que la expresión del *IL4Ra* en otros tipos

celulares así como su interacción con otras células inmunes y el microambiente tumoral en sí, fueran los principales responsables de los cambios iniciales del desarrollo tumoral.

## 9.0 Referencias

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
2. Dyson JK, Rutter MD. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? *World journal of gastroenterology*. 2012;18(29):3839-48.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
4. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2101-14 e5.
5. Ingram N, Northwood EL, Perry SL, Marston G, Snowden H, Taylor JC, et al. Reduced type II interleukin-4 receptor signalling drives initiation, but not progression, of colorectal carcinogenesis: evidence from transgenic mouse models and human case-control epidemiological observations. *Carcinogenesis*. 2013;34(10):2341-9.
6. Koller FL, Hwang DG, Dozier EA, Fingleton B. Epithelial interleukin-4 receptor expression promotes colon tumor growth. *Carcinogenesis*. 2010;31(6):1010-7.
7. Vinnakota K, Zhang Y, Selvanesan BC, Topi G, Salim T, Sand-Dejmek J, et al. M2-like macrophages induce colon cancer cell invasion via matrix metalloproteinases. *Journal of cellular physiology*. 2017;232(12):3468-80.
8. Wang HW, Joyce JA. Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: priming for protumoral functions. *Cell cycle*. 2010;9(24):4824-35.
9. Zhong X, Chen B, Yang Z. The Role of Tumor-Associated Macrophages in Colorectal Carcinoma Progression. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2018;45(1):356-65.
10. Wang W, Li X, Zheng D, Zhang D, Peng X, Zhang X, et al. Dynamic changes and functions of macrophages and M1/M2 subpopulations during ulcerative colitis-associated carcinogenesis in an AOM/DSS mouse model. *Molecular medicine reports*. 2015;11(4):2397-406.
11. Bankaitis KV, Fingleton B. Targeting IL4/IL4R for the treatment of epithelial cancer metastasis. *Clinical & experimental metastasis*. 2015;32(8):847-56.
12. Chen J, Gong C, Mao H, Li Z, Fang Z, Chen Q, et al. E2F1/SP3/STAT6 axis is required for IL-4-induced epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *International journal of oncology*. 2018;53(2):567-78.
13. Lin X, Wang S, Sun M, Zhang C, Wei C, Yang C, et al. miR-195-5p/NOTCH2-mediated EMT modulates IL-4 secretion in colorectal cancer to affect M2-like TAM polarization. *Journal of hematology & oncology*. 2019;12(1):20.
14. Todaro M, Lombardo Y, Francipane MG, Alea MP, Cammareri P, Iovino F, et al. Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell death and differentiation*. 2008;15(4):762-72.



15. Osawa E, Nakajima A, Fujisawa T, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Nakagama H, et al. Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers. *International journal of cancer*. 2006;118(9):2232-6.
16. Cui YL, Li HK, Zhou HY, Zhang T, Li Q. Correlations of tumor-associated macrophage subtypes with liver metastases of colorectal cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention :APJCP*. 2013;14(2):1003-7.
17. Kang JC, Chen JS, Lee CH, Chang JJ, Shieh YS. Intratumoral macrophage counts correlate with tumor progression in colorectal cancer. *Journal of surgical oncology*. 2010;102(3):242-8.
18. Cassetta L, Pollard JW. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nature reviews Drug discovery*. 2018;17(12):887-904.
19. Ries CH, Cannarile MA, Hoves S, Benz J, Wartha K, Runza V, et al. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. *Cancer cell*. 2014;25(6):846-59.
20. Sanchez-Barriga JJ. Mortality trends and risk of dying from colorectal cancer in the seven socioeconomic regions of Mexico, 2000-2012. *Revista de gastroenterologia de Mexico*. 2017;82(3):217-25.
21. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2044-58.
22. Rozen P, Shomrat R, Strul H, Naiman T, Karminsky N, Legum C, et al. Prevalence of the I1307K APC gene variant in Israeli Jews of differing ethnic origin and risk for colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1999;116(1):54-7.
23. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery*. 2009;22(4):191-7.
24. Keller DS, Windsor A, Cohen R, Chand M. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. *Techniques in coloproctology*. 2019;23(1):3-13.
25. Lakatos PL, Lakatos L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World journal of gastroenterology*. 2008;14(25):3937-47.
26. Adami HO, Bretthauer M, Emilsson L, Hernan MA, Kalager M, Ludvigsson JF, et al. The continuing uncertainty about cancer risk in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2016;65(6):889-93.
27. Fung BM, Lindor KD, Tabibian JH. Cancer risk in primary sclerosing cholangitis: Epidemiology, prevention, and surveillance strategies. *World journal of gastroenterology*. 2019;25(6):659-71.
28. Rhodes JM, Campbell BJ. Inflammation and colorectal cancer: IBD-associated and sporadic cancer compared. *Trends in molecular medicine*. 2002;8(1):10-6.
29. Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z, David G, Pandur T, Balogh M, et al. Risk factors for ulcerative colitis-associated colorectal cancer in a Hungarian cohort of patients with ulcerative colitis: results of a population-based study. *Inflammatory bowel diseases*. 2006;12(3):205-11.

