



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**PAPEL DEL TRANSDUCTOR DE SEÑALES Y ACTIVADOR DE LA  
TRANSCRIPCIÓN 6 (STAT6) EN EL DESARROLLO DE CÁNCER DE COLÓN  
ASOCIADO A COLITIS (CAC)**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:**

**Yael Gabriela Delgado Ramírez**

**DIRECTORA DE TESIS**

Dra. Sonia Andrea León Cabrera

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**COMITÉ TUTOR**

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Dr. Joselin Hernández Ruiz

Hospital General de México

**CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DEL 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**

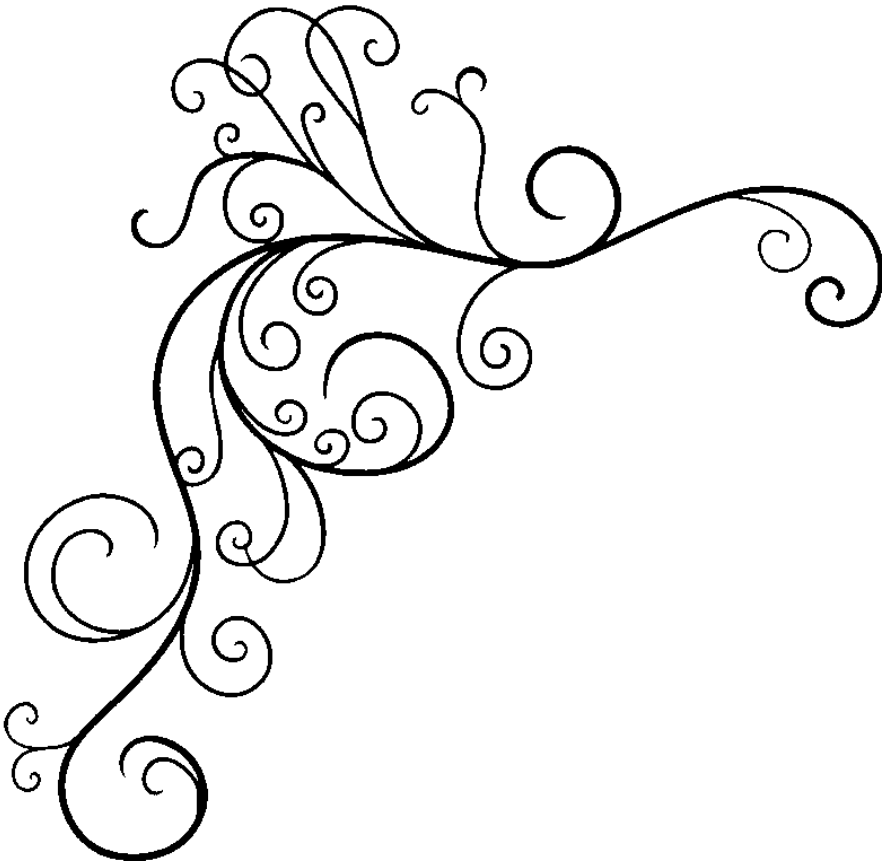
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

Este proyecto fue realizado dentro del programa de posgrado en *Ciencias Biomédicas*, UNAM, en el *Laboratorio de Inmunidad Tumoral (L16)*, en la *Unidad de Biomedicina* de la *Facultad de Estudios Superiores Iztacala* de la UNAM bajo la dirección de la **Dra. Sonia Andrea León Cabrera**.

El desarrollo del trabajo fue posible gracias al apoyo financiero recibido por *El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología* (CONACyT) Proyecto A1S23944 y al *Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica*, PAPIIT, UNAM, proyecto IN215421 , así como por una beca otorgada a la alumna **Yael Gabriela Delgado Ramírez** apoyada por parte de CONACyT (606590).

Finalmente, este proyecto contó con la asesoría de los miembros del Comité Tutor conformado por el **Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdez** y el **Dr. Joselin Hernández Ruiz**.



*A mí futuro yo:*

*Cada final tiene un inicio, esfuérgate sí... pero busca siempre la buena suerte porque va de la mano con el éxito, a veces solo necesitas dejar que la vida te guíe.*

*La vida es eso que pasa mientras estás esperando que algo pase, confía en tí y en tu intuición.*

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi alma mater la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por permitirme seguir creciendo profesional y académicamente como científica, haber sido mi segundo hogar y permitirme cumplir una meta más dentro de sus puertas.

A mi directora de Tesis la Dra. Sonia Andrea León Cabrera, gratitud a quien gratitud merece y considero que después de mis padres ella es la persona a quien más le estaré agradecida toda la vida, sin ella no sería lo que soy hoy. Sonia, me faltan palabras para agradecerte, sin ti no podría haber llegado hasta este nivel, gracias por todo el apoyo, gracias por la experiencia, ayuda y paciencia que me regalaste durante todos estos años, sin ti y tu guía no hubiera podido completar con éxito éste trabajo y aprender todo lo que sé, en verdad y con todo el corazón GRACIAS.

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdez y al Dr. Joselin Hernández Ruiz, muchas gracias por su infinita experiencia y sabiduría, gracias por darme la oportunidad de cumplir esta meta junto a ustedes y sobre todo gracias por la paciencia en los tutoriales, Dios sabe que soy un poco distraída, pero siempre estuvieron dispuestos a ayudarme de la mejor manera que era posible, en verdad muchas gracias.

A la Dra. Yadira Ledesma Soto que siempre cada día y cada segundo de todos estos años estuvo dispuesta a ayudarme, aunque tuviera un millón de mejores cosas que hacer, Yadi jamás acabare de agradecer toda la ayuda, confianza y paciencia que siempre y sin dudar me diste, muchas gracias, espero seguir coincidiendo contigo.

A todos mis compañeros de laboratorio que han pasado conmigo generación tras generación, los quiero a todos y cada uno de ustedes, hicieron de mi estancia en el laboratorio llevadera y muy divertida, sin ustedes habría enloquecido lo juro, son una maravillosa y muy agradable compañía, gracias por soportar mi locura y escuchar mis quejas diarias, muchas gracias a Armando, Megan, Emmanuel, Lesly, David, Paola, Rafa, Flaubert, Carito, Yami, Ángel, Eduardo, Vannesa, Giovanni, Itzel, Mariana y por supuesto Catalina.

Al Bioterio de la Fes Iztacala, por facilitarme los animales de estudio utilizados en este trabajo.

## Dedicatoria

A mi madre Marisela, porque es ella por quien lucho cada día, ella es el pilar que me da fuerza, por ella siempre doy un paso más adelante, porque a pesar de la distancia siempre ha estado ahí cuidando de mí y preocupándose infinitamente más de lo necesario, mami te amo con todo el corazón, con todo lo que soy capaz de amar, por ti soy lo que soy, muchas gracias por estar conmigo, sé que tú eres la única persona en este mundo que puede estar aún más feliz que yo por este logro.

A mi padre Gabriel, porque jamás ha dejado de estar ahí para mí, porque jamás ha dejado de apoyarme y porque, aunque nos ha separado la distancia de la vida adulta es mi papi y siempre me cuida y protege, padre muchas gracias por darme todas las herramientas necesarias para ser quien soy y poder salir victoriosa de cada reto, estoy infinitamente agradecida, éste logro es también tuyo, en verdad te amo con mi corazón y agradezco que estes conmigo siempre.

A mi hermanito bebé Gabriel, bobo te quiero, sé que puedo contar contigo siempre, gracias por estar ahí y creer tan ciegamente en que soy capaz de cualquier cosa, tu confianza en mí siempre me hace creer que quizá sí puedo lograrlo, estaré aquí para ti siempre hermanito, ahora te toca a ti va?.

A mi futuro esposo Aldo Fuentes, es gracioso que algunas personas se ríen de poner a sus novios(as) o parejas en sus dedicatorias porque al paso del tiempo salen de la vida de cada uno para no volver y el nombre queda ahí, afortunadamente puedo decir que no es mi caso y a casi 10 años de que entraste en mi vida puedo volver a poner tu nombre de nuevo aquí, Aldo ni siquiera sé por dónde empezar a decir lo que siento por ti... creo que primero gracias por estar siempre a mi lado, gracias porque a pesar de tanto siempre te has quedado amándome y siendo todo el soporte que he necesitado de cualquier forma, nadie me conoce y entiende mejor que tú y a pesar de eso te has quedado a mi lado aunque ambos sabemos que ni un día ha sido fácil, gracias por hacerme feliz y compartir toda tu vida conmigo, gracias también por ser mi mejor amigo y no dejarme caer jamás, eres perfecto para mí y por eso te amo más que demasiado.

A mis amigas Lu y Rebeca, bebés de luz, las amo con todo mi corazón, gracias por estar ahí escuchándome y soportándome, aunque sabemos que no fue tarea fácil, Lu gracias por ser mi libro de los secretos, eres la mejor amiga del mundo, sabes todo de mí y aún no lo has usado en mi contra jaja te adoro y amo tenerte en mi vida. Rebe, jamás terminare de agradecer todo lo que haces e hiciste por mí durante estos años, fuiste más que mi amiga y sin ti, tu ayuda y apoyo incondicional jamás habría podido salir de esto con mi cordura intacta, las amo a las dos, por fa ustedes nunca salgan de mi vida.

...

A ti, si tú, que estuvo conmigo haciendo mi vida caótica y feliz por algunos años detrás de este proyecto de vida, enseñándome y distrayéndome de la locura de la vida de un científico, mostrándome nuevos enfoques, gracias porque fuiste demasiado importante... porque me diste a pesar de todo momentos felices y agradables que me ayudaron durante esas etapas más difíciles y que, aunque ya no estas en mi vida por siempre te estaré muy agradecida por la experiencia.

## ÍNDICE

<b>Índice de figuras .....</b>	<b>8</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>9</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>10</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>11</b>
Cáncer de colon	11
Cáncer de colon asociado a colitis.	13
Vía de señalización de IL4 IL/13 STAT6	17
Papel de STAT6 durante el CAC.	19
Células T reguladoras.	25
Participación de las células T reguladoras durante el cáncer de colon	27
Antecedentes directos entre STAT6 y los linfocitos T reguladores.	29
<b>Hipótesis .....</b>	<b>31</b>
<b>Objetivo general .....</b>	<b>31</b>
Objetivos específicos	31
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>32</b>
Ratones	32
Inducción CAC	32
Valoración y progresión del desarrollo de CAC	33
Sacrificio de animales	33
Análisis macroscópico	33
Análisis histológico	34
Inmunohistoquímica	34
Citometría de flujo	35
Anticuerpos	36
Extracción de ARN y RT-PCR	36
Depleción de T reguladoras	37
Análisis estadístico	37
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>

Los animales con deficiencia de STAT6 son menos susceptibles al desarrollo CAC inducido por AOM/DSS.	38
Los animales deficientes en STAT6 presentan un aumento en la frecuencia de células CD4+CD25+Foxp3+ durante las etapas tempranas del desarrollo del CAC	42
La ausencia de STAT6 promueve la expresión de IL-10 y TGF-beta en células CD4+CD25+Foxp3+ durante las etapas tempranas del desarrollo del CAC	45
La deficiencia en STAT6 favorece la disminución de linfocitos T CD8 en las primeras etapas del CAC	47
La deficiencia de STAT6 favorece el reclutamiento de células Foxp3+ al colon durante las primeras etapas del CAC	48
Los animales deficientes en STAT6 muestran un incremento en la expresión de citocinas asociadas a los linfocitos T reguladores en etapas tempranas (Día 20) del desarrollo de CAC.	50
La depleción de las células Tregs durante las primeras etapas del CAC restaura el desarrollo tumoral en los animales STAT6-/-	51
Depleción de células T reguladoras mediante el uso del anticuerpo Anti-CD25 (PC61).	54
Análisis histológico durante la administración de anticuerpo PC61	58
El reclutamiento de las células Foxp3+ aumenta a nivel local en los animales STAT6-/- que recibieron el anticuerpo PC61	60
<b>Discusión.....</b>	<b>62</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>68</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>69</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>82</b>



## Índice de figuras

**Figura 1:** Número de nuevos casos en 2020, en ambos sexos, todas las edades.

**Figura 2:** Desregulación de la microbiota intestinal en CCR

**Figura 3:** Respuesta inmune en el entorno tumoral..

**Figura 4:** Vía de señalización IL4/IL13/STAT6.

**Figura 5:** STAT6 modula las respuestas pro-colitis y pro-cáncer

**Figura 6:** STAT6 se relaciona con múltiples factores que se asocian al desarrollo y modulación del CAC

**Figura 7:** Tregs. Mecanismos básicos usados por los linfocitos T reguladores para la modulación de las respuestas inmunes efectoras.

**Figura 8:** Esquema de administración de AOM/DSS en ratones BALB/c y STAT6<sup>-/-</sup>.

**Figura 9:** La deficiencia de STAT6 en los animales tratados con AOM/DSS le confiere resistencia al desarrollo tumoral.

**Figura 10:** Los animales STAT6<sup>-/-</sup> muestran el doble del porcentaje de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> durante la fase inicial

**Figura 11:** Frecuencia inversa de las células Tregs (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) en los animales tratados con WT o STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS durante la progresión colitis-CAC.

**Figura 12:** La deficiencia de STAT6 favorece un aumento en el porcentaje de Tregs que expresan IL-10 y TGF- $\beta$  en etapas tempranas del CAC.

**Figura 13:** Porcentajes de las células CD4<sup>+</sup> células T CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup>

**Figura 14:** En deficiencia de STAT6 aumenta el número de células Foxp3<sup>+</sup> en etapas tempranas de CAC

**Figura 15:** Existe una mayor expresión de la proteína Foxp3 y el ARNm en el colon de los animales STAT6<sup>-/-</sup> tratados con AOM/DSS durante el desarrollo temprano de CAC.

**Figura 16:** La depleción de las células Tregs con el anticuerpo anti CD-25 (PC61) durante las etapas tempranas del CAC restaura el desarrollo tumoral en los animales STAT6<sup>-/-</sup>.

**Figura 17:** Tratamiento con anticuerpo anti-CD25 (PC61) durante la CAC temprana.

**Figura 18:** El uso de PC61 reconstituye los valores de linfocitos Tregs en deficiencia de STAT6 durante el desarrollo de CAC.

**Figura 19:** El tratamiento con anticuerpo PC61 favorece el daño histológico en ratones STAT6<sup>-/-</sup>.

**Figura 20:** El uso de PC61 favorece en el número de células Foxp3 en etapas avanzadas de CAC en deficiencia de STAT6.

## Resumen

Los procesos inflamatorios exagerados constituyen una de las principales causas de inicio del desarrollo de tumores en el cáncer colorrectal asociado a colitis. Dentro de este microambiente inflamatorio están presentes las células T reguladoras (Tregs), que son una subpoblación de linfocitos T-CD4 que se encargan de mantener la homeostasis de la respuesta inmune durante el desarrollo de algunas enfermedades y que desempeñan un papel importante en la coordinación de la inmunomodulación en el cáncer. Mientras que diferentes vías de señalización se activan en respuesta a estos estímulos, se sabe, que el transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6) juega un papel fundamental en las primeras etapas del cáncer de colon asociado a colitis (CAC) ya que los ratones STAT6 knockout (STAT6  $-/-$ ) son altamente resistentes al desarrollo de CAC, sin embargo, el papel de STAT6 en la inducción y función de las células Tregs durante el desarrollo de CAC es poco conocido. En este trabajo tratamos de aclarar la relación que existe entre las células Tregs y la vía de señalización STAT6, para esto se sometieron ratones STAT6  $-/-$  y de tipo salvaje (WT) a un régimen de AOM/DSS, y se determinó la frecuencia de células Tregs periféricas y locales durante la progresión de CAC. Los resultados demostraron que, al finalizar la inducción de CAC, aquellos animales KO en STAT6 no desarrollaron tumores, lo que se asoció con una disminución de la inflamación durante las etapas iniciales del desarrollo de CAC, así como un mayor número de células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en el colon, la circulación y el bazo, incluida una sobreexpresión de TGF-beta, IL-10 y Foxp3. Por el contrario, los ratones WT presentaron una frecuencia inversa de células Tregs en comparación con los ratones STAT6 $-/-$ , que fue seguida por la formación de tumores intestinales. También, al llevar a cabo la inhibición temprana de las células Tregs en los animales STAT6 $-/-$  se observó una restauración del daño histológico, un aumento en la inflamación de la mucosa y en la tumorigénesis comparables con los observados en los ratones WT, por lo que se puede concluir que un aumento en el porcentaje de células Tregs en ausencia de STAT6, favorece la resistencia al desarrollo tumoral. Nuestros datos en conjunto sugieren que STAT6 no solo es importante en el desarrollo de tumores, si no que participa en los procesos inmunológicos reguladores liderados por las células Tregs.

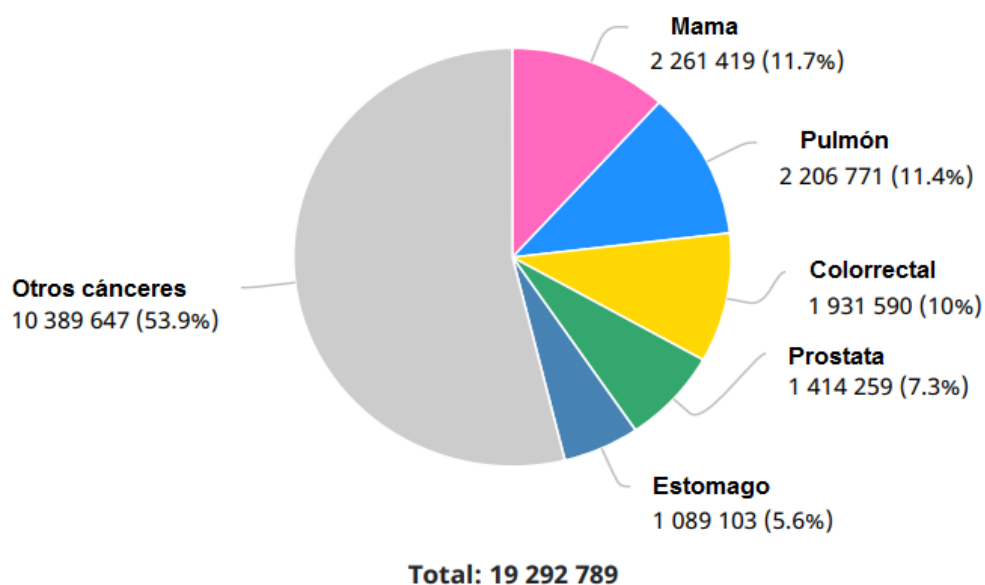
## Abstract

Exacerbated inflammatory processes are one of the main causes of tumor development in colorectal cancer associated with colitis. Regulatory T cells (Tregs) are present within this inflammatory microenvironment, which are a subpopulation of T-CD4 lymphocytes are responsible for maintaining the homeostasis of the immune response during the development of some diseases and that play an important role in the coordination of immunomodulation in cancer; while different signaling pathways are activated in response to these stimuli, it is known that the signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) plays a fundamental role in the early stages of CAC, and STAT6 knockout mice (STAT6<sup>-/-</sup>) are highly resistant to the development of CAC, however, the role of STAT6 in the induction and function of Tregs cells is poorly understood. In this work we tried to clarify the relationship between Tregs cells and the STAT6 signaling pathway, for this, STAT6<sup>-/-</sup> and wild-type (WT) mice were subjected to an AOM/DSS regimen, and the frequency was determined of peripheral and local Tregs cells during the progression of CAC. The results showed that, at the end of the induction of CAC, those KO animals in STAT6 did not develop tumors, this was associated with a decrease in inflammation during the initial stages of CAC development, as well as a greater number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells in the colon, circulation, and spleen, including overexpression of TGF- $\beta$ , IL-10, and Foxp3. In contrast, WT mice showed an inverse frequency of Tregs cells compared to STAT6<sup>-/-</sup> mice, which was followed by intestinal tumor formation. Also, when carrying out early inhibition of Tregs cells in STAT6<sup>-/-</sup> animals, restoration of histological damage was observed, an increase in mucosal inflammation and tumorigenesis comparable to those observed in WT mice, for it can be concluded that an increase in the percentage of Tregs cells in the absence of STAT6 favors resistance to tumor development. Our data together suggest that STAT6 is not only important in the development of tumors but also participates in the regulatory immunological processes led by Tregs cells, however, it is a subject that still needs to be fully understood, especially during the development of CAC.

## Introducción

### Cáncer de colon

El cáncer de colon y recto (CCR) tiene la segunda tasa de mortalidad asociada al cáncer más alta del mundo y es la tercera neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia; En 2020 se notificaron un total de 881.000 muertes asociadas al CCR y 1,8 millones de casos recién diagnosticados (Figura 1) (1).



**Figura 1: Número de nuevos casos en 2020, en ambos sexos, todas las edades. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN**

El CCR esporádico puede ser causado por una mutación hereditaria, como en pacientes con poliposis adenomatosa familiar con inactivación bialélica del gen de la poliposis adenomatosa familiar (APC) o en pacientes con síndrome de Lynch. Los casos restantes exhiben mutaciones activadoras en componentes de la vía de señalización WNT que promueven la proliferación de células malignas (2). Una complicación importante para los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) que incluyen la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerativa (UC), es el riesgo de desarrollar cáncer de colon asociado a colitis (CAC).

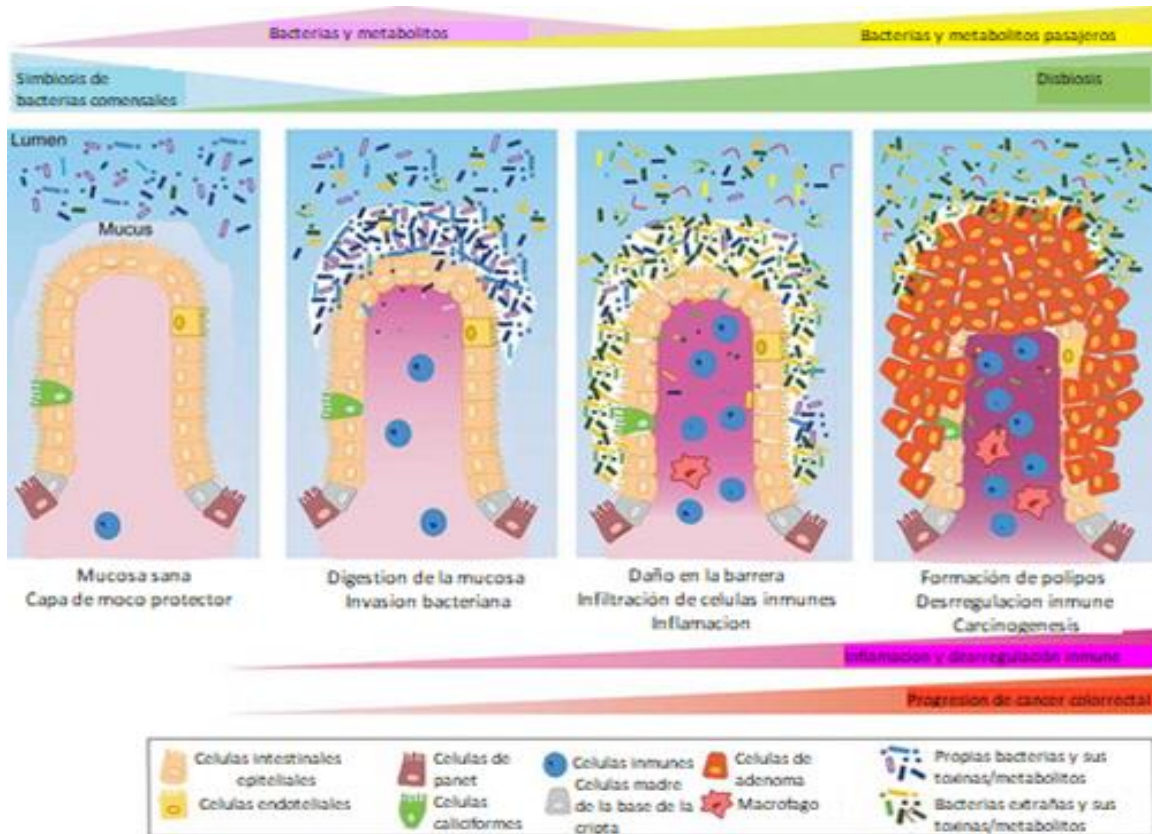
Por ejemplo, se ha demostrado que los pacientes con colitis ulcerativa elevan 2% el riesgo a desarrollar CAC en los próximos 10 años posterior al diagnóstico por UC; 8% a 20 años y 18% a 30 años (2). Adicionalmente, en América Latina, reportes que han examinado cerca de 600 pacientes pertenecientes al programa de vigilancia endoscópica durante un período de 30 años encontraron que 10.8% de los pacientes con UC desarrollaron neoplasias durante los próximos 30 años de seguimiento y desarrollo de la enfermedad (3) Asimismo, la aparición de tumores en pacientes con IBD se incrementa cuando la colitis se diagnostica en edades tempranas y está acompañada por la duración prolongada de la enfermedad.

## **Cáncer de colon asociado a colitis.**

Se sabe que las enfermedades hereditarias como la poliposis adenomatosa familiar no son los únicos factores de riesgo para desarrollar CCR, las características distintivas del cáncer relacionado con la inflamación incluyen la presencia de células inflamatorias y citocinas o quimiocinas inflamatorias en los tejidos tumorales. Sin embargo, los datos médicos y científicos de estudios en humanos y ratones indican que es el equilibrio entre las actividades proinflamatorias y antiinflamatorias lo que influye fuertemente en el resultado clínico (4).

Por lo tanto, la inflamación es una condición muy importante para el desarrollo de este C. Más del 20% de los pacientes con alguna IBD desarrollan CAC dentro de los primeros 30 años desde el inicio de la enfermedad. Se estima que 50% de estos pacientes morirán por CAC en alguna de sus etapas (5). Al respecto, se ha sugerido que no solo la predisposición genética, promueve el desarrollo del CAC, sin, que está precedido por un ambiente inflamatorio agudo y crónico el cual provoca desbalance en la mucosa intestinal posiblemente contribuyendo a trastornos en el microbioma, así como deficiencias en los mecanismos de regeneración y reparación epitelial (6).

Durante la inflamación crónica en el intestino, la disfunción de la barrera epitelial aumenta la susceptibilidad a la infección bacteriana. Además, la inflamación de la mucosa da como resultado la acumulación de estrés oxidativo que causa mutaciones que pueden resultar en el desarrollo de cáncer de colon. En CAC, las citocinas inflamatorias están presentes de manera persistente en el tejido intestinal, y en pacientes con cáncer esporádico, la administración de fármacos antiinflamatorios puede prevenir o retrasar la enfermedad, lo que sugiere que los procesos inflamatorios están involucrados en el inicio de la tumorigénesis (Figura 2) (7).



**Figura 2: Desregulación de la microbiota intestinal en CCR. Marion Avril. 2020**

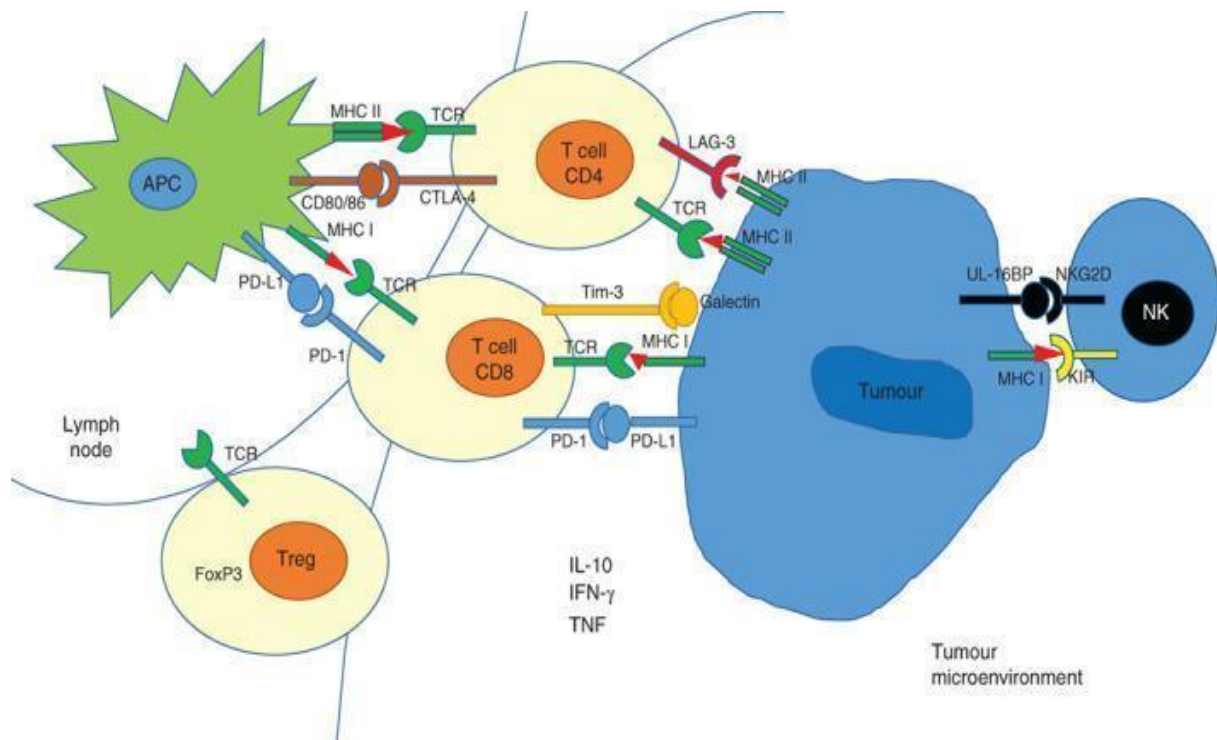
Es evidente que las alteraciones genéticas y epigenéticas que subyacen al desarrollo del CCR tienen un papel que contribuye a la formación de antígenos inmunogénicos específicos de tumores y asociados a tumores (8). Estos antígenos tumorales permiten la identificación y eliminación de células CCR por células de la respuesta inmune (9). Durante una etapa inicial, la colitis se presenta como resultado de un infiltrado celular inflamatorio que incluye macrófagos, neutrófilos y linfocitos T, entre muchas otras células inmunes acompañado de un flujo de citocinas y quimiocinas proinflamatorias como  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $IL-1\beta$  e  $IL17A$ , así como de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, capaces de incrementar el daño genético por mutación e inestabilidad cromosómica (10). Durante el detrimento de la mucosa colónica asociado a la inflamación, la proliferación epitelial se incrementa para reparar el tejido, sin embargo, células con mutaciones genéticas o daño en el ADN pueden continuar en un estado replicativo permanente (3). Por lo tanto, actualmente se considera a los procesos inflamatorios

repetitivos o sostenidos como uno de los factores que aumentan la probabilidad de que las células epiteliales se tornen displásicas y eventualmente se desarrollen en adenocarcinomas invasivos.

Varios mecanismos conducen a la inmunosupresión en el CCR. El reclutamiento de células inmunorreguladoras, la regulación al alza de moléculas inhibitoras (incluidas las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), las células Tregs, los macrófagos de tipo 2 y otros tipos de células asociadas al cáncer) (11-13) y la regulación a la baja de la presentación de antígenos representan métodos de evasión inmunitaria (14). Esto, junto con la regulación positiva de las vías anabólicas que favorecen la rápida supervivencia y proliferación de las células tumorales, a menudo conduce a la generación de un entorno hostil a las células T debido al aumento de la acidez, los bajos niveles de oxígeno, la competencia por los nutrientes y la generación de sustratos de desecho. (14-16). En este contexto, se produce el agotamiento de las células T, definido como la presencia de células T con disminución de la expresión de citocinas y función efectora (17-18).

Las células T activadas expresan correceptores inhibitorios, denominados puntos de control inmunológico. Los mejor caracterizados incluyen PD-1, proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos, gen 3 de activación de linfocitos, mucina 3 de inmunoglobulina de células T (Tim-3) y receptores similares a inmunoglobulinas asesinas. Cuando se unen a ligandos presentes en células presentadoras de antígenos y otras células en el entorno inmunológico, degradan la respuesta inflamatoria (12). Esto sirve como un mecanismo innato para mantener la auto-tolerancia y limitar el daño tisular inmunomediado (Figura 3).





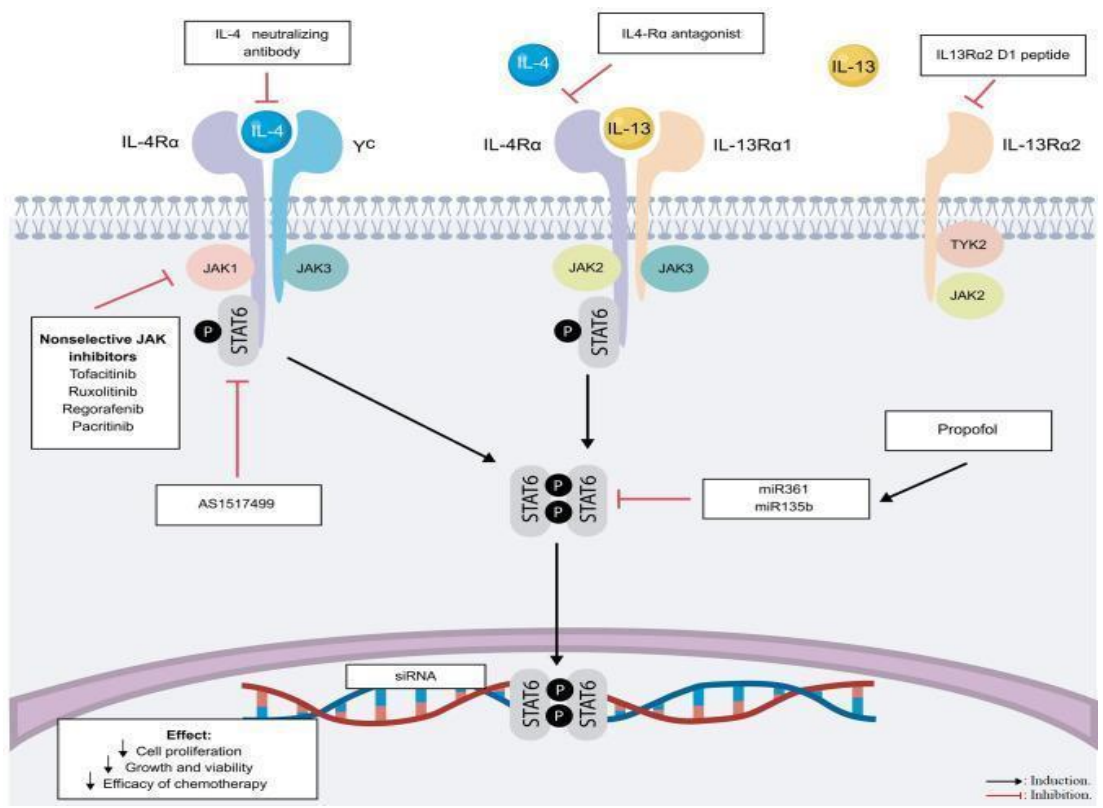
**Figura 3. Respuesta inmune en el entorno tumoral. Las células del sistema inmune como CD4, CD8, APC, NK y Tregs interactúan con la célula tumoral. Marion Avril 2020.**

## Vía de señalización de IL4 IL/13 STAT6

Las citocinas sirven como medio de comunicación entre las células del estroma inmunes, cancerosas y no transformadas en el microambiente tumoral. La familia de transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) desempeña un papel importante en el inicio de la transformación maligna y en el establecimiento de tumores, y se ha estudiado ampliamente en modelos experimentales y en pacientes con cáncer (19). La vía de señalización JAK/STAT es importante para la modulación de la respuesta inmune intestinal (20). STAT6 transduce su señal en el citoplasma y es un factor de transcripción en el núcleo. Las citocinas y los factores de crecimiento se unen a sus receptores afines y activan la familia JAK. Una vez activadas, las JAK fosforilan los sitios de acoplamiento en el dominio SH2 de las moléculas STAT. Después de la fosforilación, los STAT forman homodímeros o heterodímeros, que son transportados al núcleo donde regulan la expresión de genes (21). La activación de STAT6 se produce por la unión de IL-4 o IL-13 a sus receptores. Actualmente, se han descrito tres tipos de receptores.

El receptor de IL-4 tipo I está compuesto por la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-4 (IL-4R $\alpha$ ) y la cadena  $\gamma$  común ( $\gamma$ c). La cadena IL-4R $\alpha$  tiene una alta afinidad por IL-4, mientras que  $\gamma$ c es un componente de los receptores que se unen a IL-2 e IL-9. IL-4 se une a la cadena IL-4R $\alpha$ , lo que da como resultado la dimerización con la cadena  $\gamma$ c y la activación del receptor. El receptor de tipo II está compuesto por las cadenas de la variante 1 del receptor de IL-4R $\alpha$  e IL-13  $\alpha$  (IL-13R $\alpha$ 1), y es capaz de unirse tanto a IL-4 como a IL-13. IL-13 se une al monómero IL-13R $\alpha$ 1 con baja afinidad y requiere heterodimerización con IL-4R $\alpha$  para formar un enlace de alta afinidad. Este complejo recluta JAK y conduce a la activación posterior de STAT6 (22).

Además, IL-13 puede unirse a la cadena variante 2 del receptor  $\alpha$  de IL-13 (IL-13R $\alpha$ 2); este receptor es un monómero que se une a IL-13 con mayor afinidad que IL-13R $\alpha$ 1 y se expresa en células T, células B y células endoteliales. IL-13R $\alpha$ 2 se considera un receptor señuelo, ya que puede unirse a IL-13 y evitar que se una a IL-13R $\alpha$ 1 (23). Después de la estimulación del receptor de IL-4R $\alpha$ , JAK1-3 y la tirosina quinasa 2 (Tyk2) se fosforilan en las colas citoplasmáticas del receptor. Una vez activas, las JAK fosforilan los residuos de tirosina Y575, Y603 e Y631 en el receptor, generando sitios de acoplamiento para STAT6. Cuando los monómeros de STAT6 se fosforilan en la tirosina Y641, el C-terminal del dominio SH2 generalmente forma homodímeros (24) que se translocan al núcleo, donde pueden unirse al ADN y activar o reprimir genes diana (Figura 4).



**Figura 4.** Vía de señalización IL4/IL13/STAT6. La vía de señalización de STAT6 participa en diferentes procesos que pueden ser blancos terapéuticos en la terapia contra el CAC. Delgado-Raquiz YG.

## Papel de STAT6 durante el CAC.

Diversos autores han demostrado una asociación entre diferentes tipos de cáncer, la tumorigénesis y la vía de señalización de STAT6. STAT6 además orquesta numerosos procesos más allá de la respuesta inmune, incluida la proliferación de células cancerosas, la resistencia a la apoptosis, la metástasis, la función de las células epiteliales, la compactación de la cromatina y el daño o reparación del ADN (Tabla 1) (24).

Tabla 1. Papel de STAT6 durante el cáncer de colon.

<b>Sistema / proceso afectado</b>	<b>Mecanismo implicado</b>	<b>Primer autor, año (ref.)</b>
<b>Sistema inmunitario</b>	IL-4, IL-13, IL-4R e IL-13R receptores de la vía STAT6 se expresan diferencialmente en la mucosa colónica de pacientes con CCR según las tasas de metástasis y supervivencia.	Formentini et al, 2012 ( 25 )
	Las células T, los macrófagos y las células T asesinas naturales exhiben un aumento de la fosforilación de STAT6 durante el desarrollo de la colitis. Los ratones STAT6 - / - exhiben una secreción disminuida de IL-4, IL-5, IL-13 e interferón- $\gamma$ acompañada de una mejoría de la enfermedad.	Rosen et al, 2013 ( 26 )
	La señalización de STAT6 contribuye a la patogénesis de la colitis al inducir la activación de los mastocitos dependiente de células B.	Hoving et al, 2012 ( 27 )
	Los ratones STAT6 - / - exhiben una tumorigenicidad reducida asociada con una disminución de la inflamación y niveles bajos de ARNm de IL-17A y factor de necrosis tumoral- $\alpha$ en el modelo azoximetano / DSS de CAC.	Leon-Cabrera et al, 2017 ( 28 )
	STAT6 orquesta la proliferación de células epiteliales y la expansión de células supresoras derivadas de mieloides al disminuir la actividad citotóxica de las células T CD8 en un modelo de ratón de poliposis adenomatosa.	Jayakumar y Bothwell, 2017 ( 29 )
	El inhibidor específico de STAT6 AS1517499 disminuye el número de tumores y monocitos y granulocitos inflamatorios circulantes en el CAC experimental.	Leon-Cabrera et al, 2017 ( 28 )

<b>Apoptosis</b>	En la colitis inducida por DSS, la deficiencia de STAT6 altera la compactación de la cromatina con repercusiones directas en la apoptosis de las células epiteliales y el daño de las mucosas.	De Oliveira et al, 2019 ( 30 )
	La vía de señalización STAT6 dependiente de IL-4 favorece la expresión de proteínas antiapoptóticas y el crecimiento de células epiteliales en el cáncer de colon in vivo e in vitro.	Todaro et al, 2008 ( 31 )
	La activación anormal de IL-4 / STAT6 induce la expresión de survivina que, a su vez, aumenta la resistencia a la apoptosis en las células madre del cáncer de colon.	Di Stefano y otros, 2010 ( 32 )
<b>Células epiteliales</b>	La IL-13 impulsa la fosforilación de STAT6 y altera la función de barrera epitelial al aumentar la actividad de la claudina-2 en la colitis.	Rosen et al, 2013 ( 26 )
	La vía de señalización IL-13 / STAT6 desempeña un papel fundamental en la reducción de la expresión de matriptasa y prostasina, dos proteínas implicadas en la disfunción de la barrera epitelial.	Buzza et al, 2017 ( 33 )
	La administración de IL-13 aumenta la producción de serotonina colónica y la gravedad de la colitis en la colitis inducida por DSS.	Shajib y otros, 2013 ( 34 )
	La exposición de las líneas celulares HT29 y SW480 de cáncer de colon a IL-13 mejora la expresión del homeobox 1 de unión a caja E del dedo de zinc del factor promotor de EMT.	Cao et al, 2017 ( 35 )
	El factor de transcripción E2F 1 aumenta la expresión de STAT6 en líneas celulares de cáncer de colon que, a su vez, conduce a la expresión de controladores EMT en células CCR.	Chen et al, 2018 ( 36 )
	IL-4 citocina de la vía STAT6 regula a la baja la expresión de E-cadherina, alterando la adhesión célula-célula y favoreciendo la metástasis en el CCR.	Kanai et al, 2000 ( 37 )
	Los ratones STAT6 - / - con colitis murina aguda exhiben una cicatrización de heridas deteriorada y una baja expresión mucosa de ligandos Wnt, que son mediadores importantes en respuesta a la lesión epitelial.	Cosin-Roger et al, 2016 ( 38 )
<b>Proliferación</b>	Los ratones STAT6 - / - exhiben una expresión colónica reducida de ciclooxigenasa-2 y $\beta$ -catenina nuclear en el cáncer de colon inducido experimentalmente.	Leon-Cabrera et al, 2017 ( 28 )
	Los pacientes con CAC exhiben un cambio de pSTAT6 a pSTAT3 en las células inmunes epiteliales y mucosas del colon durante la transformación neoplásica.	Wick y col., 2012 ( 39 )

<b>Metástasis</b>	Los niveles altos de expresión de STAT6 coinciden con la metástasis en los ganglios linfáticos y las bajas tasas de supervivencia en pacientes con CCR.	Wang et al, 2010 ( 40 )
	La señalización de IL-13R $\alpha$ 2 que forma parte de la vía STAT6 favorece la expresión de 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2, una enzima clave involucrada en la metástasis hepática durante el desarrollo de CCR.	Jiang et al, 2016 ( 41 )
	La activación de PI3K, Akt y SRC en respuesta a IL-13 que forma parte de la vía de activación de STAT6 se asocia con niveles aumentados de IL-13R $\alpha$ 2 en células CCR altamente metastásicas.	Barderas et al, 2012 ( 42 )
<b>Daño en el ADN</b>	El aumento de la abundancia de la citocina IL-4 dependiente de STAT6 contribuye a la expresión de NADPH oxidasa 1 junto con la producción de especies reactivas de oxígeno en las células de cáncer de colon humano.	Liu et al, 2017 ( 43 )

CCR, cáncer colorrectal; CAC, cáncer asociado a colitis; DSS, dextrano sulfato sódico; EMT, transición epitelial a mesenquimal; IL-R, interleucina (receptor); pSTAT, transductor de señales fosforiladas y activador de la transcripción.

Se sabe que la vía de señalización de IL-4/STAT6 induce la expresión de SOCS3 en las células epiteliales intestinales. Los niveles elevados de SOCS3 en pacientes con colitis ulcerosa (CU) son indicativos de exacerbación de la enfermedad (44). Se ha demostrado que STAT6 se encuentra activo de manera constitutiva en varios tipos de cáncer como el de próstata (45), el linfoma cutáneo de células B y el linfoma de Hodgkin (46). Además, la señalización vía STAT6 se activa con frecuencia en las células malignas y regula varios genes cruciales para la respuesta inmune, la inflamación y la proliferación (21).

La activación persistente de STAT6 en diferentes tipos de cáncer da como resultado la proliferación, supervivencia y metástasis, así como una disminución de la inmunidad antitumoral (47). Se han identificado polimorfismos STAT6 en un subgrupo de pacientes malasio con enfermedad de Crohn (EC), así como en una cohorte de pacientes en Alemania (47-49), lo que demuestra la importancia de este gen que puede estar involucrado en los procesos inflamatorios del colon indicando que la señalización a través de STAT6 es clave en el proceso cancerígeno. La expresión del eje IL-4/IL-13/STAT6 constitutivamente activado durante la CU y la EC en tejidos de cáncer de colon, sugiere que esta vía puede contribuir a la patología subyacente de estas enfermedades. En un estudio previo, se

realizaron análisis de inmunohistoquímica para detectar STAT6 fosforilado (pSTAT6) en tejidos colónicos de sujetos pediátricos con CU o EC, y se demostró que el pSTAT6 nuclear estaba regulado positivamente de manera significativa en el epitelio colónico (50). De igual forma, la activación de

STAT6 inducida por IL-13 se ha implicado en la mediación de la cascada inflamatoria del huésped en la CU (50). En un modelo de ratón de CU inducida por oxazolona se demostró que la IL-13 es responsable de inducir la expresión de la proteína de unión estrecha formadora de poros claudina-2, aumentando la permeabilidad de la barrera epitelial y comprometiendo la función de la barrera gastrointestinal (51) (Figura 5). Aun así, no está claro si estos efectos son exclusivos de la colitis o aumentan el riesgo de desarrollar CCR.