30. Rutter MD, Saunders BP, Wilkinson KH, Rumbles S, Schofield G, Kamm MA, et al. Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1030-8.
31. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature reviews Immunology*. 2014;14(10):667-85.
32. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2018;9(6):7204-18.
33. Nussbaum MS. Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition*. 1994;18(2):194.
34. Recchiuti A, Mattoscio D, Isopi E. Roles, Actions, and Therapeutic Potential of Specialized Pro-resolving Lipid Mediators for the Treatment of Inflammation in Cystic Fibrosis. *Frontiers in pharmacology*. 2019;10:252.
35. Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Seminars in immunopathology*. 2013;35(2):229-44.
36. Grivennikov SI, Cominelli F. Colitis-Associated and Sporadic Colon Cancers: Different Diseases, Different Mutations? *Gastroenterology*. 2016;150(4):808-10.
37. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990;61(5):759-67.
38. Itzkowitz SH, Yio X. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2004;287(1):G7-17.
39. Aoki K, Taketo MM. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of cell science*. 2007;120(Pt 19):3327-35.
40. Barker N, Ridgway RA, van Es JH, van de Wetering M, Begthel H, van den Born M, et al. Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature*. 2009;457(7229):608-11.
41. Nelms K, Keegan AD, Zamorano J, Ryan JJ, Paul WE. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annual review of immunology*. 1999;17:701-38.
42. Hume DA. The mononuclear phagocyte system. *Current opinion in immunology*. 2006;18(1):49-53.
43. Grainger JR, Wohlfert EA, Fuss IJ, Bouladoux N, Askenase MH, Legrand F, et al. Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. *Nature medicine*. 2013;19(6):713-21.
44. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, Benjamin WH, et al. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(1):66-75.
45. Wang S, Ye Q, Zeng X, Qiao S. Functions of Macrophages in the Maintenance of Intestinal Homeostasis. *Journal of immunology research*. 2019;2019:1512969.

46. Chang PV, Hao L, Offermanns S, Medzhitov R. The microbial metabolite butyrate regulates intestinal macrophage function via histone deacetylase inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(6):2247-52.
47. Mowat AM, Bain CC. Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. *Journal of innate immunity*. 2011;3(6):550-64.
48. Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, et al. Interleukin 10 act on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nature immunology*. 2009;10(11):1178-84.
49. Rugtveit J, Bakka A, Brandtzaeg P. Differential distribution of B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) costimulatory molecules on mucosal macrophage subsets in human inflammatory bowel disease (IBD). *Clinical and experimental immunology*. 1997;110(1):104-13.
50. Rugtveit J, Nilsen EM, Bakka A, Carlsen H, Brandtzaeg P, Scott H. Cytokine profiles differ in newly recruited and resident subsets of mucosal macrophages from inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 1997;112(5):1493-505.
51. Isidro RA, Appleyard CB. Colonic macrophage polarization in homeostasis, inflammation, and cancer. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2016;311(1):G59-73.
52. Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GA, Shea-Donohue T, Atamas SP. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *Journal of leukocyte biology*. 2012;92(4):753-64.
53. Seno H, Miyoshi H, Brown SL, Geske MJ, Colonna M, Stappenbeck TS. Efficient colonic mucosal wound repair requires Trem2 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(1):256-61.
54. Morhardt TL, Hayashi A, Ochi T, Quiros M, Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, et al. IL-10 produced by macrophages regulates epithelial integrity in the small intestine. *Scientific reports*. 2019;9(1):1223.
55. Quiros M, Nishio H, Neumann PA, Siuda D, Brazil JC, Azcutia V, et al. Macrophage-derived IL-10 mediates mucosal repair by epithelial WISP-1 signaling. *The Journal of clinical investigation*. 2017;127(9):3510-20.
56. Cosin-Roger J, Ortiz-Masia D, Calatayud S, Hernandez C, Esplugues JV, Barrachina MD. The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD. *Mucosal immunology*. 2016;9(4):986-98.
57. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593-604.
58. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology*. 2010;11(10):889-96.
59. Cotechini T, Atallah A, Grossman A. Tissue-Resident and Recruited Macrophages in Primary Tumor and Metastatic Microenvironments: Potential Targets in Cancer Therapy. *Cells*. 2021;10(4).
60. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(1):71-8.