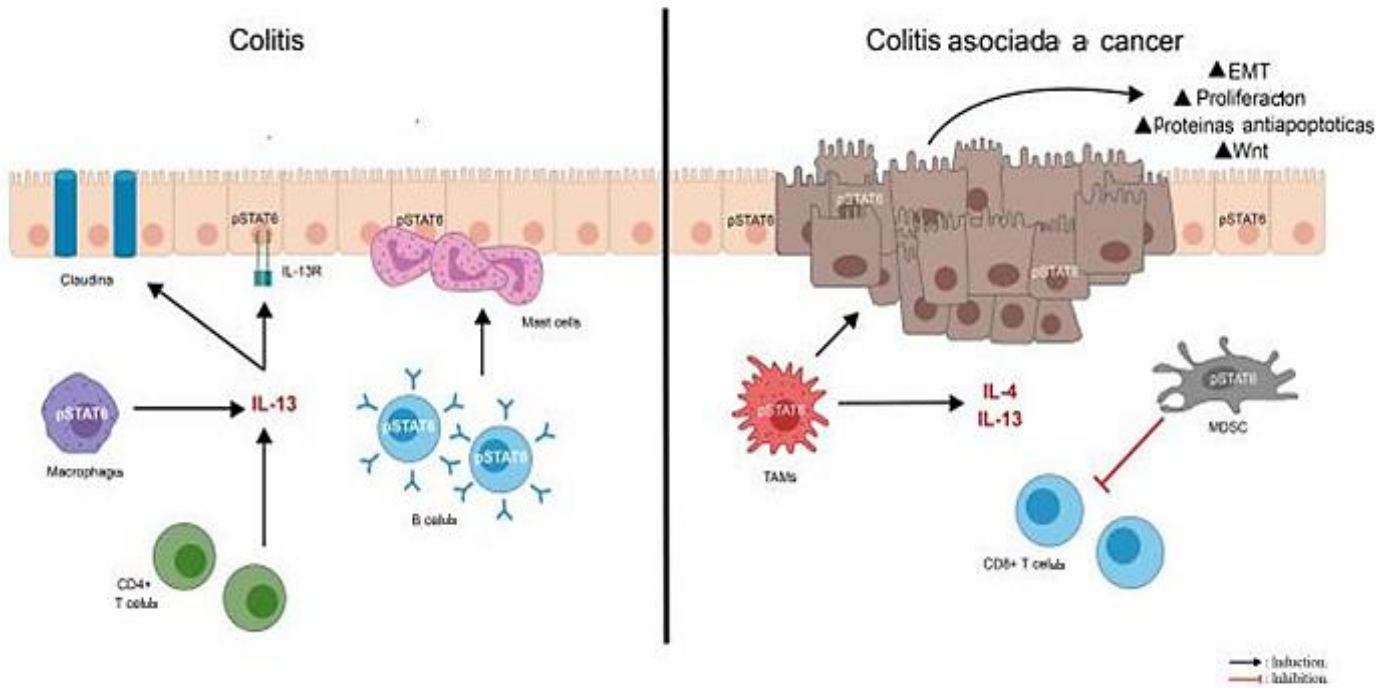


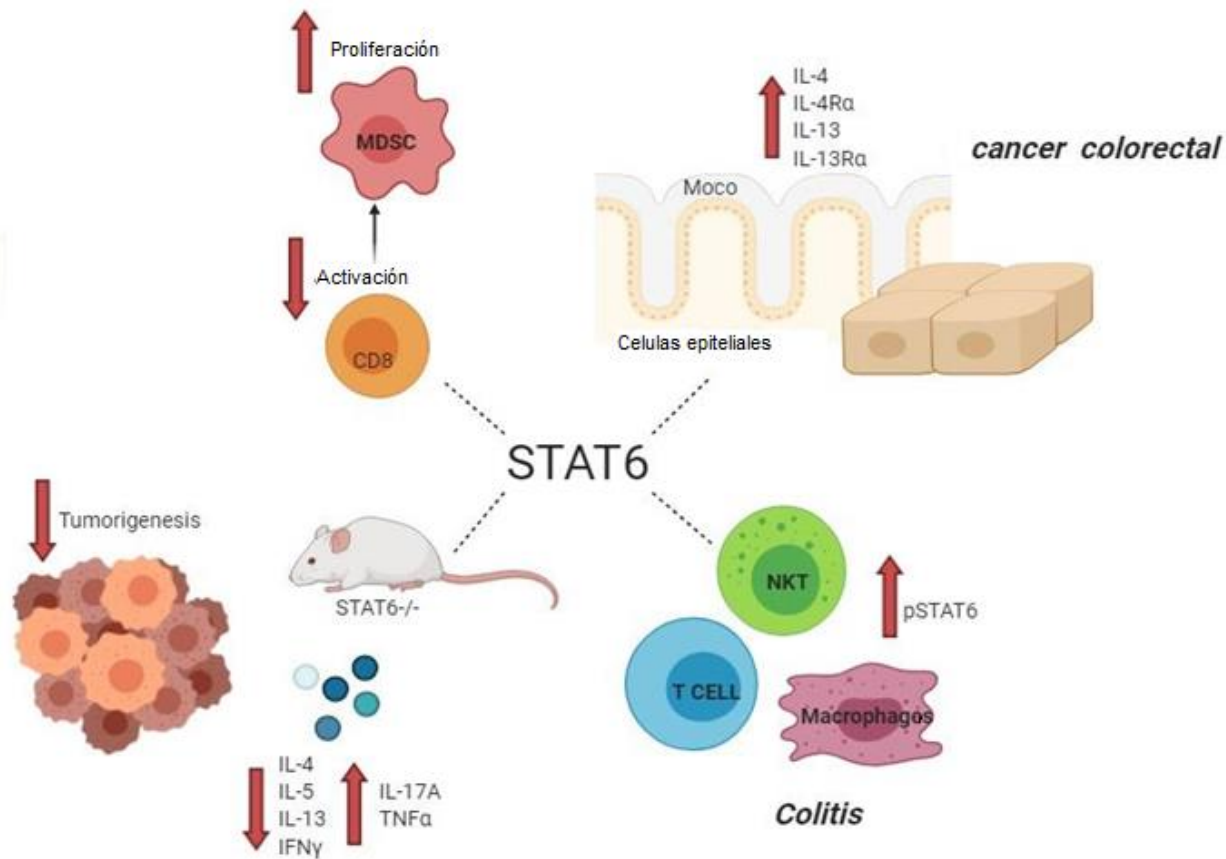
Figura 5: STAT6 modula las respuestas pro-colitis y pro-cáncer (Delgado-Ramírez. 2020)



Existe evidencia que indica que la inducción de CAC en ratones deficientes en STAT6 (STAT6<sup>-/-</sup>) en un modelo de azoximetano (AOM)/DSS resulta en una reducción de la tumorigenicidad, asociada con una reducción de la inflamación, una disminución de las concentraciones de ciclooxigenasa-2 (COX2) y de la proteína  $\beta$ -catenina nuclear en el colon, y una disminución en los niveles de expresión de ARNm de citocinas IL-17A y factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (25). También se ha reportado que la activación anormal de STAT6 puede contribuir a la patología del cáncer al aumentar la expresión de proteínas implicadas en la proliferación, migración e invasión. La vía de señalización IL-4/STAT6 aumenta la survivina nuclear en las células madre del CCR, lo que les permite evadir la muerte celular (28).

Además, se ha demostrado que el uso del inhibidor específico de STAT6 AS1517499 reduce la carga tumoral colónica y el número de monocitos y granulocitos inflamatorios circulantes en modelos experimentales de CAC (25). El número reducido de las células mencionadas anteriormente puede estar asociado con una menor infiltración de macrófagos y un crecimiento tumoral reducido. Las citocinas IL-4/IL-13, a través de la activación de STAT6, inducen la diferenciación de macrófagos infiltrantes a un fenotipo M2 con funciones protumorales. Se demostró que la inhibición farmacológica de STAT6 con AS1517499 atenúa el crecimiento tumoral y la metástasis hepática en un modelo de ratón con carcinoma mamario 4T1 ortotópico (52). Este resultado se asoció con una disminución en los macrófagos asociados a tumores que muestran el fenotipo M2, lo que sugiere que el bloqueo de IL-4 inhibe la angiogénesis y el crecimiento del tumor reprogramando los macrófagos a un fenotipo menos agresivo (53). Además, se demostró que la delección del gen STAT6 mejora la inmunidad antitumoral en el mismo modelo a través de una respuesta CD4<sup>+</sup> de tipo 1 (Figura 6) (54).





**Figura 6: STAT6 se relaciona con múltiples factores que se asocian al desarrollo y modulación del CAC. En esta imagen se observa cómo es que la vía de señalización participa de manera activa en la activación o desregulación de diversos procesos inmunes asociados con el CAC (Delgado-Ramírez. 2020)**

Por lo tanto, STAT6 es una molécula reguladora clave con funciones de proliferación de tumores que pueden ayudar a identificar dianas moleculares para el tratamiento del cáncer de colon. Sin embargo, la función y mecanismos específicos de la participación de STAT6 en el cáncer de colon aún no se conocen con claridad. El decremento en la respuesta inflamatoria a nivel local y sistémico durante las etapas tempranas del desarrollo del CAC en ausencia de STAT6 que culmina en una disminución en el desarrollo tumoral, sugiere que esta molécula es clave en la modulación de la respuesta inmune en el microambiente tumoral. Por lo tanto, son necesarios estudios que identifiquen y caractericen estas respuestas.

## **Células T reguladoras.**

Las células Tregs son linfocitos T CD4<sup>+</sup> que tienen un papel principal en la auto-tolerancia en las respuestas inmunes patológicas y fisiológicas contribuyendo a la homeostasis (55-56). Las células Tregs expresan constitutivamente el factor de transcripción Foxp3, que es necesario durante su desarrollo y para su función supresora, por tanto, Foxp3 es el regulador principal de las células Tregs (57). Los ratones y los seres humanos con una mutación en el gen Foxp3 presentan un trastorno inmunitario linfoproliferativo dependiente de células T que se manifiesta por algunas enfermedades, como diabetes tipo 1, tiroiditis, esplenomegalia y linfadenopatía (58,59). También expresan constitutivamente algunas moléculas asociadas a la activación de las células T: CD25, antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), GITR y gen 3 de activación de los linfocitos (LAG-3) (60).

Se han descrito algunos mecanismos de supresión utilizados por las células Tregs, que incluyen la privación de IL-2 por su receptor de alta afinidad de IL-2 (CD25) (61) el uso de ectoenzimas CD39 y CD73 para la liberación de adenosina extracelular, que es un potente inmunosupresor (62,63), la secreción de citocinas supresoras como IL-10 (64), TGF- $\beta$  (65,66) e IL-35 (67,68), la manipulación de las células presentadoras de antígenos induciendo un "fenotipo tolerante" CTLA-4 y LAG-3 para inducir la Indoleamina 2,3 -dioxigenasa (IDO), que a su vez reduce la disponibilidad de triptófano en el medio ambiente a lo largo de la vía quinurenina (69,70). En los seres humanos, también se ha informado de que las células Tregs utilizan granzima y moléculas similares a la perforina como mecanismo supresor modulación de la expresión de moléculas coestimuladoras (Figura 7) (71).

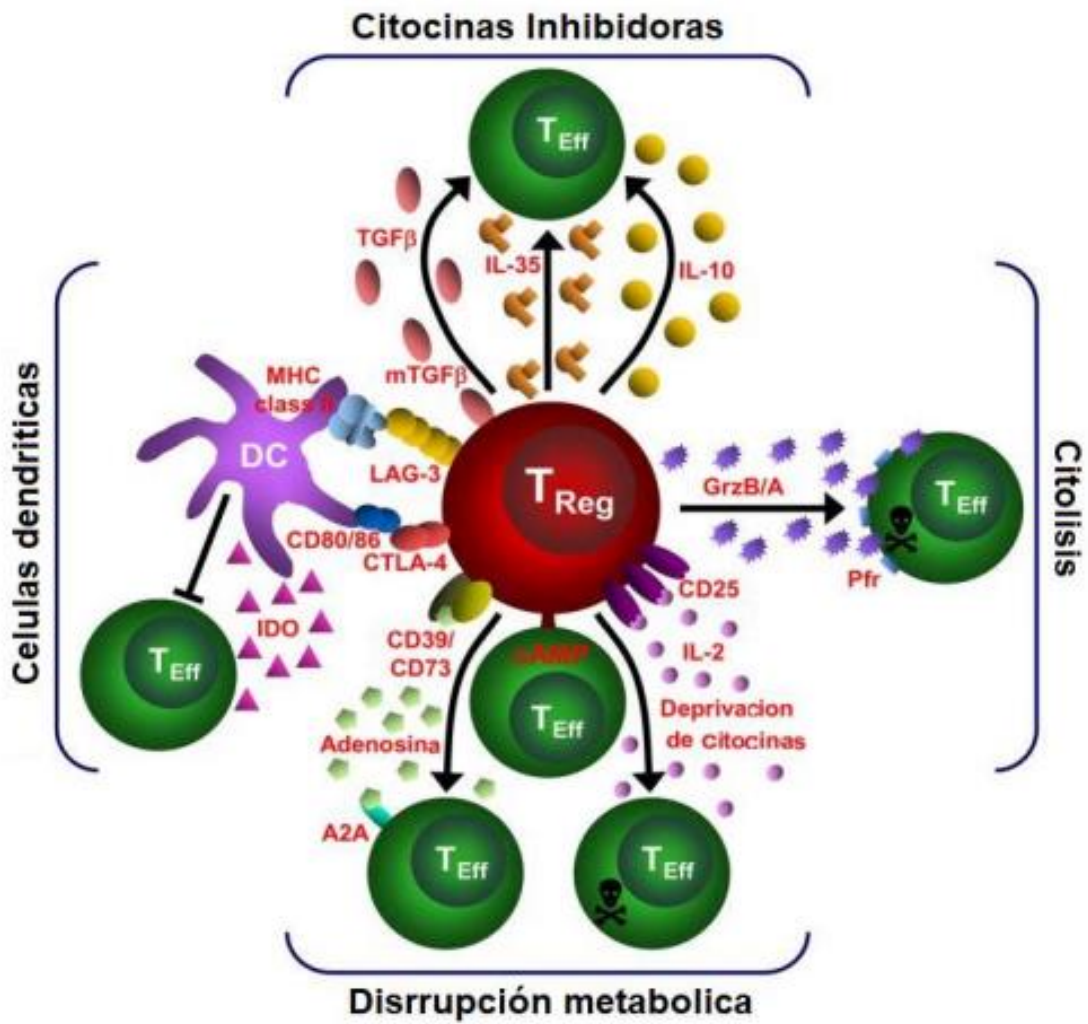


Figura 7: Tregs. Mecanismos básicos usados por los linfocitos T reguladores para la modulación de las respuestas inmunes efectoras. (Vignali 2008)

## **Participación de las células T reguladoras durante el cáncer de colon**

La infiltración de Tregs en el tejido canceroso se asocia con un peor pronóstico en muchos cánceres, incluido el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), el carcinoma de mama y el melanoma. Hay evidencias que indican que estas células se acumulan en respuesta a las citocinas y quimiocinas liberadas en el microambiente tumoral (TME) por células displásicas y que las células infiltrantes del estroma tumoral suprimen la actividad antitumoral mediada por los linfocitos T citotóxicos y CD8+ (72).

Sin embargo, el papel de los linfocitos T reguladores es diferente dependiendo del microambiente, un porcentaje elevado de Tregs entre los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) se asocia con el estadio tumoral y una perspectiva de supervivencia menor (73), aunque por otro lado, existen autores que han reportado que la infiltración de las células Tregs se asocia con un menor crecimiento tumoral, principalmente debido a su plasticidad fenotípica y el papel que desempeña el entorno inflamatorio particular inducido por bacterias que existe en el CCR, debido a que estas evidencias son opuestas, el papel que desempeñan estos linfocitos durante el desarrollo del CAC aún no está claro.

El papel de las Tregs en el CCR se complica aún más en el caso del CAC, en el que la inflamación crónica es el principal impulsor del inicio, la promoción y la progresión del tumor (74). La infiltración de células Tregs en el colon se ha correlacionado positivamente con metástasis en los ganglios linfáticos y un mayor grado de malignidad (75). Sin embargo, estudios recientes han encontrado que altas densidades de linfocitos T Foxp3 (+) intratumorales en una etapa anterior de CCR mostraron una correlación positiva con la supervivencia general (76-78), y distintas subpoblaciones de Foxp3 (+) Las células T contribuyen de formas opuestas a la determinación del pronóstico del CCR (79). En un modelo experimental de CAC, la frecuencia y la capacidad supresora de las células Tregs y la expresión de las moléculas de Tim-3, PD-1 y CD127 aumentaron en la etapa tardía de la CAC (80). Por el contrario, en la CAC temprana, se detectó un porcentaje reducido de células Tregs y una expresión disminuida de moléculas que se correlacionan con la supresión en la sangre y el bazo (81), lo que sugiere que las células Tregs podrían modificar su fenotipo dependiendo del grado de alteraciones en el CCR.

Un estudio demostró que la densidad de Tregs era mayor en la enfermedad localmente limitada que en la enfermedad metastásica, pero no se asoció con la supervivencia de los pacientes con CCR (82). Contrariamente a los hallazgos observados en la mayoría de los otros carcinomas humanos, en varios estudios con pacientes con CCR no se observó una relación significativa entre el número absoluto de linfocitos Tregs el pronóstico. Además, algunos otros estudios sugieren que una alta frecuencia de infiltración tumoral de Foxp3+ Tregs se asocia con un pronóstico favorable en el CCR (83).

También en modelos experimentales de CCR se demostró que la ablación de Tregs aumenta enormemente la respuesta inflamatoria, lo que resulta en una supervivencia significativamente menor, pero el agotamiento de Tregs en la fase tardía de la inflamación anula el crecimiento tumoral acompañado de una mayor frecuencia de CD8 + IFN $\gamma$  + GzmB + células T citotóxicas, que son los principales efectores de una respuesta antitumoral adaptativa. Esto se asocia con una reducción del tamaño y el número de tumores (84). Sin embargo, en la evaluación de estos experimentos el diseño experimental solo se centró en la fase final del CCR y excluyó el posible papel de las células Tregs durante el desarrollo del CCR.

### **Antecedentes directos entre STAT6 y los linfocitos T reguladores.**

Para que el desarrollo y la función de las Tregs se lleven a cabo intervienen múltiples factores, entre ellos, la regulación del gen Foxp3. La región reguladora específica de células Tregs (TSDR), se encuentra totalmente desmetilada en Tregs y metilada en células T efectoras, sin embargo, los componentes que intervienen en este proceso aún no se encuentran plenamente identificados. Algunos estudios señalan que STAT6 podría regular la actividad de las Tregs a través de una interacción directa con el factor de transcripción Foxp3 (47). Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina identificaron una región silenciadora en el transcrito de Foxp3 con un sitio de unión específico para STAT6, que impide la expresión del ARNm de Foxp3 (48). Adicionalmente, IL-4, una citocina que activa a STAT6, es considerada como un supresor importante de la inducción de Foxp3 (49). En un modelo de enfermedad alérgica, se demostró que ratones STAT6<sup>-/-</sup> presentan un número elevado de células Tregs en los pulmones y en el bazo en comparación con los animales silvestres, asociado a una menor respuesta alérgica (50)

Adicionalmente, se demostró que ratones que expresan una forma activa de STAT6 tienen un número reducido de células T (85). De hecho, en un modelo de ratones transgénicos en sus TCR, la ausencia de STAT6 perjudicó la generación de células Foxp3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> específicas de antígeno, lo que indica el papel de la vía STAT6 en la inducción de la expresión de Foxp3 (86). Por lo tanto, STAT6 podría desempeñar un papel fundamental en la regulación de la función de las células Tregs.

En nuestro grupo de trabajo, al utilizar un modelo experimental de CAC que presenta semejanzas al cáncer esporádico que se desarrolla en humanos, determinamos que el 70% de los animales deficientes en STAT6 (STAT6<sup>-/-</sup>) no desarrollan tumores en comparación a los animales silvestres, en donde el 100% presenta crecimiento tumoral en la zona media y distal del colon (24). La inhibición de la progresión tumoral durante la deficiencia de STAT6 se asoció a un decremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias en el colon, una disminución en el infiltrado leucocitario y en el porcentaje de los monocitos inflamatorios circulantes, acompañado de un incremento en la apoptosis y una baja en la proliferación de las células epiteliales en comparación con los animales silvestres.

Estos datos sugieren que STAT6 participa en mecanismos inmunorreguladores implicados en la progresión del CAC. Adicionalmente, el uso del inhibidor farmacológico de STAT6 AS1517499 en este modelo experimental redujo la carga tumoral, los signos de la enfermedad y la expresión de citocinas proinflamatorias, en correlación con la disminución de la fosforilación de STAT6 en el intestino (24).

Por lo tanto, en este proyecto evaluamos si la disminución en el desarrollo tumoral observada en ausencia de STAT6 está relacionada con cambios en el reclutamiento o la actividad de las células Tregs en el del desarrollo del CAC, ya que esta población celular cumple un rol fundamental en la homeóstasis de la mucosa intestinal.

## **Hipótesis**

La ausencia de STAT6 limita el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis (CAC), al favorecer una mayor frecuencia y reclutamiento de células Tregs capaces de contener la inflamación en las primeras etapas de la carcinogénesis.

## **Objetivo general**

Determinar si la disminución de la carga tumoral en ausencia de STAT6 se debe a cambios en el reclutamiento y/o actividad de las células Tregs capaces de modular la respuesta inmune intestinal durante el desarrollo del CAC.

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar cambios en la progresión tumoral en etapas tempranas y tardías del CAC en ratones STAT6<sup>-/-</sup> y WT.
2. Demostrar si STAT6 es un mecanismo que participa en cambios en la frecuencia y reclutamiento de células Tregs durante el CAC
3. Analizar si la ausencia de STAT6 modifica la expresión y localización de Foxp3 y otros marcadores asociados con la actividad supresora de células Tregs durante el transcurso del CAC
4. Analizar si las células Tregs controlan la respuesta inmune exacerbada durante las primeras etapas del CAC en dependencia de STAT6 mediante ensayos de depleción



## Materiales y Métodos

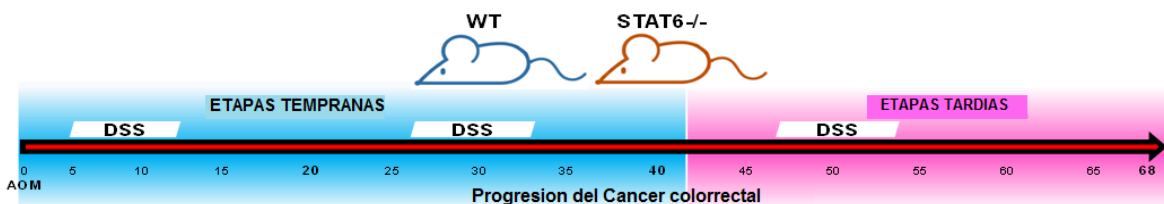
### Ratones

Para el diseño del experimento se utilizaron ratones hembra de cepa BALB/c (WT) y BALB/c deficientes en STAT6 (STAT6<sup>-/-</sup>) de ocho a 10 semanas de edad. Se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I). Los animales se alimentaron con Purina Diet 5015 y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales fueron en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud (USA.) Y fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentos con Animales de la FES-I (UNAM).