61. van der Bij GJ, Bogels M, Oosterling SJ, Kroon J, Schuckmann DT, de Vries HE, et al. Tumorinfiltrating macrophages reduce development of peritoneal colorectal carcinoma metastases. *Cancer letters*. 2008;262(1):77-86.
62. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002;23(11):549-55.
63. Gocheva V, Wang HW, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, et al. IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes & development*. 2010;24(3):241-55.
64. Ugel S, De Sanctis F, Mandruzzato S, Bronte V. Tumor-induced myeloid deviation: when myeloid-derived suppressor cells meet tumor-associated macrophages. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(9):3365-76.
65. Seril DN, Liao J, Yang GY. Colorectal carcinoma development in inducible nitric oxidase synthase-deficient mice with dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis. *Molecular carcinogenesis*. 2007;46(5):341-53.
66. Zhang R, Ma A, Urbanski SJ, McCafferty DM. Induction of inducible nitric oxide synthase: a protective mechanism in colitis-induced adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 2007;28(5):1122-30.
67. Adams C, McCarthy HO, Coulter JA, Worthington J, Murphy C, Robson T, et al. Nitric oxidase synthase gene therapy enhances the toxicity of cisplatin in cancer cells. *The journal of gene medicine*. 2009;11(2):160-8.
68. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer research*. 1998;58(16):3491-4.
69. Pozzi LA, Maciaszek JW, Rock KL. Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells. *Journal of immunology*. 2005;175(4):2071-81.
70. Ong SM, Tan YC, Beretta O, Jiang D, Yeap WH, Tai JJ, et al. Macrophages in human colorectal cancer are pro-inflammatory and prime T cells towards an anti-tumour type-1 inflammatory response. *European journal of immunology*. 2012;42(1):89-100.
71. Brombacher F, Arendse B, Peterson R, Holscher A, Holscher C. Analyzing classical and alternative macrophage activation in macrophage/neutrophil-specific IL-4 receptor-alpha-deficient mice. *Methods in molecular biology*. 2009;531:225-52.
72. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer science*. 2003;94(11):965-73.
73. Bogen B, Fauskanger M, Haabeth OA, Tveita A. CD4(+) T cells indirectly kill tumor cells via induction of cytotoxic macrophages in mouse models. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2019;68(11):1865-73.

74. Muller E, Christopoulos PF, Halder S, Lunde A, Beraki K, Speth M, et al. Toll-Like Receptor Ligands and Interferon-gamma Synergize for Induction of Antitumor M1 Macrophages. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1383.
75. Zhu Z, Zhang H, Chen B, Liu X, Zhang S, Zong Z, et al. PD-L1-Mediated Immunosuppression in Glioblastoma Is Associated With the Infiltration and M2-Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Frontiers in immunology*. 2020;11:588552.
76. Fauskanger M, Haabeth OAW, Skjeldal FM, Bogen B, Tveita AA. Tumor Killing by CD4(+) T Cells Is Mediated via Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase-Dependent Macrophage Cytotoxicity. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1684.
77. Dinapoli MR, Calderon CL, Lopez DM. The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduced expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *The Journal of experimental medicine*. 1996;183(4):1323-9.
78. Reiner NE. *Methods in molecular biology. Macrophages and dendritic cells. Methods and protocols.* Preface. *Methods in molecular biology*. 2009;531:v-vi.
79. Mehta AK, Gracias DT, Croft M. TNF activity and T cells. *Cytokine*. 2018;101:14-8.
80. Leon-Cabrera SA, Molina-Guzman E, Delgado-Ramirez YG, Vazquez-Sandoval A, Ledesma-Soto Y, Perez-Plasencia CG, et al. Lack of STAT6 Attenuates Inflammation and Drives Protection against Early Steps of Colitis-Associated Colon Cancer. *Cancer immunology research*. 2017;5(5):385-96.
81. Chen Y, Song Y, Du W, Gong L, Chang H, Zou Z. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *Journal of biomedical science*. 2019;26(1):78.
82. Keller R, Geiges M, Keist R. L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates as mediators of tumor cell killing by activated macrophages. *Cancer research*. 1990;50(5):1421-5.
83. Cui S, Reichner JS, Mateo RB, Albina JE. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer research*. 1994;54(9):2462-7.
84. Vicetti Miguel RD, Cherpes TL, Watson LJ, McKenna KC. CTL induction of tumoricidal nitric oxide production by intratumoral macrophages is critical for tumor elimination. *Journal of immunology*. 2010;185(11):6706-18.
85. Albina JE, Reichner JS. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer metastasis reviews*. 1998;17(1):39-53.
86. Xie K, Huang S, Dong Z, Juang SH, Gutman M, Xie QW, et al. Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *The Journal of experimental medicine*. 1995;181(4):1333-43
87. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine & growth factor reviews*. 2002;13(2):95-109.

88. Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU, Rosjo E, Omholt H, Hofgaard PO, et al. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity*. 2005;22(3):371-83.
89. De Oliveira T, Ramakrishnan M, Diamanti MA, Ziegler PK, Brombacher F, Greten FR. Loss of Stat6 affects chromatin condensation in intestinal epithelial cells causing diverse outcome in murine models of inflammation-associated and sporadic colon carcinogenesis. *Oncogene*. 2019;38(11):1787-801.
90. Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, Puri RK, Kitani A. IL-13 signaling through the IL-13 $\alpha$ 2 receptor is involved in induction of TGF- $\beta$ 1 production and fibrosis. *Nature medicine*. 2006;12(1):99-106.
91. Kawashima R, Kawamura YI, Kato R, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, Dohi T. IL-13 receptor  $\alpha$ 2 promotes epithelial cell regeneration from radiation-induced small intestinal injury in mice. *Gastroenterology*. 2006;131(1):130-41.
92. Aliberti J, Hieny S, Reis e Sousa C, Serhan CN, Sher A. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. *Nature immunology*. 2002;3(1):76-82.
93. Wang L, Wang Y, Song Z, Chu J, Qu X. Deficiency of interferon- $\gamma$  or its receptor promotes colorectal cancer development. *Journal of Interferon & Cytokine Research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2015;35(4):273-80.
94. Luissint AC, Parkos CA, Nusrat A. Inflammation and the Intestinal Barrier: Leukocyte-Epithelial Cell Interactions, Cell Junction Remodeling, and Mucosal Repair. *Gastroenterology*. 2016;151(4):616-32.
95. Bradford EM, Ryu SH, Singh AP, Lee G, Goretsky T, Sinh P, et al. Epithelial TNF Receptor Signaling Promotes Mucosal Repair in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of immunology*. 2017;199(5):1886-97.
96. Wang Y, Han G, Chen Y, Wang K, Liu G, Wang R, et al. Protective role of tumor necrosis factor (TNF) receptors in chronic intestinal inflammation: TNFR1 ablation boosts systemic inflammatory response. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2013;93(9):1024-35.
97. Hale LP, Greer PK. A novel murine model of inflammatory bowel disease and inflammation-associated colon cancer with ulcerative colitis-like features. *PLoS one*. 2012;7(7):e41797.
98. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- $\gamma$  in tumor progression and regression: a review. *Biomarker research*. 2020;8:49.
99. Klampfer L. Cytokines, inflammation and colon cancer. *Current cancer drug targets*. 2011;11(4):451-64.
100. Mager LF, Wasmer MH, Rau TT, Krebs P. Cytokine-Induced Modulation of Colorectal Cancer. *Frontiers in oncology*. 2016;6:96.
101. Roth F, De La Fuente AC, Vella JL, Zoso A, Inverardi L, Serafini P. Aptamer-mediated blockade of IL4 $\alpha$  triggers apoptosis of MDSCs and limits tumor progression. *Cancer research*. 2012;72(6):1373-83.