### Inducción CAC

Los ratones recibieron una inyección intraperitoneal (ip) de 12,5 mg/kg de azoximetano (AOM) (Sigma, Santa Cruz, CA, USA.). Cinco días después, se administró dextrano sulfato sódico al 2% (DSS, PM: 40000, (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA.) en agua potable *ad libitum* durante 7 días.

A continuación, se proporcionó a los ratones agua regular durante 14 días y se sometieron a dos ciclos más de DSS. Para examinar las etapas transformadoras tempranas y tardías en CAC, los ratones se sacrificaron el día 20 y el día 40 (desarrollo temprano del tumor) y el día 68 o el día 77 (desarrollo tardío del tumor) después de la inyección de AOM. A lo largo del experimento, se controló semanalmente a los ratones el peso corporal, la consistencia de las heces o diarrea y la presencia de sangre en el recto o las heces.



**Figura 8:** Esquema de administración de AOM/DSS en ratones BALB/c y STAT6<sup>-/-</sup>. Los ciclos consisten en una semana de DSS en el agua para beber, seguido de dos semanas de agua regular (estéril).

## Valoración y progresión del desarrollo de CAC

Se evaluó el índice de actividad de la enfermedad (IAE) siguiendo los criterios establecidos por Dae-Sung et al. (2013). Este índice sirve para determinar de manera fiable la severidad de la UC durante el tratamiento con AOM/DSS. Para esto se llevó a cabo un registro de los cambios en el peso, consistencia de las heces y sangrado rectal (Figura 7).

Se monitoreó semanalmente la pérdida o ganancia de peso por ratón de cada uno de los grupos, y registrando observaciones de sangrado y heces, finalmente se calculó el índice de la actividad de la enfermedad (IAE) utilizando los siguientes criterios:

IAE	Perdida de peso	IAE	Heces	IAE	Sangrado
0	Sin perdida	0	Normales	0	Sin sangrado
1	1-5%	2	Suaves	1	Sangre oculta (Irrigación)
2	6-10%	4	Diarrea	2	Sangre oculta con cambio de coloración
3	11-15%			3	Sangre visible en heces sin coágulos
4	>15%			4	Sangrado grave, y coagulación

## Sacrificio de animales

Durante el sacrificio se utilizó CO<sub>2</sub> para realizar la eutanasia cumpliendo con el procedimiento aprobado por la NOM-062-ZOO-1999, posteriormente se utilizó etanol para remojar el pelo de los animales y evitar la contaminación del contenido abdominal durante la extracción del colon.

Usando pinzas de disección, se tomó la línea media del abdomen donde se realizó una pequeña incisión para exponer el peritoneo, se extendió la incisión a cada lado y largo del abdomen, hasta el borde costal. Usando tijeras de disección se extrajo el colon completo y el bazo.

## Análisis macroscópico

El colon obtenido se mantuvo en hielo en todo el proceso de examinación macroscópico. Se hizo un lavado con buffer fosfato salino (PBS). Se registró la longitud y el peso de cada uno e inmediatamente después, cada colon se abrió longitudinalmente y se analizó cuidadosamente para examinar la presencia

o ausencia de tumores. Con ayuda de un microscopio estereoscopio se determinó el número, tamaño y localización de los tumores. Posteriormente se tomaron dos biopsias de la zona distal del colon de 0.5 cm c/u, una para análisis histológico y la otra se conservó en Trizol a -70°C para la extracción del material genético.

### **Análisis histológico**

Las secciones longitudinales del colon se fijaron en alcohol absoluto inmediatamente de acuerdo con los protocolos descritos anteriormente (25). Se llevó a cabo una tinción de colon con un grosor de 5 µm con hematoxilina y eosina (H&E) para visualizar la morfología y posteriormente evaluar los cambios inflamatorios en 10 secciones de cada muestra.

### **Inmunohistoquímica**

Inicialmente se desparafinaron los cortes por medio de 2 baños de xilol (3 min c/u). Posteriormente se hidrataron los cortes en baños decrecientes de alcohol (100% y 96%, 3 min c/u) y se lavaron los tejidos con agua destilada (3 min). Consecutivamente se llevó a cabo la recuperación antigénica en una olla de presión pre calentada, y en un vaso se agregó buffer de citratos (DIVA) con las láminas a tratar (30min), una vez que paso el tiempo de recuperación antigénica se sacó el vaso y se dejó enfriar el buffer de citratos a temperatura ambiente para evitar el choque térmico y el daño al tejido. Nuevamente se lavaron, cambiando la solución por PBS-Tween, se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol (10 min), se lavaron con PBS-Tween, y se llevaron a bloqueó con PBS-BSA 2% (1 hora) para lavar de nuevo con PBS-Tween.

Posteriormente se agregó el anticuerpo primario durante la noche a 4°C con Foxp3 GeneTex, Irvine, CA, USA (Dilución 1:100 / 200 ml por lámina) disuelto en buffer de bloqueo BioCare Medicals Background Sniper cubiertos con Parafilm para evitar la desecación de la muestra, para volver a lavar con PBS-Tween y agregar el anticuerpo secundario HRP (1:1000) (30 min) y de nuevo un lavado con PBS-Tween.

La cuantificación de las células Foxp3(+) se realizó utilizando el software ImageJ v.1.48 contando las células en 10 campos de alta potencia, con al menos tres portaobjetos por animal.

## **Citometría de flujo**

**Bazo:** Se obtuvieron esplenocitos en suspensiones celulares de cada uno de los bazos conseguidos durante el sacrificio de cada ratón, con ellos se procedió a realizar un protocolo de tinción extracelular para los marcadores de CD4, CD8, CD25 y TGF- $\beta$ .

Primero se lisaron las células con 3 ml de solución hemolizante por 10 min y se lavaron (1ml buffer de FACS y centrifugar 10 min x 1500rpm eliminando el sobrenadante), después se incubaron con anticuerpos (30 min a 4°C, en la oscuridad). Inmediatamente después, las células se lavaron de nuevo para eliminar el anticuerpo sobrante.

Para la tinción intracelular de Foxp3 e IL-10 fue necesario añadirle un protocolo de permeabilización celular. Para ello, primero se realizó la fijación de las células que ya contenían los marcadores extracelulares utilizando un buffer de fijación (FOXP3 Fix/Perm Buffer Set BioLeg-end, San Diego, CA, USA) en una dilución 1:4 por 500 $\mu$ l en cada muestra durante 30 minutos, consecutivamente se a realizar la permeabilización siguiendo las instrucciones del fabricante empleando el buffer de permeabilización (FOXP3 Fix/Perm Buffer Set (BioLeg-end, San Diego, CA, USA) en una dilución 1:10 por 500 $\mu$ l en cada muestra durante 2 hrs, se lavaron e inmediatamente se incubaron con los anticuerpos intracelulares diluidos en más buffer de permeabilización en una dilución 1:100 (30 min a 4°C, en la oscuridad). Inmediatamente después, las células se lavaron de nuevo para eliminar el anticuerpo sobrante y por último se resuspendieron en 300 $\mu$ l de FACS para su posterior lectura.

**Sangre:** Se obtuvieron muestras de sangre de cada uno de los animales (50 $\mu$ l) y se procedió a realizar el mismo protocolo de tinción de citometría extracelular/intracelular que se hizo con los esplenocitos.

Las células se analizaron en un citómetro de flujo Attune™ NxT (ThermoFisher Scientific). Los datos de flujo se analizaron utilizando un software de análisis de citometría de flujo (FlowJo; Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

## Anticuerpos

<b>Nombre</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Marca</b>
<b>CD4</b>	APC	0.1 $\mu$ l	BioLeg-end, San Diego, CA, USA
<b>CD8</b>	VB605	0.3 $\mu$ l	BioLeg-end, San Diego, CA, USA
<b>CD25</b>	VB711	1 $\mu$ l	BioLeg-end, San Diego, CA, USA
<b>Foxp3</b>	AF488	1 $\mu$ l	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
<b>Foxp3</b>	Purificado	1/100	GeneTex, Irvine, CA, USA
<b>LAP (TGF-<math>\beta</math>)</b>	PE	0.5 $\mu$ l	BD Biosciences, San José, CA, USA
<b>IL-10</b>	AF	0.5 $\mu$ l	BD Biosciences, San José, CA, USA

## Extracción de ARN y RT-PCR

Los tejidos se obtuvieron y procesaron como se describió anteriormente (47). El ARN se purificó usando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) Siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó un microgramo de ARN para la síntesis de ADNc de primera hebra con el kit de síntesis de ADNc de primera hebra RevertAid H Minus (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

Se utilizó un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch (Bio-Rad, Ciudad de México, México) y una mezcla maestra SYBR Select para CFX (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) Para el análisis cuantitativo de RT-PCR en tiempo real. Los niveles de expresión relativa para un gen diana fueron normalizados por GAPDH.

Las secuencias de cebadores utilizadas en el análisis de qRT-PCR son:

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tm</b>
<b>GAPDH Forward</b>	TCACGCCACAGTTTCCCGGAG	58°C
<b>GAPDH Reverse</b>	CCTCAAGATCAGCAATGCCT	58°C
<b>Foxp3 Forward</b>	CCTTCTCCAGGACAGA	60°C
<b>Foxp3 Reverse</b>	GATCATGGCTGGGTTGT	60°C
<b>IL-10 Forward</b>	TGCTGCCTGCTCTTACTGAC	60°C
<b>IL-10 Reverse</b>	GGGGCATCACTTCTACCAGG	60°C
<b>TGF-<math>\beta</math> Forward</b>	GCCCTTCCTGCTCCTCAT	58°C
<b>TGF-<math>\beta</math> Reverse</b>	TTGGCATGGTAGCCCTTG	58°C

### **Depleción de T reguladoras**

Se inyectaron intraperitoneal (ip) ratones WT y STAT6<sup>-/-</sup> con 200  $\mu$ g/ratón de InVivoMAb anti-CD25 de ratón (IL-2R $\alpha$ ) (clon PC-61.5.3) (BioXcell, West Lebanon, NH, USA) En 200  $\mu$ L de PBS en los días 10 y 15 después de la administración de AOM/DSS, por lo que se trabajaron los grupos finales: WT CTR, WT CAC, WT PC61, STAT6<sup>-/-</sup> CTR, STAT6<sup>-/-</sup>-CAC, STAT6<sup>-/-</sup>-PC61. La inducción y progresión de CAC se analizaron como se menciona en la sección de inducción de CAC.

### **Análisis estadístico**

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey o pruebas t de dos vías no emparejadas, según el número de grupos que usaban GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA). Todas las pruebas estadísticas se realizaron considerando intervalos de confianza del 95%. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SEM  
 \* = p <0,05, \*\* = p <0,01

## **RESULTADOS**

En este trabajo, se buscó determinar si la disminución en el desarrollo tumoral observada en ausencia de STAT6 está relacionada con cambios en el reclutamiento y presencia de las células Tregs. Las Tregs tienen funciones supresoras que intervienen en la evolución y control de los tumores malignos. Sin embargo, el microambiente durante el inicio y establecimiento del CAC es sumamente heterogéneo, la respuesta inmune anticancer puede coexistir con la inflamación que promueve el desarrollo tumoral. Por lo tanto, aún no se ha podido describir con exactitud el papel que juegan las células Tregs durante las etapas iniciales del CAC y sobre todo su participación concreta durante una transición que parte de un proceso de colitis, hasta culminar en cáncer. Nosotros nos propusimos a abordar esta interrogante y para examinar este papel *in vivo* utilizamos un modelo experimental de CAC que ya ha sido establecido previamente (87).

### **Los animales con deficiencia de STAT6 son menos susceptibles al desarrollo CAC inducido por AOM/DSS.**

Dentro de nuestro grupo de investigación, previamente, determinamos el papel de STAT6 en el desarrollo de CAC utilizando el modelo de azoximetano (AOM)/dextran sulfato de sodio (DSS) y hemos establecido unos parámetros de apreciación de la progresión del CAC evaluando las condiciones desde las etapas iniciales o “tempranas” a los días 20 y 40 después de iniciado el tratamiento con AOM y DSS (Explicado en materiales y métodos), así como también al día 68 valorando los parámetros de etapa avanzada o “tardía”. Este proceso se lleva a cabo en animales con fondo genético BALB/c como nuestra cepa control y también en animales con fondo genético BALB/c, pero deficientes específicamente en la vía de señalización de STAT6 siguiendo el siguiente protocolo de administración.

Es conocido que la cepa de ratones STAT6<sup>-/-</sup> es resistente al desarrollo de cáncer CAC inducido por el modelo experimental de AOM/DSS (28), sin embargo, como se menciona anteriormente, los mecanismos asociados a la respuesta inmune involucrada aún no se han estudiado ampliamente, por lo que primero, se evaluó la progresión de CAC en ratones WT y STAT6<sup>-/-</sup>, monitoreando el cambio en el peso corporal, la consistencia de las heces y por último el desarrollo tumoral.

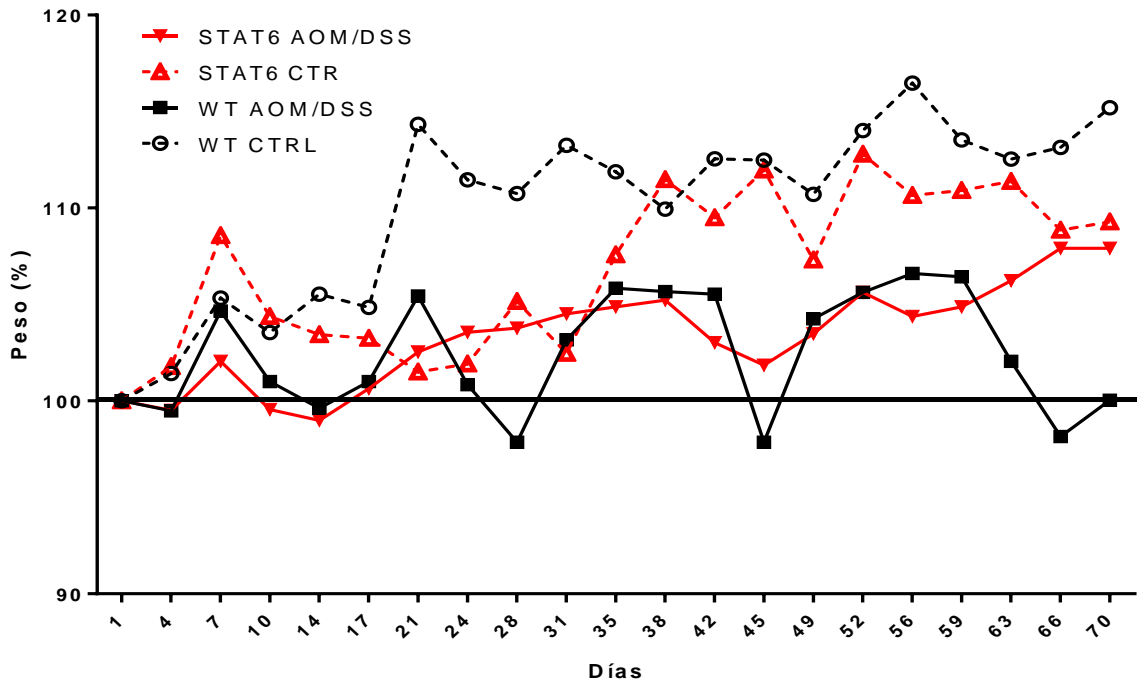
Como esperábamos, durante el curso de la administración de AOM/DSS, los ratones WT perdieron peso en comparación con el peso de la línea de control WT. Sin embargo, los animales STAT6<sup>-/-</sup> tuvieron un aumento de peso progresivo que al finalizar el tratamiento con AOM/DSS no fue significativamente afectado, sin embargo, con respecto a su control WT si se observó un cambio de aumento de peso significativo a lo largo de todo el tratamiento. (Figura 9.A).

Así mismo, los ratones WT tratados mostraron rápidamente piloerección y signos clínicos de la enfermedad (IAE) durante todo el experimento, mientras que los animales STAT6<sup>-/-</sup> no tuvieron diarrea o sangrado rectal (Signos asociados al IAE) durante todo el curso del tratamiento (Figura 9.B).

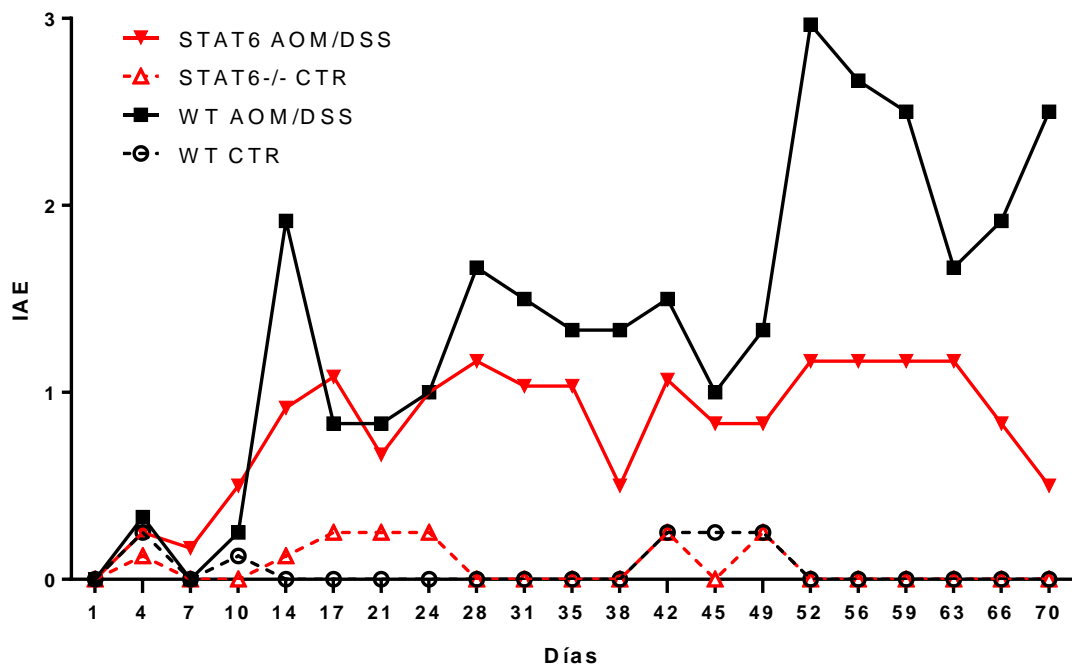
Los ratones WT también mostraron como era esperado, las características propias del desarrollo de CAC, exhibieron tumores polipoides rojizos en las zonas medial y distal del colon, daño macroscópico y alteraciones patológicas mayores a los ratones deficientes en STAT6 que no presentaron este desarrollo tumoral después de la administración de AOM/DSS (Figura 9.C). De igual forma, los ratones WT mostraron un mayor número de tumores, así como un aumento de la carga tumoral en el día 68 (9,6 vs 2,4), mientras que solo el 30% de los animales STAT6<sup>-/-</sup> desarrollaron tumores, y eran escasos (0,6 vs 1,3,  $p < 0.05$ ) (Figura 9.D). Estos resultados comprueban que la deficiencia de STAT6 disminuye la promoción del tumor durante el desarrollo de CAC inducida por AOM/DSS.

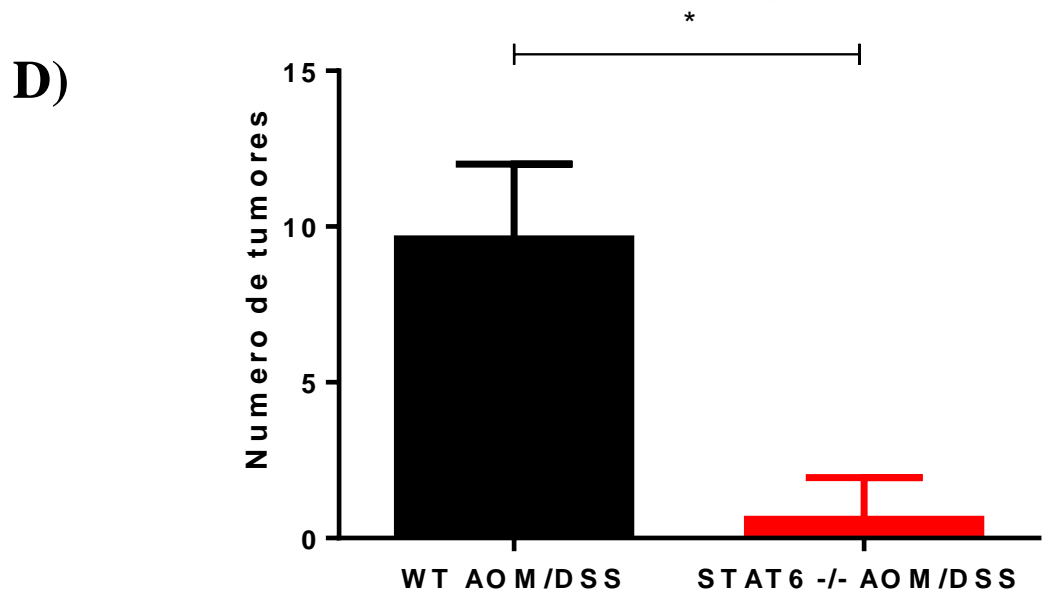
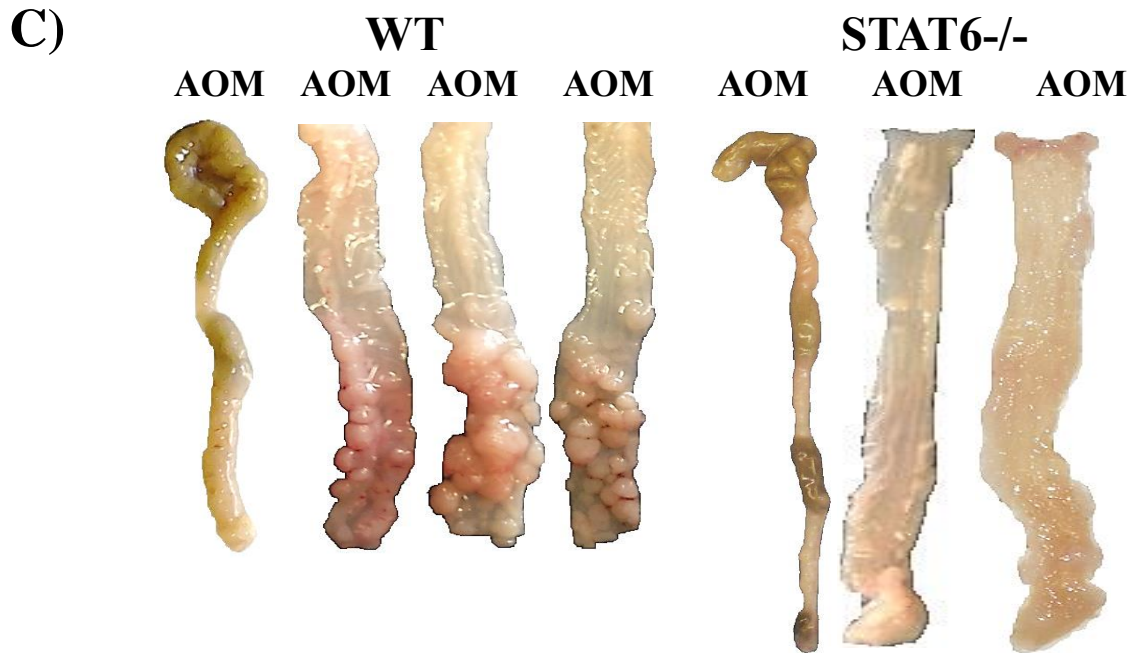


A)



B)





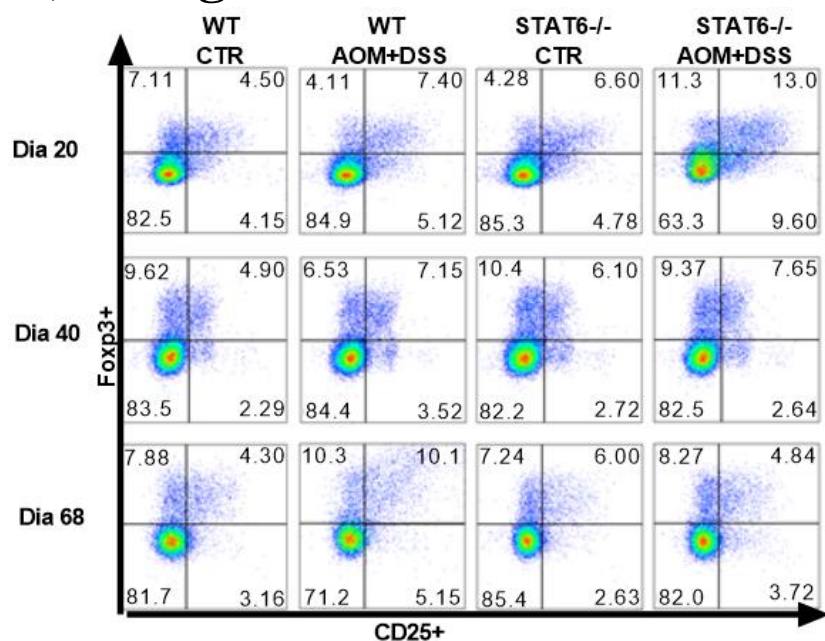
**FIGURA 9:** La deficiencia de STAT6 en los animales tratados con AOM/DSS le confiere resistencia al desarrollo tumoral. La progresión de CAC se observó durante 77 días. Cambios en la ganancia de peso asociados al desarrollo del CAC durante la administración de AOM/DSS a animales WT y STAT6<sup>-/-</sup> (A), el índice de actividad de la enfermedad (IAE) (B), fotografías representativas del colon mostrando aspectos macroscópicos (C) y número de tumores (D) al día 77, después de la administración de AOM/DSS. Los datos corresponden a 6 animales por grupo y representan el promedio ±SEM Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . Se muestran resultados obtenidos de tres experimentos independientes.

## **Los animales deficientes en STAT6 presentan un aumento en la frecuencia de células CD4+CD25+Foxp3+ durante las etapas tempranas del desarrollo del CAC**

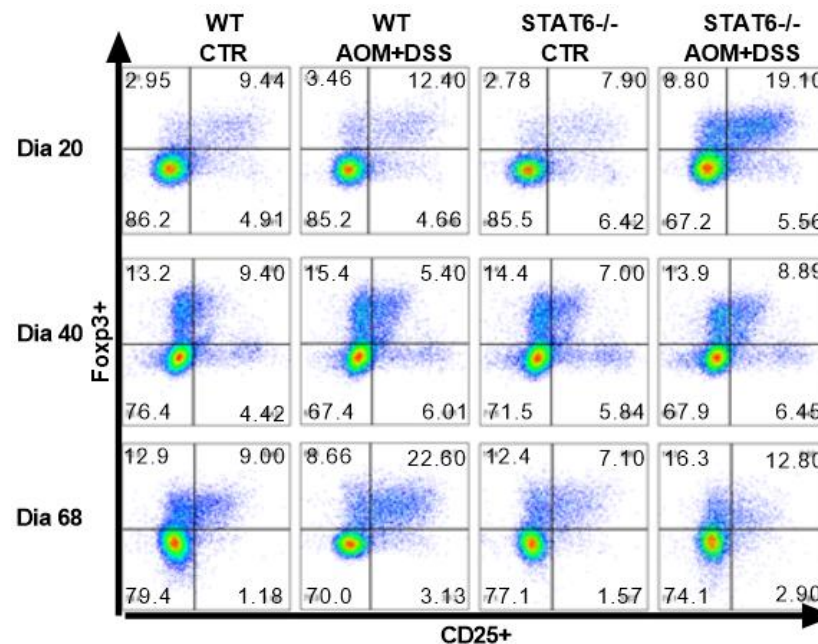
Una vez confirmada la baja susceptibilidad al desarrollo de CAC en ausencia de STAT6<sup>-/-</sup> y con el fin de esclarecer la interrogante sobre la participación de las Tregs analizamos la cinética de estas células mediante la expresión de los marcadores CD4 + CD25 + Foxp3 + en los días 20, día 40 y día 68 después de la inyección de AOM mediante citometría de flujo en sangre y células de bazo con el fin de obtener una evaluación de la actividad sistémica de estas células en todos los ratones a lo largo del desarrollo de CAC (Figura 10).

Se encontró que en los animales WT AOM/DSS, las células Tregs se mantuvieron en un nivel de frecuencia similar a la observada en los animales de control tanto en la sangre como en el bazo al día 20 y el día 40. Sin embargo, se observó un aumento significativo en la frecuencia de células Tregs al día 68 en comparación con el grupo control y los animales STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS (9.44 - 0.1 vs. 19.85 - 3.8,  $p < 0.05$ ; 12.7 - 0.1 vs. 19.85 - 3.8,  $p < 0.05$ ) lo cual es consistente con el desarrollo tumoral. Por el contrario, se determinó un aumento significativo en la frecuencia de Tregs en la sangre y el bazo de animales STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS en el día 20 (etapas tempranas de desarrollo del tumor), en comparación con el control y los ratones WT AOM/DSS (17.5 - 1 vs. 9.44 - 0.1,  $p < 0.05$ ; 17.5 - 1 vs. 9.8 - 3.3,  $p < 0.05$ ). No hubo diferencias en la frecuencia de las células Tregs entre STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS, WT AOM/DSS y los ratones de control en el día 40. Sin embargo, al día 68 (etapas avanzadas del desarrollo tumoral), la frecuencia de las células Tregs disminuyó en los ratones STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS similares al grupo control lo que es consistente con el hecho de encontrar una menor carga tumoral.

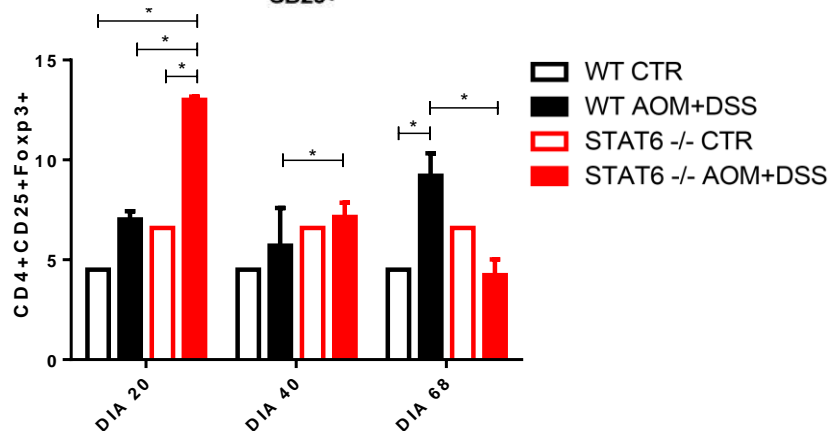
### A) Sangre:



### B) Bazo:



### C)



### D)

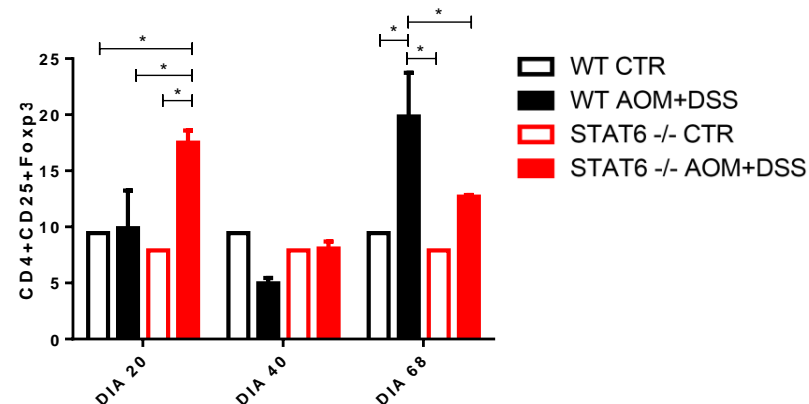
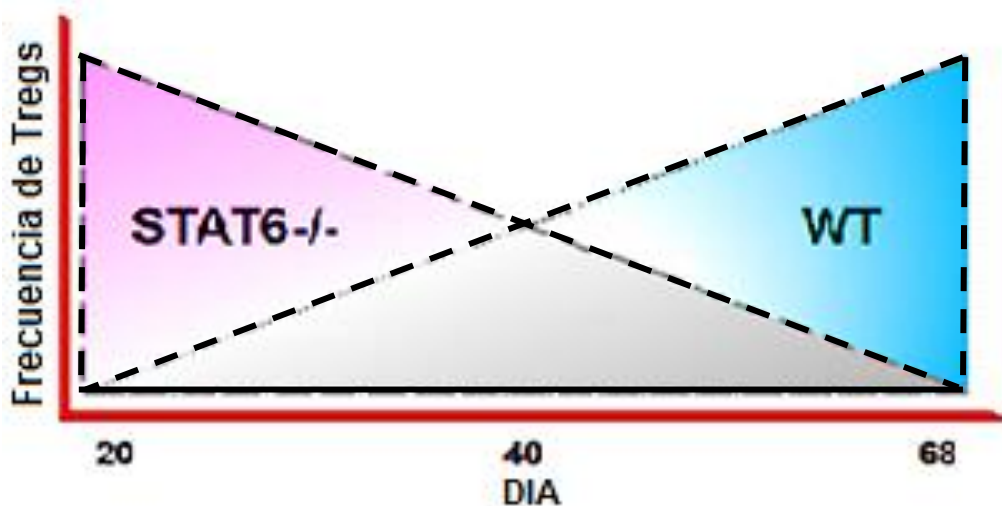


FIGURA 10: Los animales STAT6<sup>-/-</sup> muestran el doble del porcentaje de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> durante la fase inicial de administración de AOM/DSS. Las células circulantes y del bazo se obtuvieron de los ratones WT o STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS tratados o de control en los intervalos de tiempo indicados y se analizaron para la expresión de Foxp3 y CD25 en poblaciones de células CD4<sup>+</sup> vivas mediante citometría de flujo. Gráficos de puntos representativos en sangre total (A) y en esplenocitos (B). Frecuencias de las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en la sangre (C) y esplenocitos (D). Los datos se expresan como la media SEM y son representativos de dos experimentos independientes con al menos tres ratones por grupo por día de análisis. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

De manera interesante, al día 20, durante las etapas tempranas del desarrollo del CAC, en los ratones del grupo WT AOM/DSS se registró un 9,8% de células CD4+Foxp3+CD25+. Por el contrario, los ratones STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS alcanzaron el 17,5% en este grupo celular. Al día 68, en etapas avanzadas de la tumorigénesis, el porcentaje de células Tregs aumentó significativamente en los ratones WT AOM/DSS (19,85%) pero no se incrementó en el grupo STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS (12,7%), coincidiendo con la inhibición del desarrollo tumoral en ausencia de STAT6.

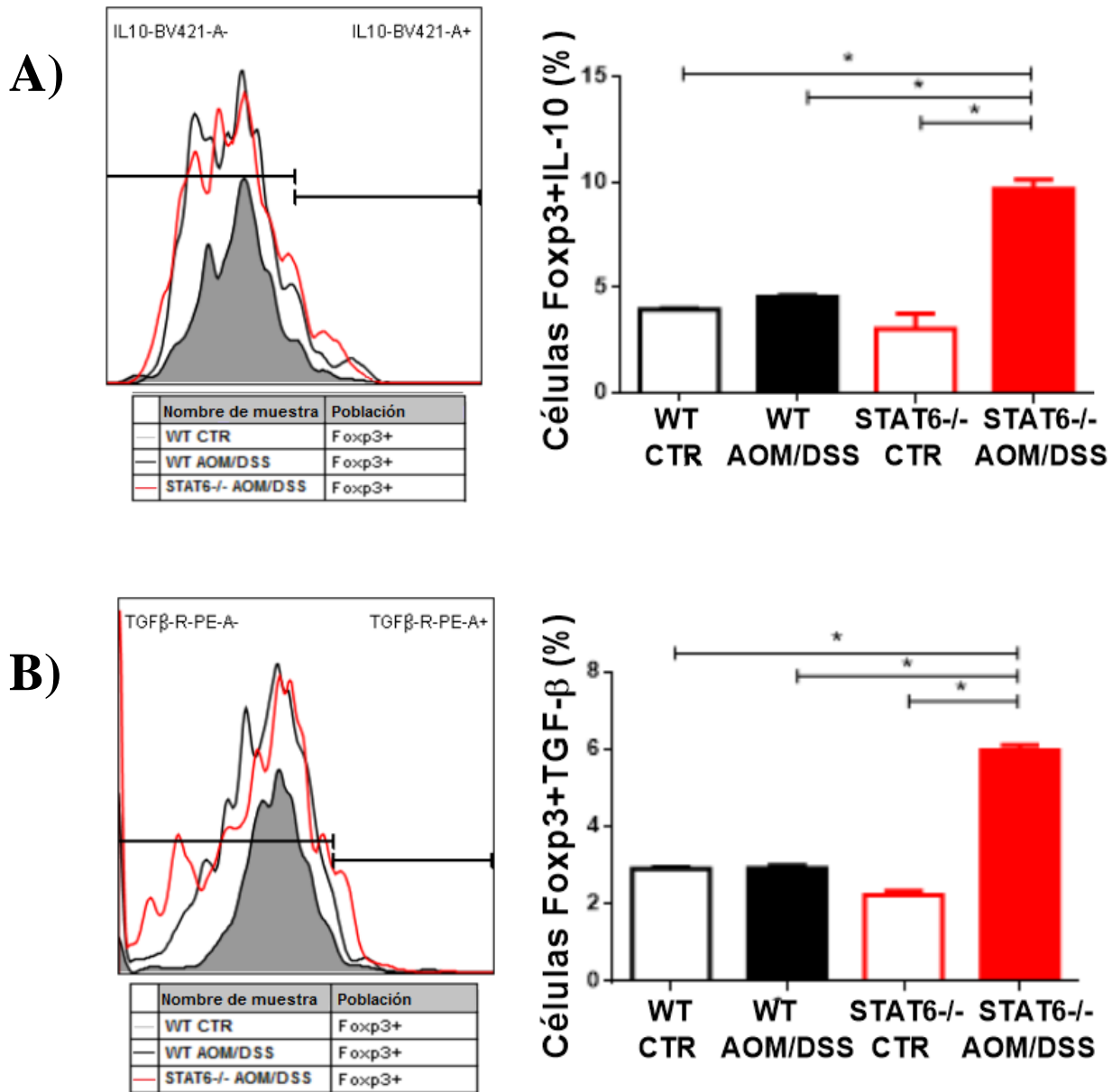
Estos datos sugieren, que STAT6 influye en la dinámica de las células Tregs (CD4+CD25+Foxp3+) (Figura 11). La deficiencia de STAT6 favorece un incremento de las células Tregs en las etapas iniciales del desarrollo del CAC, estas células podrían suprimir respuestas inflamatorias exacerbadas capaces de promover la transición colitis-cáncer.



**FIGURA 11:** Frecuencia inversa de las células Tregs (CD4+CD25+Foxp3+) en los animales tratados con WT o STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS durante la progresión colitis- CAC. Aquí se demuestra que hay una correlación inversa entre la participación de Tregs con la presencia o ausencia de la vía STAT6.

**La ausencia de STAT6 promueve la expresión de IL-10 y TGF-beta en células CD4+CD25+Foxp3+ durante las etapas tempranas del desarrollo del CAC**

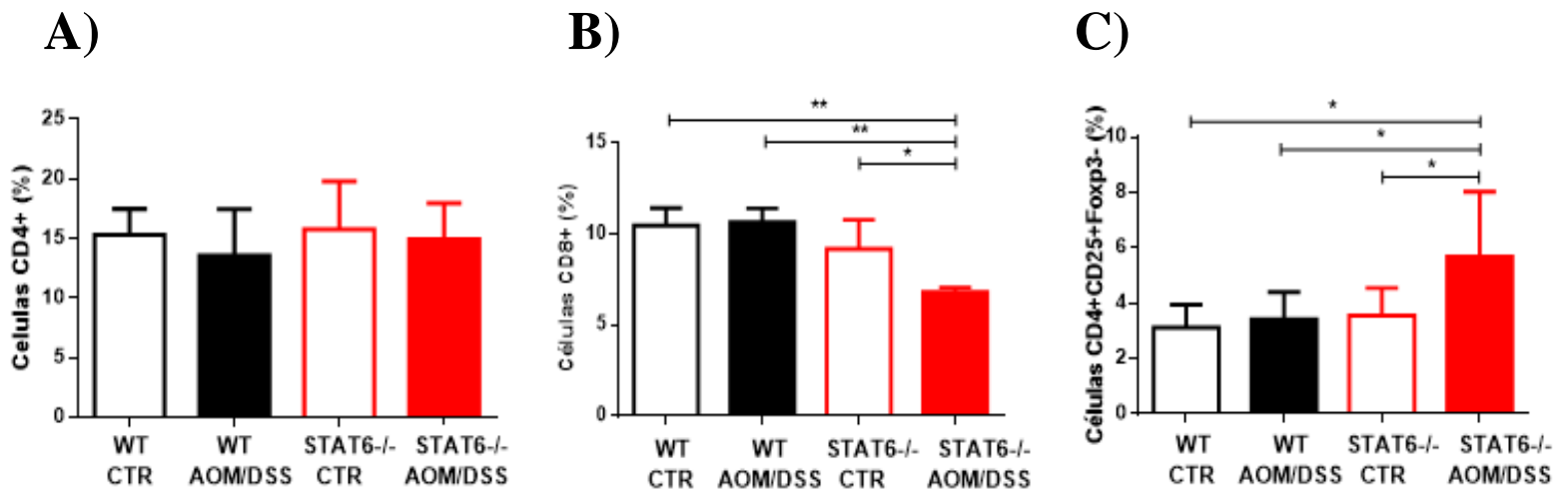
El aumento en la población de linfocitos Tregs (CD4+CD25+Foxp3+) observada anteriormente podrían tener diferentes funciones en la regulación del cáncer, por un lado, su presencia podría estar suprimiendo la activación, proliferación y producción de citocinas por parte de las células TCD4 y TCD8 al producir mensajeros solubles con función inmunosupresora. Dado que la secreción de citocinas supresoras, como TGF- $\beta$  e IL-10, se ha considerado un mecanismo utilizado por las células Tregs para suprimir las respuestas inmunitarias (88) decidimos evaluarlas directamente de la población de células Tregs en las etapas iniciales del desarrollo de CAC. Los niveles de expresión de TGF beta e IL-10 se evaluaron por citometría de flujo en los grupos control y AOM/DSS al día 20 (etapa temprana), en donde previamente se había observado un incremento en esta población en ausencia de STAT6. No se observaron diferencias en el porcentaje de TGF beta e IL-10 en células Tregs de animales WT AOM/DSS en comparación con los grupos control (Figura 11 A-B). Por el contrario, hubo un aumento significativo en la frecuencia de células Foxp3+ e IL10+ en los animales STAT6<sup>-/-</sup>-AOM/DSS o TGF- $\beta$  (Figura 12 A-B).



**FIGURA 12:** La deficiencia de STAT6 favorece un aumento en el porcentaje de Tregs que expresan IL-10 y TGF- $\beta$  en etapas tempranas del CAC. Frecuencia de IL-10 (A) y TGF- $\beta$  (B) en células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> en los esplenocitos de ratones WT AOM/DSS o STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS o de grupos control. Los datos se expresan como la media SEM y son representativos de dos experimentos independientes con al menos tres ratones por grupo por día de análisis. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

## La deficiencia en STAT6 favorece la disminución de linfocitos T CD8 en las primeras etapas del CAC

Se analizaron los porcentajes de células CD8+, CD4+ y CD4+CD25+Foxp3- (T activadas) durante las etapas tempranas del CAC. No hubo diferencias en la frecuencia de células CD4+ entre los grupos (Fig. 12A). El porcentaje de linfocitos T CD8+ disminuyó significativamente en el grupo STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS en comparación con los ratones WT AOM/DSS y los grupos control. (Figura 13B). Por el contrario, se determinó un incremento en el porcentaje de células CD4+ CD25+ Foxp3- (T activadas) en el grupo STAT6 AOM/DSS vs WT AOM/DSS



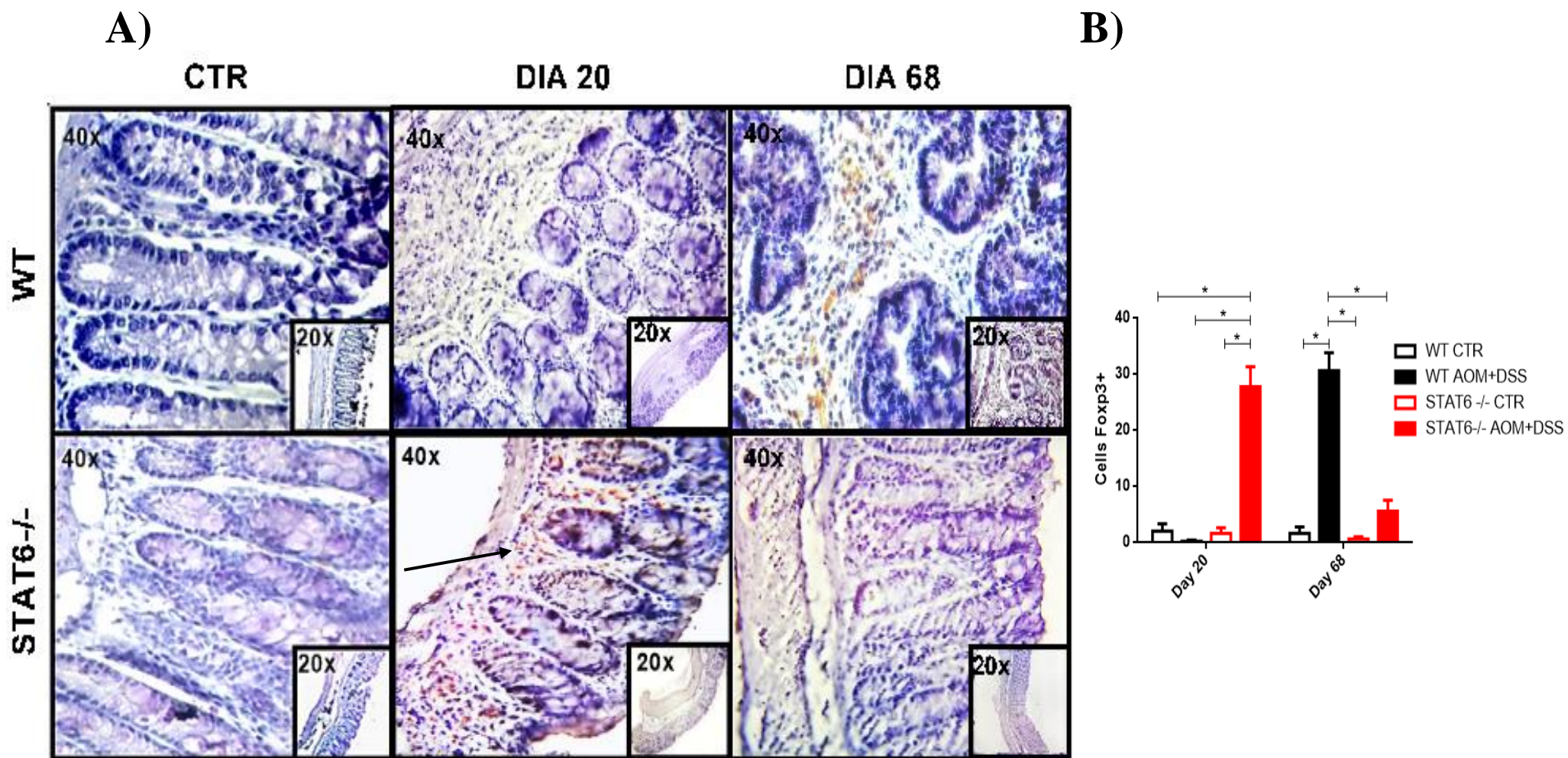
**FIGURA 13.** Porcentajes de las células CD4+ (A), células T CD8+ (B) y CD4+ CD25+ Foxp3- (células T activadas) (C) en la sangre periférica el día 20. Los datos se expresan como la media SEM y son representativos de dos experimentos independientes con al menos tres ratones por grupo por día de análisis. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.