102. Lin Y, Xu J, Lan H. Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. *Journal of hematology & oncology*. 2019;12(1):76.
103. Gnant M, Mlineritsch B, Stoeger H, Luschin-Ebengreuth G, Heck D, Menzel C, et al. Adjuvant endocrine therapy plus zoledronic acid in premenopausal women with early-stage breast cancer: 62-month follow-up from the ABCSG-12 randomised trial. *The Lancet Oncology*. 2011;12(7):631-41.
104. Kim EY, Priatel JJ, Teh SJ, Teh HS. TNF receptor type 2 (p75) functions as a costimulator for antigen-driven T cell responses in vivo. *Journal of immunology*. 2006;176(2):1026-35.
105. Kim EY, Teh HS. TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *Journal of immunology*. 2001;167(12):6812-20.
106. Schubart C, Krljanac B, Otte M, Symowski C, Martini E, Gunther C, et al. Selective expression of constitutively activated STAT6 in intestinal epithelial cells promotes differentiation of secretory cells and protection against helminths. *Mucosal immunology*. 2019;12(2):413-24.
107. Lin Y, Li B, Yang X, Liu T, Shi T, Deng B, et al. Non-hematopoietic STAT6 induces epithelial tight junction dysfunction and promotes intestinal inflammation and tumorigenesis. *Mucosal immunology*. 2019;12(6):1304-15.
108. Fukushi J, Morisaki T, Shono T, Nishie A, Torisu H, Ono M, et al. Novel biological functions of interleukin-4: formation of tube-like structures by vascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;250(2):444-8.
109. Fukushi J, Ono M, Morikawa W, Iwamoto Y, Kuwano M. The activity of soluble VCAM-1 in angiogenesis stimulated by IL-4 and IL-13. *Journal of immunology*. 2000;165(5):2818-23.
110. Conticello C, Pedini F, Zeuner A, Patti M, Zerilli M, Stassi G, et al. IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins. *Journal of immunology*. 2004;172(9):5467-77.
111. Kobayashi M, Kobayashi H, Pollard RB, Suzuki F. A pathogenic role of Th2 cells and their cytokine products on the pulmonary metastasis of murine B16 melanoma. *Journal of immunology*. 1998;160(12):5869-73.
112. Dufort FJ, Bleiman BF, Gumina MR, Blair D, Wagner DJ, Roberts MF, et al. Cutting edge: IL-4-mediated protection of primary B lymphocytes from apoptosis via Stat6-dependent regulation of glycolytic metabolism. *Journal of immunology*. 2007;179(8):4953-7.
113. Venmar KT, Kimmel DW, Cliffl DE, Fingleton B. IL4 receptor alpha mediates enhanced glucose and glutamine metabolism to support breast cancer growth. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1853(5):1219-28.

1. Brombacher F, Arendse B, Peterson R, Holscher A, Holscher C. Analyzing classical and alternative macrophage activation in macrophage/neutrophil-specific IL-4 receptor-alpha-deficient mice. *Methods in molecular biology*. 2009;531:225-52.
  2. Kawashima R, Kawamura YI, Kato R, Mizutani N, Toyama-Sorimachi N, Dohi T. IL-13 receptor alpha2 promotes epithelial cell regeneration from radiation-induced small intestinal injury in mice. *Gastroenterology*. 2006;131(1):130-41.
  3. Leon-Cabrera S, Callejas BE, Ledesma-Soto Y, Coronel J, Perez-Plasencia C, Gutierrez-Cirlos EB, et al. Extraintestinal helminth infection reduces the development of colitis-associated tumorigenesis. *Int J Biol Sci*. 2014;10(9):948-56.
- 114.