## **La deficiencia de STAT6 favorece el reclutamiento de células Foxp3+ al colon durante las primeras etapas del CAC**

Los resultados previos mostraron una disminución en el infiltrado inflamatorio en el colon de los ratones STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS en las primeras etapas de CAC lo que se correlacionó con un menor desarrollo tumoral (28) por lo tanto, resultó importante analizar si la disminución en la inflamación estaba asociada a un mayor reclutamiento de células Tregs.

Se analizó la expresión del factor de transcripción Foxp3, ya que este es un marcador intracelular que participa directamente en la función de las células Tregs (89). El análisis de la expresión de Foxp3 por inmunohistoquímica, demostró un incremento significativo en la expresión de esta molécula en el colon de los animales WT AOM/DSS durante las etapas avanzadas de la tumorigénesis (día 68) en comparación a los animales control y STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS (30.6 - 7.3 vs. 5.6 - 4.2,  $p < 0.001$ ) (Figura 13 A y B), coincidiendo con los datos observados en circulación y bazo. Por el contrario, se observó un aumento significativo de células Foxp3<sup>+</sup> en el colon de los ratones STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS en comparación con los animales WT AOM/DSS (27.8 - 7.8 vs. 0.2 - 0.05,  $p < 0.001$ ), únicamente en las etapas tempranas del CAC (día 20). Los tejidos provenientes de los grupos control mostraron una tinción de células Foxp3<sup>+</sup> apenas detectable (Figura 14A y B). Estos resultados muestran que la deficiencia de STAT6 promueve el reclutamiento de células Tregs al colon de manera eficiente durante las etapas tempranas de progresión del CAC.

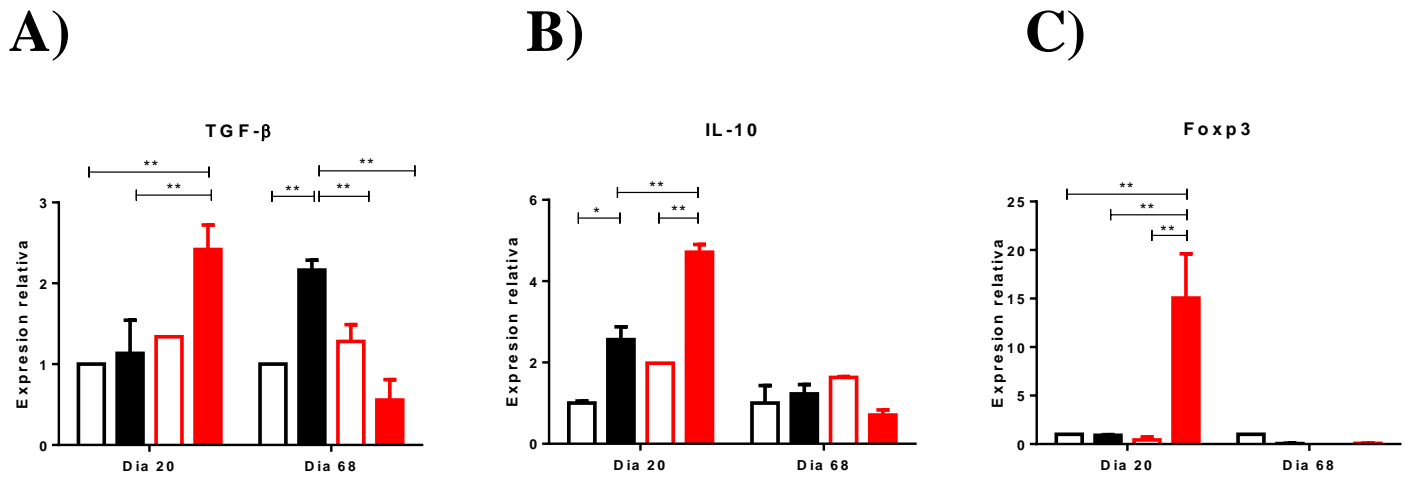


**FIGURA 14:** En deficiencia de STAT6 aumenta el número de células Fosp3+ en etapas tempranas de CAC. Imágenes representativas de la expresión a nivel local de Fosp3 evaluada inmunohistoquímicamente en biopsias intestinales de ratones WT o STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS tratados o de control en los días 20 y 68 de la administración de AOM/DSS. Las secciones de tejido se analizaron a 20x y 40x usando un microscopio óptico (A) Y se graficaron los porcentajes promedio de todas las células Fosp3+ del colon al día 20. La cuantificación de las células Fosp3+ se realizó usando el software ImageJ v.1.48 contando las células en 10 campos por muestra de cada animal. Los datos se expresan como la media SEM y son representativos de dos experimentos independientes con al menos tres ratones por grupo por día de análisis. \* p <0,05, \*\* p <0,01.

**Los animales deficientes en STAT6 muestran un incremento en la expresión de citocinas asociadas a los linfocitos T reguladores en etapas tempranas (Día 20) del desarrollo de CAC.**

Con el propósito de extender la caracterización de los linfocitos Tregs presentes en los animales STAT6<sup>-/-</sup> durante el desarrollo de CAC durante las etapas iniciales, se decidió continuar el análisis por RT-PCR para valorar la expresión del ARNm de IL-10, TGF- $\beta$  y el factor de transcripción de Foxp3 en el colon, moléculas involucradas en la función y actividad de las células Tregs.

Como se muestra en la figura 15, en la etapa avanzada del CAC se observó un incremento significativo en la expresión de TGF- $\beta$  en los animales WT AOM/DSS en comparación con los animales STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS y los grupos control y (2.1 - 0.2 vs. 0.5 - 0.4;  $p < 0.01$ ). Los animales STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS presentaron un aumento en la expresión de TGF- $\beta$  e IL-10 únicamente en las etapas tempranas del CAC. De manera similar a los resultados encontrados por inmunohistoquímica, la expresión de Foxp3 se incrementó de manera significativa en el grupo STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS, en comparación con los ratones WT AOM/DSS, en el día 20 (15 - 6.4 vs. 0.9 - 0.07,  $p < 0.05$ ) (Figura 15).



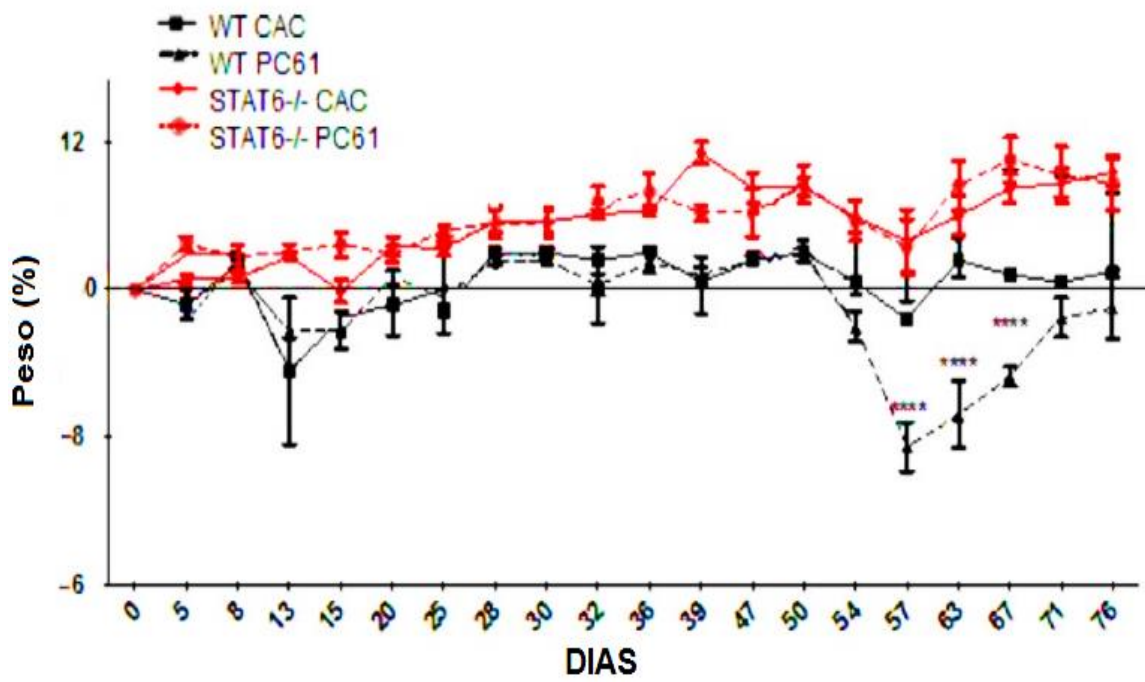
**FIGURA 15:** Existe una mayor expresión de la proteína Foxp3 y el ARNm en el colon de los animales tratados con STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS durante el desarrollo temprano de CAC. Análisis cuantitativo de RT-PCR de la expresión de ARNm colónico de TGF- $\beta$  (A) e IL-10 (B) y expresión de Foxp3 (C) en los grupos de ratones WT o STAT6<sup>-/-</sup> tratados de control al día 20 y 68 de la administración de AOM. Los datos se expresan como la media SEM y son representativos de dos experimentos independientes, con al menos tres ratones por grupo por día de análisis. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

## **La depleción de las células Tregs durante las primeras etapas del CAC restaura el desarrollo tumoral en los animales STAT6<sup>-/-</sup>**

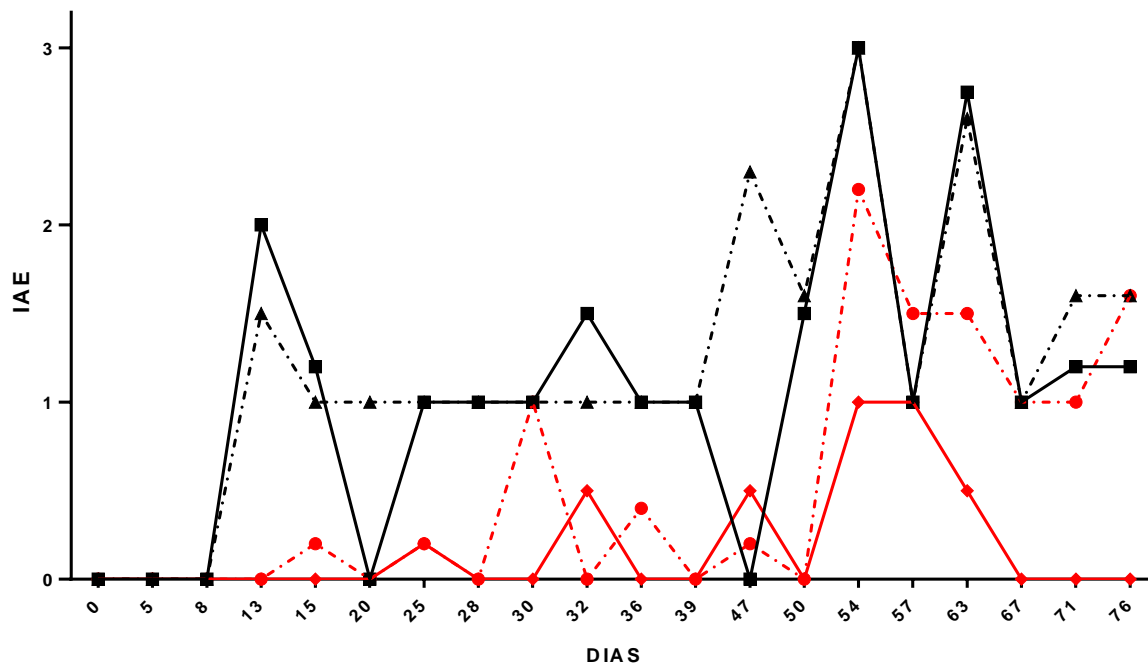
La deficiencia de STAT6 favorece un reclutamiento eficaz de los linfocitos Tregs al sitio de inflamación durante el CAC temprano, lo que sugiere que la actividad de estas células durante este periodo puede ser importante para conferir resistencia frente al desarrollo tumoral. Para analizar más detalladamente la participación de las células Tregs en el desarrollo del CAC, estas células se depletaron mediante la inyección intraperitoneal del anticuerpo PC61, únicamente en las etapas donde habíamos detectado que las células Tregs se incrementaron en los animales STAT6 AOM/DSS.

Después de la administración del anticuerpo, se evaluó la progresión de CAC, se monitoreó el cambio en el peso corporal, el IAE y el desarrollo tumoral en ambos grupos de ratones WT y STAT6<sup>-/-</sup>. Los ratones WT y STAT6<sup>-/-</sup> con AOM/DSS sin PC61 mantuvieron la tendencia de experimentos anteriores durante el curso de la administración de AOM/DSS, Sin embargo, dentro del grupo de animales tratados con PC61, los ratones WT presentaron una mayor pérdida en el porcentaje de peso con respecto al grupo WT CAC (AOM/DSS). En el grupo STAT6<sup>-/-</sup> no se observaron diferencias en el porcentaje de peso ganado entre el grupo CAC sin el anticuerpo y el grupo PC61 (Figura 16A). Los ratones WT PC61 mostraron rápidamente piloerección y signos clínicos de la enfermedad (IAE) durante todo el experimento de manera semejante a los animales WT CAC (Figura 16B). Como era de esperarse, los ratones STAT6<sup>-/-</sup> CAC no tuvieron diarrea o sangrado rectal durante el tratamiento. Sin embargo, cuando a los animales STAT6<sup>-/-</sup> se les administró el anticuerpo PC61, mostraron una puntuación IAE significativamente aumentada, particularmente durante el desarrollo tardío de CAC en comparación con los ratones STAT6<sup>-/-</sup> CAC (Figura 16B). En las muestras tomadas del día 77, los ratones STAT6<sup>-/-</sup> CAC no desarrollaron tumores, mientras que el 100% de los animales STAT6<sup>-/-</sup> PC61 mostraron tumores polipoides de color rojizo en las zonas medial y distal del colon, daño macroscópico y alteraciones patológicas que fueron similares a las lesiones observadas en los ratones WT CAC (Figura 16C). Además, la carga tumoral en los ratones WT CAC, WT PC61 y STAT6<sup>-/-</sup> PC61 fue similar (Figura 16D). Estos datos demuestran que la resistencia a la carcinogénesis en los animales deficientes en STAT6 depende de la función temprana de las células Tregs.

A)

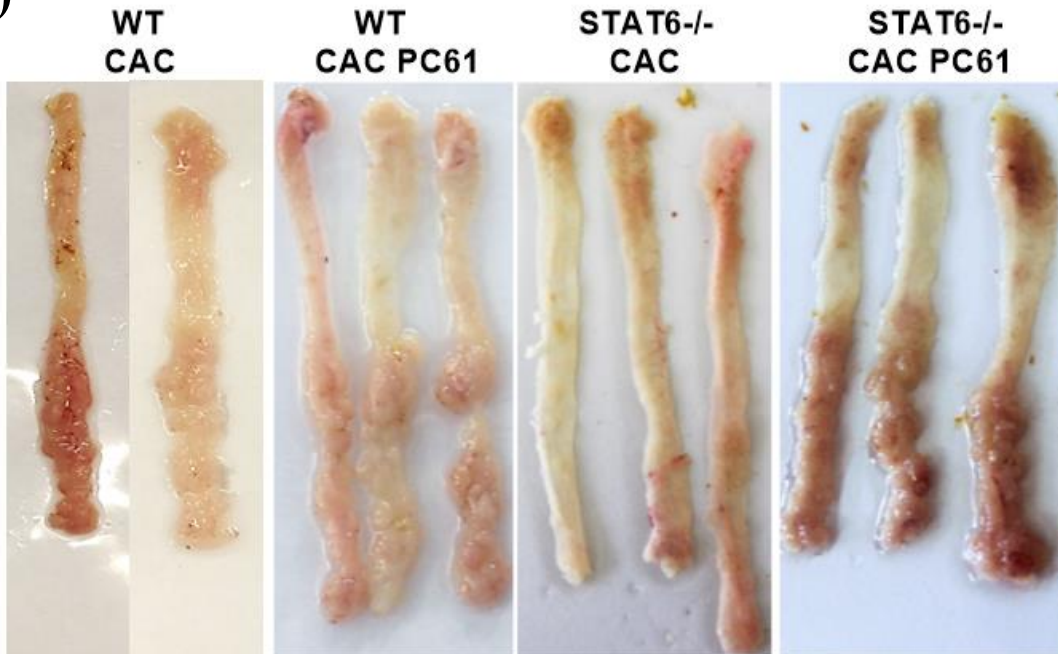


B)

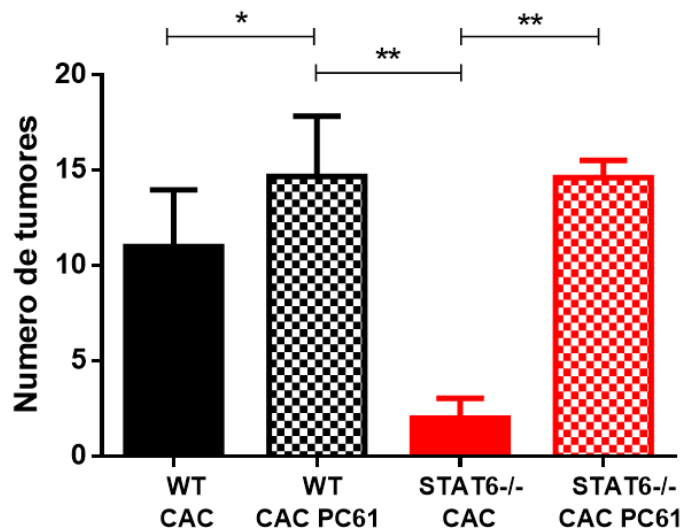




C)



D)

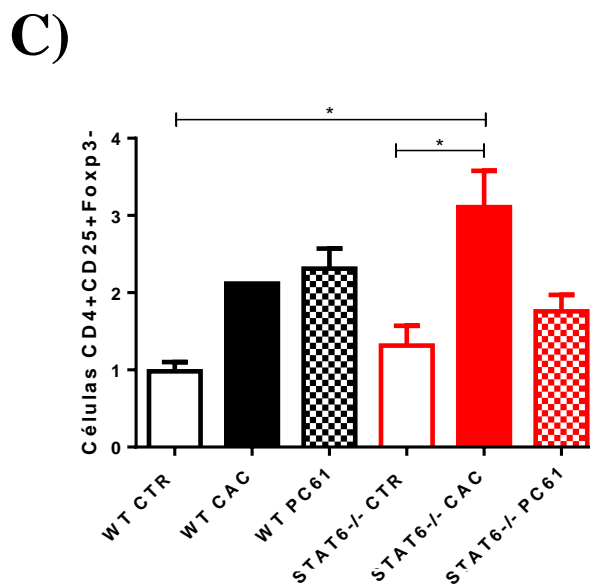
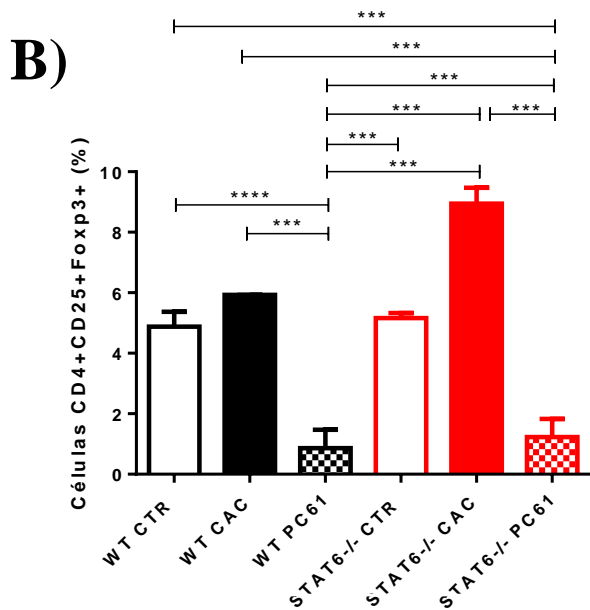
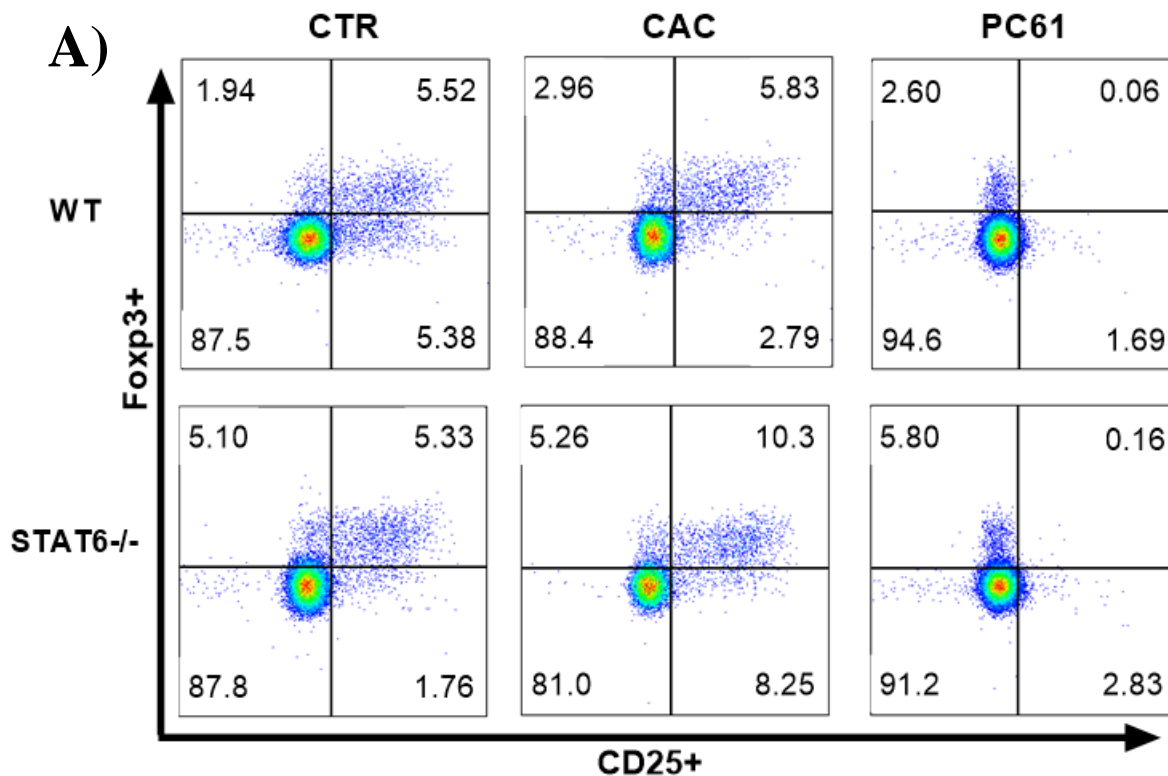


**FIGURA 16:** La depleción de las células Treg con el anticuerpo anti CD-25 (PC61) durante las etapas tempranas del CAC restaura el desarrollo tumoral en los animales STAT6<sup>-/-</sup>. Cambios en la ganancia de peso asociados al desarrollo del CAC durante la administración de AOM/DSS y PC61 a animales WT y STAT6<sup>-/-</sup> (A), el índice de actividad de la enfermedad (IAE) (B), fotografías representativas abiertos longitudinalmente, mostrando aspectos macroscópicos (C) y número de tumores (D) al día 77, después de la administración de AOM/DSS y PC61. Los datos corresponden a 6 animales por grupo y representan el promedio  $\pm$ DS. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ . Se muestran resultados obtenidos de tres experimentos independientes. Estas imágenes fueron tomadas de Ocaña-Soriano 2020 (TESINA).

## **Depleción de células T reguladoras mediante el uso del anticuerpo Anti-CD25 (PC-61).**

Estudios anteriores han demostrado que la depleción in vivo de las células Tregs por una inyección del anticuerpo PC61 alcanza su punto máximo el día 8 y permanece durante 12 días. Para validar el uso del anticuerpo PC61 en nuestro modelo, por lo que se analizó la depleción de las células Tregs a los 10 y 68 días después de la administración del anticuerpo PC61. Al día 25 del inicio del CAC (diez días después de la administración de PC61) se evaluó la expresión de CD4, CD25 y Foxp3 en la sangre periférica de los diferentes grupos. En los animales WT CAC y STAT6<sup>-/-</sup> CAC, dentro del grupo de células CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>, el 70% de ellas expresan niveles altos de CD25 (Figura 17A), mientras que las células restantes expresan niveles bajos o no expresan CD25. En respuesta a la administración del anticuerpo PC61, las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> disminuyeron significativamente en ambos grupos WT (5.9 - 1.2 a 0.86 - 0.08,  $p < 0.05$ ) y STAT6<sup>-/-</sup> (8.9 - 1 a 1.2 - 1,  $p < 0.05$ ) (Figura 17B). Sin embargo, la población CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> se mantuvo estable.

Una desventaja del uso de este anticuerpo es que existe la posibilidad de depletar también a la población de linfocitos T activados (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>), por lo que aquí demostramos que los valores de esta población en los animales WT PC61 son similares a aquellos niveles del grupo WT AOM/DSS, y que por su parte en aquellos animales STAT6<sup>-/-</sup> PC61 existe una disminución en estos niveles, aunque no fue significativa. Estos resultados, nos demuestran que la administración del anticuerpo PC61 es eficiente en la depleción de linfocitos Tregs activados (CD25<sup>+</sup>) y mantiene constante la activación de linfocitos TCD4<sup>+</sup>.

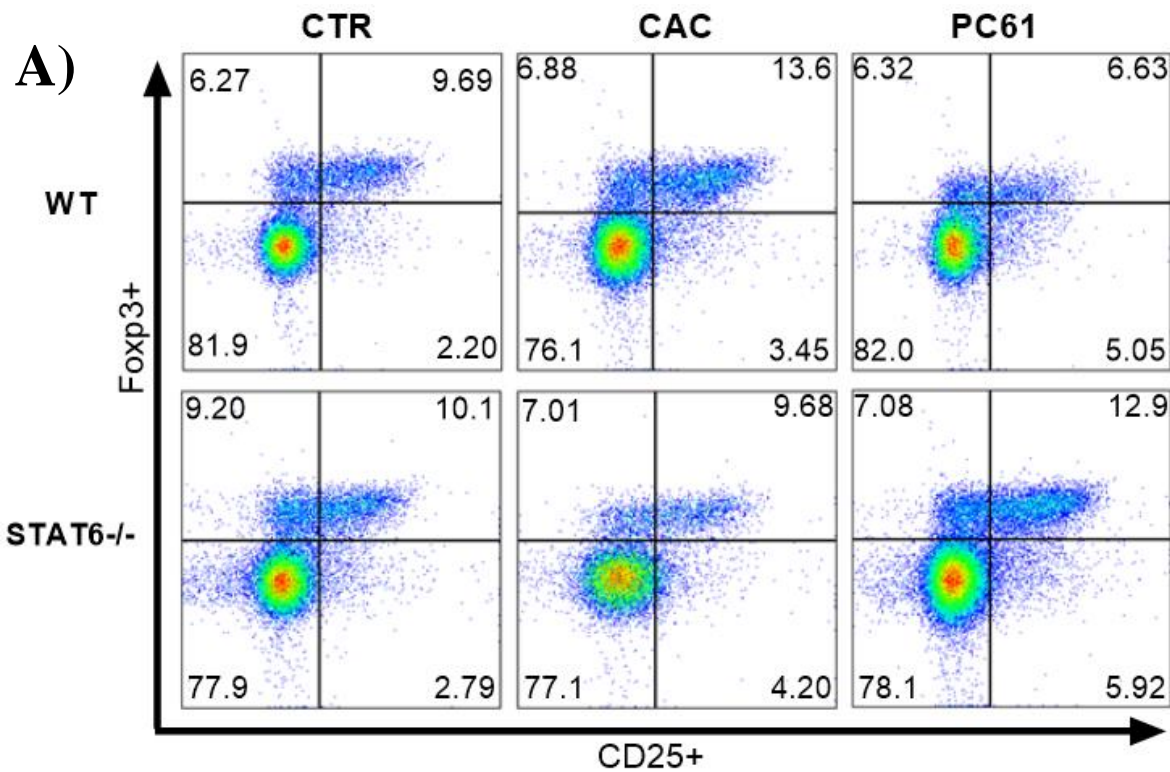


**FIGURA 17:** Tratamiento con anticuerpo PC61 durante la CAC temprana. Al el día 25, se analizaron diferentes poblaciones de células circulantes mediante citometría de flujo. Gráficos de puntos representativos (A) y frecuencias de las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (B) y CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> (C) de WT CAC o STAT6<sup>-/-</sup> CAC y ratones WT o STAT6<sup>-/-</sup> tratados con PC61 en el día 25 (B) después de la administración de AOM/DSS. Los datos se expresan como la media SEM y son representativos de dos experimentos independientes, con al menos tres ratones por grupo por día de análisis. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

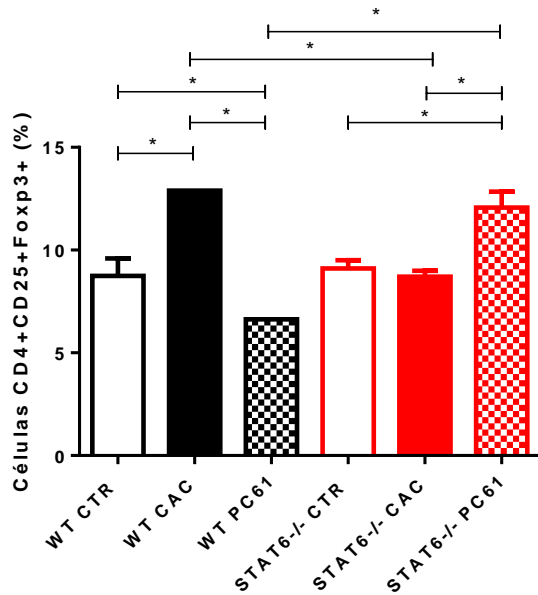


En etapas avanzadas de la carcinogénesis los ratones WT CAC mostraron un aumento significativo en la frecuencia de células CD4+ CD25+ Foxp3+ en sangre periférica, en comparación con los ratones WT CTR (12.9 - 0.2 vs. 8.7 - 1.4;  $p < 0.05$ ). Sin embargo, los ratones WT PC61 mostraron una leve disminución en la frecuencia de Tregs en comparación con los ratones WT CTR (12.9 - 0.2 vs. 6.63 - 0.6;  $p < 0.05$ ). Como se demostró anteriormente los ratones STAT6<sup>-/-</sup> CAC tienen porcentajes similares de células Tregs (8,7 +/- 0,6) al grupo control (9,11 +/- 0,6), Por el contrario, los ratones STAT6<sup>-/-</sup> PC61, mostraron un aumento significativo en las células CD4+ CD25+ Foxp3+ en comparación con los ratones STAT6<sup>-/-</sup> CAC o sus controles (12,9 +/- 0,2 vs 8,7 +/- 0,6;  $p < 0,05$ ). Además, el porcentaje de células Tregs en los ratones STAT6<sup>-/-</sup> PC61 fueron similares a los valores observados en los ratones WT CAC, lo que demuestra que el uso de este anticuerpo durante las primeras etapas de la carcinogénesis no altera el reclutamiento de células Tregs en etapas avanzadas del CAC (Figura 18A).

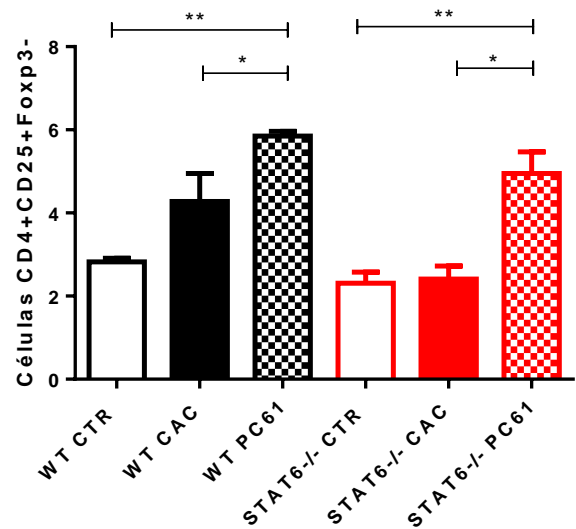
Al día 77 no se observaron cambios en la población de linfocitos T activados (CD4+CD25+Foxp3-) en los grupos que recibieron o no el anticuerpo PC61 (Figura 18B).



**B)**



**C)**

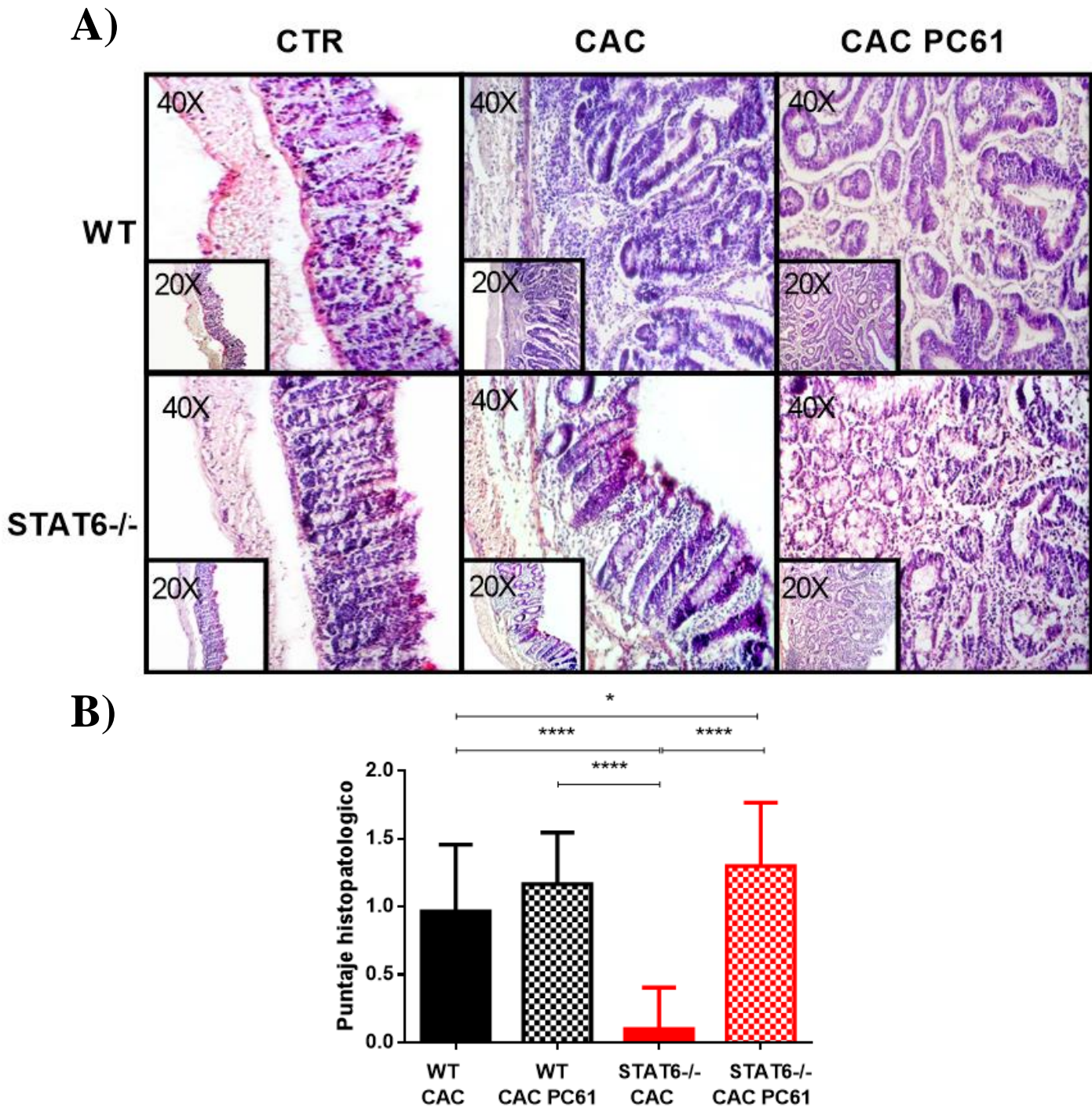


**FIGURA 18:** El uso de PC61 reconstituye los valores de linfocitos Tregs en deficiencia de STAT6 durante las etapas avanzadas del desarrollo de CAC. Al día 68 se analizaron diferentes poblaciones de células circulantes mediante citometría de flujo. Se muestran gráficos de puntos representativos (A) y frecuencias de las células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Fopx3<sup>+</sup> (B) y CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Fopx3<sup>-</sup> (C) de animales WT CAC o STAT6<sup>-/-</sup>-CAC con y sin el anticuerpo PC61. Los datos se expresan como la media SEM y son representativos de dos experimentos independientes, con al menos tres ratones por grupo por día de análisis. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

## **Análisis histológico durante la administración de anticuerpo PC61**

En estudios anteriores han descrito como una característica evidente del desarrollo de CAC alteraciones en la barrera epitelial y las capas siguientes del colon resultado del desarrollo tumoral. Al verificar que con el uso del anticuerpo PC61 los animales deficientes en STAT6 presentan un desarrollo tumoral similar al presentado en los animales WT CAC, decidimos hacer un análisis histopatológico y continuar así con la caracterización de este fenómeno.

Al día 77 en los animales WT PC61 se observó un infiltrado inflamatorio característico, acompañado con una extensa inflamación crónica localizada en la capa de la mucosa y submucosa, reflejada en un engrosamiento exacerbado, así como lesiones displásicas graves, y numerosos tumores polipoides, constituidos por glándulas cubiertas por células epiteliales atípicas y numerosas figuras mitóticas, que corresponden a adenocarcinomas polipoides (APC) bien diferenciados, dando como resultado la pérdida completa en la morfología del intestino, la pérdida de la estructura del epitelio es mayor en comparación al presentado en los animales WT CAC. El análisis histológico reveló que los ratones STAT6<sup>-/-</sup> PC61 mostraron una intensa infiltración de células inflamatorias, acompañada de un mayor pérdida de la integridad estructural, en comparación con los ratones STAT6<sup>-/-</sup> CAC que no recibieron el anticuerpo en donde no se observaron grandes infiltrados celulares, alteraciones o lesiones, en cambio se observó que la estructura del colon permaneció casi intacta, pudiéndose observar fácilmente la definición de las capas de la mucosa, submucosa y muscular propias de un colon sin lesiones. Las áreas de displasia de alto grado se alternaron con áreas normales en el tejido intestinal de los ratones STAT6<sup>-/-</sup> PC61, que era similar al daño histológico observado en los ratones WT CAC y WT PC61. Estos resultados sugieren que los linfocitos T regs en el microambiente tumoral y los órganos periféricos previenen la progresión tumoral en ratones STAT6<sup>-/-</sup> (Figura 19 A) y puntaje histopatológico considerando el daño por alteración de la mucosa, conteo de FCA e infiltrados inflamatorios (Figura 19 B).



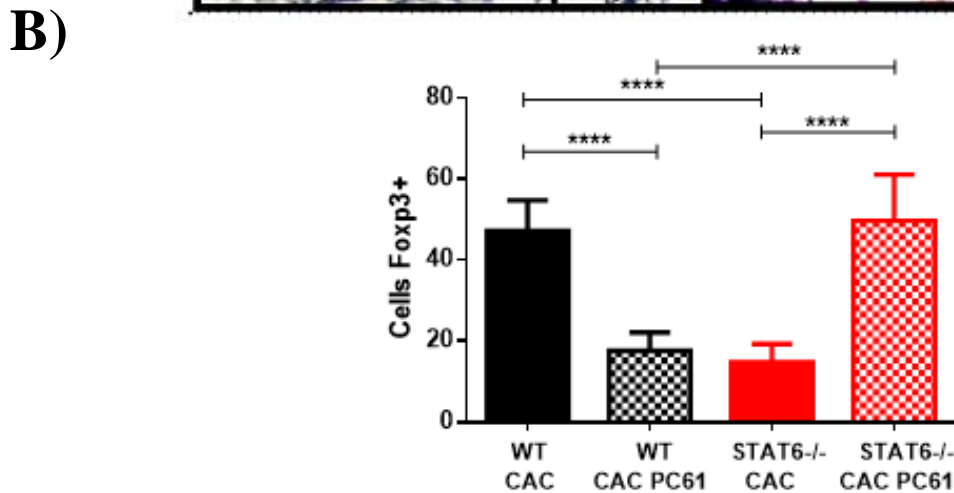
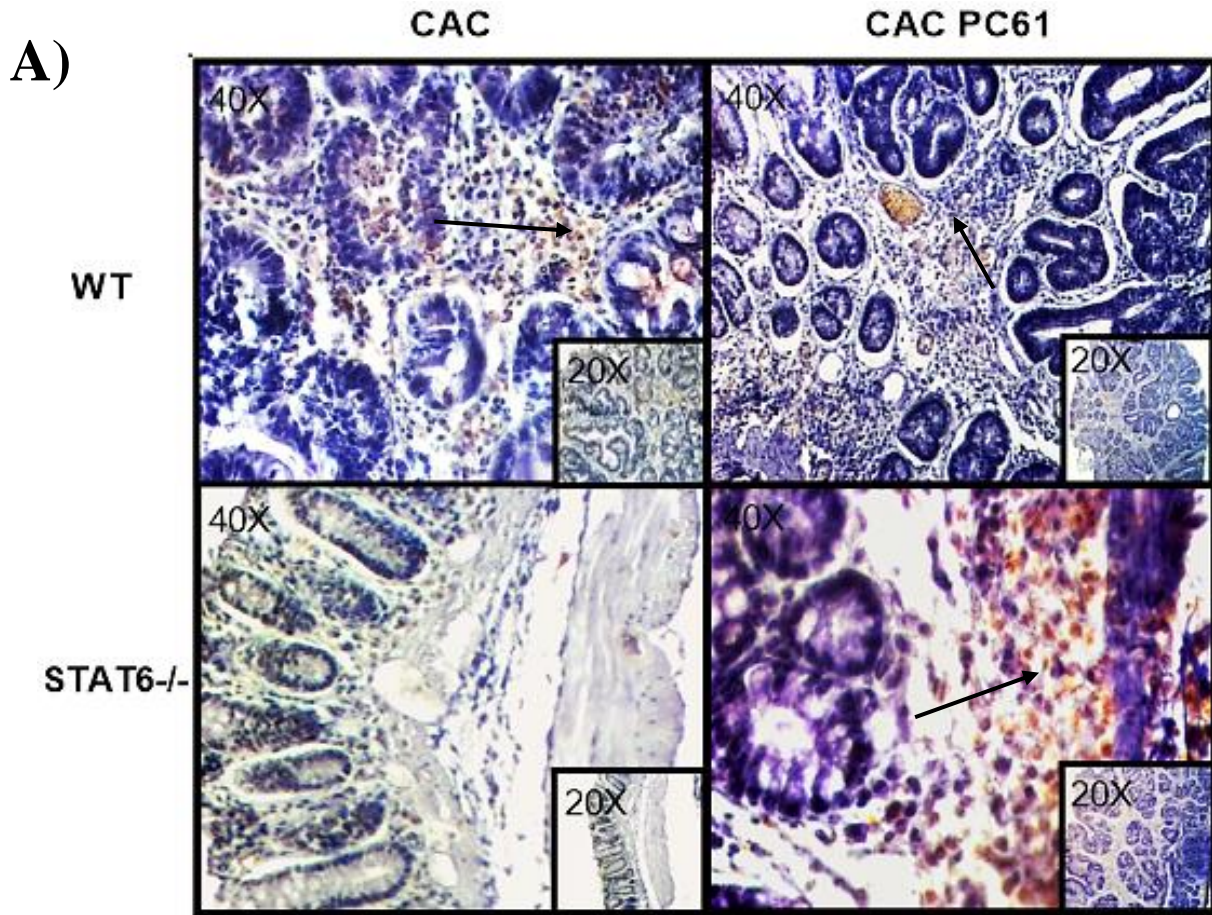
**FIGURA 19:** El tratamiento con anticuerpo PC61 favorece el daño histológico en ratones STAT6<sup>-/-</sup>. Secciones H&E representativas \*Infiltrados inflamatorios (A) y la puntuación histológica (B) de dos puntos aislados del colon en ratones WT CAC o STAT6<sup>-/-</sup> CAC y ratones WT o STAT6<sup>-/-</sup> tratados con PC61 el día 68 después de la administración de AOM. Los datos se expresan como la media SEM y son representativos de dos experimentos independientes, con al menos tres ratones por grupo por día de análisis. \*\*\* p <0,001.

## **El reclutamiento de las células Foxp3+ aumenta a nivel local en los animales STAT6-/- que recibieron el anticuerpo PC61**

Por último, dado que la citometría de flujo evidenció un aumento en el reclutamiento de linfocitos T regs en sangre periférica durante las etapas avanzadas del desarrollo de CAC en deficiencia de STAT6-/-, se analizó también aquí en las biopsias de colon obtenidas de ratones WT y STAT6-/- la expresión de Foxp3. Mediante inmunohistoquímica al día 20 y 68 después de la administración del AOM/DSS y el anticuerpo PC61.

Las células Foxp3+ se observaron claramente en el intestino de los ratones WT CAC durante las últimas etapas de la progresión del tumor (día 68). No obstante, el tejido colónico de los ratones WT PC61 mostró una expresión de Foxp3 significativamente menor al mismo tiempo (Figura 20A). Por el contrario, el conteo de las células Foxp3+ estaba significativamente más elevado en los tumores de colon de los animales STAT6-/- PC61 durante las últimas etapas del desarrollo de CAC, en comparación con los ratones STAT6-/- CAC o WT PC61 (Figura 20B). Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que las poblaciones de células Tregs en el microambiente tumoral y los órganos periféricos previenen la progresión tumoral en ratones STAT6-/-.





**FIGURA 20:** El uso de PC61 favorece en el número de células Foxp3 en etapas avanzadas de CAC en deficiencia de STAT6. Imágenes representativas de la expresión a nivel local de la expresión de Foxp3 evaluada inmunohistoquímicamente en biopsias intestinales de ratones WT o STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS tratados o de control en los días 20 y 68 de la administración de AOM/DSS. Las secciones de tejido se analizaron a 20 y 40 usando un microscopio óptico (A) Y se graficaron los porcentajes promedio de todas las células Foxp3<sup>+</sup> del colon al día 20. La cuantificación de las células Foxp3<sup>+</sup> se realizó usando el software ImageJ v.1.48 contando las células en 10 campos por muestra de cada animal. Los datos se expresan como la media SEM y son representativos de dos experimentos independientes con al menos tres ratones por grupo por día de análisis. \* p <0,05, \*\* p <0,01.

## **Discusión**

A lo largo de este trabajo, se trató de esclarecer un poco más la incógnita sobre los mecanismos mediante los cuales STAT6 puede involucrarse en el desarrollo de CAC. A pesar de que hay múltiples factores relacionados a la vía STAT6 que pudieran estar interviniendo en el desarrollo de este padecimiento, aquí se trató de enfocar los análisis únicamente en la intervención de esta vía sobre las células no tumorales, particularmente sobre aquellas que componen la respuesta inmune. Lo que sabemos hasta ahora es que esta vía de señalización es transcendental en múltiples procesos, se sabe, por ejemplo, que media una multitud de acciones que son relevantes en la iniciación del desarrollo de las células TH2 en la patogénesis de las enfermedades alérgicas, la regulación dependiente de la expresión de MHC de clase II, CD23, IL-4Ra y el cambio de clase de inmunoglobulina a IgE e IgG1 en ratones (21).

Así mismo se ha demostrado que STAT6 está críticamente implicado en varios aspectos de la regulación positiva y negativa de la expresión de varias quimiocinas que organizan la infiltración de células TH2 y eosinófilos (78,90,91) y se ha demostrado también que las citocinas TH2 y por lo tanto STAT6 también desempeñan un papel en la inmunovigilancia al regular negativamente la inmunidad antitumoral (92). Anteriormente ya se ha expuesto que la deficiencia de STAT6 es necesaria para controlar el crecimiento tumoral en un modelo de CAC (25). Nosotros describimos que la ausencia de STAT6 da como resultado un aumento de la acumulación de los linfocitos Tregs tanto locales como periféricos y una sobreexpresión de las moléculas asociadas con la función de las células Tregs durante las etapas iniciales del CAC. Los Tregs están involucrados de manera crucial en el mantenimiento de la homeostasis de la mucosa intestinal al suprimir las respuestas inmunes anormales contra microbiota. En particular, ejercen su función produciendo citocinas antiinflamatorias como IL10 y TGF $\beta$  y previniendo tanto la activación como la actividad antitumoral mediada por las células asesinas naturales (NK) y las células T CD8 + citotóxicas (55). No obstante, aunque los efectos inmunomoduladores de Tregs pueden ejercer un efecto protector o terapéutico en la inflamación intestinal, la supresión del sistema inmunológico puede ser devastadora en la inmunovigilancia del CAC (93), en este modelo, existe un proceso inflamatorio crónico que podría estar siendo modulado desde las etapas más tempranas por medio de estos porcentajes elevados de células Tregs, en presencia de STAT6, se sabe que esta modulación es exacerbada y por lo tanto impide que las células del sistema inmunológico ejerzan una función efectora eficaz sobre las células transformadas, siendo así perjudicial y favoreciendo el desarrollo tumoral. Sin embargo, al poseer aquí

una deficiencia de STAT6 y un aumento de la población de Tregs, podemos comparar estos datos obtenidos con lo anteriormente observado por nuestro grupo de trabajo, en donde el colon de los ratones STAT6<sup>-/-</sup> muestra una reducción en la infiltración celular y una disminución de la producción de marcadores proinflamatorios y citocinas en la etapa inicial del tumor (25). Además, como se observa en estos resultados, se observa que tras un agotamiento temprano de esas células Tregs utilizando el anticuerpo PC61 durante el desarrollo de CAC en ratones STAT6<sup>-/-</sup> se restaura el crecimiento del tumor, junto con una infiltración inflamatoria. Estos resultados señalan visiblemente a STAT6 como una vía crítica para la inducción y función de las células Tregs durante la progresión de CAC, sin embargo, aún parece indefinida la relación que existe entre ambos.

En principio sabemos que las citocinas propias de la vía de señalización de STAT6: IL-4, IL-13 y sus receptores, están involucrados en funciones de proliferación, supervivencia y actividades promigratorias en varios tipos de cáncer (94). La mayoría de estos estudios se realizan en líneas celulares, en animales deficientes en IL-4 o en el receptor IL-4R $\alpha$  indicando que esta vía de señalización es un componente importante que contribuye a la formación de tumores (95). También, se tiene descrito que los niveles de fosfo-STAT6 (p-STAT6) se detectan comúnmente en el colon de pacientes con EC o CU clínicamente detectable, ese p-STAT6 tumoral se correlaciona positivamente con un estadio clínico y un mal pronóstico del CCR humano (55,79,95,96). Esto es debido a que la vía de señalización STAT6 favorece la expresión de proteínas anti-apoptóticas (95) y promueve la proliferación de células epiteliales de pólipos en el colon (96). Del mismo modo, como mencionamos anteriormente la activación persistente de STAT6 modifica la expresión de proteínas involucradas en la permeabilidad de la barrera epitelial e interrumpe la integridad de la unión estrecha, lo que resulta en la exposición recurrente de la microbiota favoreciendo la inflamación y desarrollo de CAC (96,97).

En este trabajo utilizamos el modelo de cáncer de colon asociado a colitis inducido por AOM y DSS. Anteriormente, se demostró que aproximadamente el 70% de los animales con una deficiencia en STAT6 no desarrollaban tumores (26). Particularmente en este trabajo se observó al mismo tiempo, que en los animales STAT6<sup>-/-</sup> existe un aumento notable en la frecuencia de las células Tregs durante un desarrollo temprano de CAC con relación a los ratones WT. Los resultados obtenidos apoyan lo encontrado en la literatura, en donde ya se ha tratado de demostrar una relación entre STAT6 y las células del sistema inmune en usando un modelo de colitis inducida por oxazolona, en donde las células T, los



macrófagos y las células T, asesinas naturales exhiben un aumento de la fosforilación de STAT6 durante todo el desarrollo de la colitis (59). Adicionalmente, en un modelo de ratones *ApcMin* /+ *STAT6*<sup>-/-</sup>, los animales desarrollan pocos pólipos, presentando una proliferación reducida en el intestino delgado, una expansión de MDSC, una disminución en la expresión de PD-1 de células CD4<sup>+</sup> y una fuerte respuesta citotóxica mediada por CD8 (77). Sin embargo, a pesar de que STAT6 parece ser crítico en la regulación del crecimiento tumoral, los resultados obtenidos y las evidencias presentadas aquí comprueban que también desempeña un papel importante en células no tumorales.

Las células Tregs por su parte, tienen un papel oncogénico significativo en la progresión tumoral mediante la supresión de la inmunidad antitumoral y la prevención de un proceso citotóxico activo (97). Todo inicia cuando las quimiocinas y citocinas son liberadas en el microambiente tumoral (TME) por las células cancerosas, lo que lleva al reclutamiento de células Tregs. Algunos informes relacionan la infiltración de células Tregs Foxp3<sup>+</sup> con resultados clínicos deficientes (98,99). El aumento colónico de células Foxp3<sup>+</sup> es significativamente mayor en pacientes con CCR, en comparación con controles sanos o pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (100), y las células Tregs con una mayor expresión de varias moléculas que se correlacionan con la supresión, como TGF- $\beta$ , IL-10, CD25 y CTLA-4, se observan en pacientes con CCR (99). Además, los números de Tregs Foxp3<sup>+</sup> son más altos en los cánceres de colon humanos que en la mucosa circundante no afectada (101). Aunque algunos estudios sobre el cáncer de colon han mostrado una asociación paradójica y estadísticamente significativa entre un mayor número de Tregs y un pronóstico favorable (102), la función de Tregs en el cáncer de colon relacionado con la inflamación es poco conocida. En el presente estudio, se observó que, durante el desarrollo temprano de CAC, las células Tregs se reclutaron de manera eficiente en el colon de los animales *STAT6*<sup>-/-</sup>, mientras que los porcentajes de células CD8<sup>+</sup> disminuían, por su parte, el aumento de las células Foxp3<sup>+</sup> en el colon de los ratones WT se detectó únicamente en las últimas etapas de CAC. De manera interesante, se ha señalado que las células Tregs presentes en WT durante las etapas avanzadas del desarrollo de CAC muestran un fenotipo de activación al poseer niveles elevados de PD-1, CD127 y Tim-3 y por lo tanto una mayor capacidad supresora sobre células T-CD4<sup>+</sup> y T-CD8<sup>+</sup> y que aquellas presentes durante las etapas tempranas eran escasas y menos supresoras (81). El papel de las células Tregs en el CCR parece depender de la coexistencia en el tejido tumoral y del tiempo de acción de diferentes subconjuntos de células que expresan Foxp3, existen pocos reportes que explican alguna asociación directa entre la actividad de las

Tregs y la vía de señalización de STAT6, sin embargo, en el 2008 Takaki et.al. identifico mediante un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en células EL4 y células T primarias, una región silenciadora que contiene un sitio de unión STAT6, la unión a esa región reduce tanto la activación del promotor Foxp3 mediada por TGF- $\beta$ 1 (iTregs) como la modificación de la cromatina y que los niveles de Foxp3 se mantienen mediante la adición del anticuerpo anti-interleucina 4 (IL-4) o mediante la delección de genes STAT6 (103). Es importante señalar que, a pesar de todas estas evidencias ya existentes desde hace años, no existía hasta este momento un análisis o ensayo que relacionara el efecto de STAT6 sobre la población de linfocitos T regs durante el desarrollo de CAC.

De acuerdo con lo anterior, el sentido lógico nos indicaba que era necesario analizar la actividad supresor de la población de Tregs presentes en las etapas tempranas en deficiencia de STAT6, sin embargo por falta de ratones reporteros STAT6<sup>-/-</sup>-Foxp3EGFP no pudimos concluir esa caracterización, sin embargo, con los análisis inmunohistológicos y la tinción H&E que mostraban que en los ratones que fueron inducidos a desarrollar CAC en STAT6<sup>-/-</sup> había una disminución contundente en el infiltrado inflamatorio, así como una menor destrucción del músculo intestinal y la mucosa. Esto respalda la idea de que se están produciendo mecanismos inmunorreguladores. Además, la disminución significativa de las células T CD8<sup>+</sup> y la correlación positiva entre la frecuencia de las células Tregs y los niveles de transcripción de Foxp3, TGF-beta e IL-10 en el colon de los animales STAT6<sup>-/-</sup> indican que son una consecuencia de la modulación de la función de las células Tregs durante la progresión de CAC en estos animales. Hasta la fecha, pocos estudios han analizado la infiltración de Tregs en CCR utilizando tinción Foxp3 +. Un estudio reciente demostró que la densidad de Tregs era mayor en la enfermedad localmente limitada que en la enfermedad metastásica, pero no se asoció con la supervivencia de los pacientes con CCR (104). Contrariamente a los hallazgos observados en la mayoría de los otros carcinomas humanos, en varios estudios con pacientes con CCR no se observó una relación significativa entre el número absoluto de linfocitos T infiltrantes de Foxp3<sup>+</sup> y el pronóstico. Además, algunos otros estudios sugieren que una alta frecuencia de infiltración tumoral de Foxp3<sup>+</sup> Tregs se asocia con un pronóstico favorable en el CCR (105). Como podemos ver, de acuerdo con estas evidencias, parece ser controversial la participación de estas células a lo largo del desarrollo del CAC, la hipótesis que nosotros abordamos considera que el buen o mal pronóstico depende únicamente de la etapa del CAC en donde se presenten las Tregs, para comprobar esto utilizamos un anticuerpo monoclonal PC61 para agotar las células Tregs

solo durante la CAC temprana. Para nuestra sorpresa, observamos de forma contundente un daño histológico significativo y una recuperación evidente del crecimiento tumoral durante la deficiencia de STAT6, lo que respalda indudablemente la idea de que las células Tregs reclutadas en ausencia de STAT6<sup>-/-</sup> tienen una capacidad protectora contra la tumorigénesis del colon. Este hallazgo parece ser compatible con el de un estudio reciente que muestra que la administración del compuesto natural, Partenolida, durante la colitis experimental alivió significativamente la inflamación del colon y mejoró los síntomas de la colitis. El efecto protector de esta molécula se asoció con una mayor frecuencia de células Tregs colónicas, además de una regulación a la baja de la proporción de células Th17 colónicas (106). Un estudio previo, utilizó ratones IL10<sup>fl/fl</sup>/FIC en el desarrollo de CAC, y observaron que la inactivación específica de IL10 en Tregs durante el desarrollo de CAC conduce a una mayor carga tumoral en lugar de una respuesta antitumoral más fuerte. Por lo tanto, en condiciones de IL10 baja, hay una mala regulación de la inflamación, que luego puede contribuir aún más al crecimiento del cáncer (84). Una posible razón de la protección observada en los ratones STAT6<sup>-/-</sup> durante la progresión de CAC podría ser las alteraciones en la ablación específica de las funciones efectoras de las Tregs durante la progresión del tumor. En varios modelos murinos, las células Tregs transferidas adoptivamente previenen la aparición de colitis o tratan la colitis establecida (65, 93), y la expansión in vitro de células Tregs de la sangre de pacientes con colitis se considera una terapia celular adoptiva factible para esta enfermedad (107,108). Los porcentajes significativamente más altos de células Tregs que se encuentran en el colon de los animales STAT6<sup>-/-</sup> con CAC, en comparación con los que se encuentran en el colon de los animales WT con CAC, sugieren que STAT6 limita la generación y el reclutamiento de Tregs por mecanismos indeterminados, reportes anteriores proponen que STAT6 reprime directamente la actividad promotora de Foxp3 en la etapa de determinación del linaje temprano de las Tregs aunque el mecanismo de represión mediada por STAT6 aún no se ha aclarado.

Sin embargo, sería interesante determinar si la estabilidad en la expresión de Foxp3 y por tanto la diferenciación y las propiedades funcionales de las células Tregs se modifican de forma dependiente de STAT6. Además, el papel de STAT6 en la modulación de diferentes tipos de células Tregs (células naturales, inducidas, de tipo 1 y células de B) puede ser útil para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para aliviar la CAC o CCR. Reportes anteriores demuestran que IL-4 suprime la expresión de Foxp3 inducida únicamente por TGF- $\beta$ 1 (iTregs) mediante la unión de STAT6 a una región silenciadora

específica para el promotor de Foxp3, pero que la IL-4 no tiene ningún efecto sobre los niveles de Foxp3 en las células nTregs de CD4+CD25+(103, 109). En conclusión, STAT6 parece jugar un papel central en la regulación de la actividad de las células Tregs, particularmente durante las etapas iniciales del desarrollo de CAC, a través de la modulación de intensas respuestas inflamatorias.

Es trascendental resaltar que la actividad de STAT6 no se limita únicamente a células tumorales, si no que va más allá a la participación de células del sistema inmune. Además, cabe resaltar que este es el primer reporte que demuestra que STAT6 y su vía de señalización pueden regular la función de las células Tregs, que como es sabido, es una respuesta del sistema inmune importante para la modulación de las respuestas inflamatorias, lo que sugiere que STAT6 puede estudiarse para definir posibles moléculas con potencial terapéutico para contrarrestar que impliquen procesos inflamatorios exacerbados. Este trabajo también arroja evidencia que sugiere la importancia de continuar estudiando la participación de STAT6 en la respuesta inmune durante las etapas iniciales del desarrollo de CAC, así como también se proponen nuevos enfoques para determinar los mecanismos mediante los cuales podrían estarse relacionando.

## Conclusiones

- ❖ En etapas tempranas del CAC (Día 20), existe un aumento de linfocitos T reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+), así como una mayor expresión de citocinas asociadas de un ambiente regulador caracterizado por un aumento de TGF- $\beta$  e IL-10, así como una mayor expresión del marcador Foxp3 en ausencia de la vía de señalización de STAT6.
- ❖ Después de la depleción de los linfocitos T reguladores (CD4+CD25+Foxp3+) durante el inicio de la inducción de CAC (Día 0-10) en los animales STAT6 KO, se observó un crecimiento tumoral y una expresión de Foxp3, muy similar a lo observado en los animales WT Día 68.

*Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren fuertemente que la participación de los linfocitos Tregs juegan un papel central en las etapas iniciales del desarrollo de CAC, esto mediante la producción de citocinas antiinflamatorias, lo cual modula la inflamación. Observamos también, que existe una relación significativa entre STAT6 y la función de las células Tregs durante el desarrollo de CAC, por lo que, de manera importante, STAT6 puede representar un blanco terapéutico prometedor para el tratamiento del CAC.*

## Referencias

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA and Jemal A: Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68: 394-424, 2018.
2. Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J. H., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
3. Rutter, M. D., Saunders, B. P., Wilkinson, K. H., Rumbles, S., Schofield, G., Kamm, M. A., Williams, C. B., Price, A. B., Talbot, I. C., & Forbes, A. (2006). Thirty-Year Analysis of a Colonoscopic Surveillance Program for Neoplasia in Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, 130(4), 1030–1038. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.12.035>
4. Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H., & Pagès, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* (New York, N.Y.), 313(5795), 1960–1964. <https://doi.org/10.1126/science.1129139>
5. Lakatos, P. L., & Lakatos, L. (2008). Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: changes, causes and management strategies. *World journal of gastroenterology*, 14(25), 3937–3947. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.3937>
6. Hyun, Y. S., Han, D. S., Lee, A. R., Eun, C. S., Youn, J., & Kim, H. Y. (2012). Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis*, 33(4), 931–936. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs106>
7. West, N. R., McCuaig, S., Franchini, F., & Powrie, F. (2015). Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nature Reviews Immunology*, 15(10), 615–629. <https://doi.org/10.1038/nri3896>
8. Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science*, 331(6024), 1565–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>

9. de Vries, N. L., Swets, M., Vahrmeijer, A. L., Hokland, M., & Kuppen, P. J. (2016). The Immunogenicity of Colorectal Cancer in Relation to Tumor Development and Treatment. *International journal of molecular sciences*, 17(7), 1030. <https://doi.org/10.3390/ijms17071030>
10. Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917), 860–867. <https://doi.org/10.1038/nature01322>
11. Keir, M. E., Liang, S. C., Guleria, I., Latchman, Y. E., Qipo, A., Albacker, L. A., Koulmanda, M., Freeman, G. J., Sayegh, M. H., & Sharpe, A. H. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *The Journal of experimental medicine*, 203(4), 883–895. <https://doi.org/10.1084/jem.20051776>
12. Postow, M. A., Callahan, M. K., & Wolchok, J. D. (2015). Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(17), 1974–1982. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.4358>
13. Wachowska, M., Muchowicz, A., & Golab, J. (2015). Targeting Epigenetic Processes in Photodynamic Therapy-Induced Anticancer Immunity. *Frontiers in oncology*, 5, 176. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00176>
14. Allison, K. E., Coomber, B. L., & Bridle, B. W. (2017). Metabolic reprogramming in the tumour microenvironment: a hallmark shared by cancer cells and T lymphocytes. *Immunology*, 152(2), 175–184. <https://doi.org/10.1111/imm.12777>
15. Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of general physiology*, 8(6), 519–530. <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>
16. Cairns, R. A., Harris, I. S., & Mak, T. W. (2011). Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 11(2), 85–95. <https://doi.org/10.1038/nrc2981>
17. Jiang, Y., Li, Y., & Zhu, B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death & Disease*, 6(6), e1792. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.162>
18. Zhang, Y., & Ertl, H. C. (2016). Starved and Asphyxiated: How Can CD8(+) T Cells within a Tumor Microenvironment Prevent Tumor Progression. *Frontiers in immunology*, 7, 32. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00032>
19. Yu, H., Pardoll, D., & Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature Reviews Cancer*, 9(11), 798–809. <https://doi.org/10.1038/nrc2734>

20. Heneghan, A. F., Pierre, J. F., & Kudsk, K. A. (2013). JAK-STAT and intestinal mucosal immunology. *JAK-STAT*, 2(4), e25530. <https://doi.org/10.4161/jkst.25530>
21. HEBENSTREIT, D., WIRNSBERGER, G., HOREJSHOECK, J., & DUSCHL, A. (2006). Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 17(3), 173–188. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.01.004>
22. Mueller, T. D., Zhang, J. L., Sebald, W., & Duschl, A. (2002). Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1592(3), 237–250. [https://doi.org/10.1016/s0167-4889\(02\)00318-x](https://doi.org/10.1016/s0167-4889(02)00318-x)
23. Sengupta, S., Thaci, B., Crawford, A. C., & Sampath, P. (2014). Interleukin-13 Receptor Alpha 2-Targeted Glioblastoma Immunotherapy. *BioMed Research International*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/952128>
24. Mikita, T., Campbell, D., Wu, P., Williamson, K., & Schindler, U. (1996). Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), 5811–5820. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.10.5811>
25. Formentini A, Braun P, Fricke H, Link KH, Henne-Bruns D and Kornmann M. (2012). Expression of interleukin-4 and interleukin-13 and their receptors in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 27: 1369-1376.
26. MJ, Chaturvedi R, Washington MK, Kuhnhein LA, Moore PD, Coggeshall SS, McDonough EM, Weitkamp JH, Singh AB, Coburn LA. (2013). STAT6 deficiency ameliorates severity of oxazolone colitis by decreasing expression of claudin-2 and Th2-inducing cytokines. *J Immunol* 190: 1849-1858.
27. Hoving JC, Kirstein F, Nieuwenhuizen NE, Fick LC, Hobeika E, Reth M and Brombacher F. (2012). B Cells that produce immunoglobulin E mediate Colitis in BALB/c mice. *Gastroenterology* 142: 96-108.
28. Leon-Cabrera SA, Molina-Guzman E, Delgado-Ramirez YG, Vázquez-Sandoval A, Ledesma-Soto Y, Pérez-Plasencia CG, Chirino YI, Delgado-Buenrostro NL, Rodríguez-Sosa M, Vaca-Paniagua F. (2017). Lack of STAT6 attenuates inflammation and drives protection against early steps of colitis-associated colon cancer. *Cancer Immunol Res* 5: 385-396.
29. Jayakumar A and Bothwell ALM. (2017). Stat6 promotes intestinal tumorigenesis in a mouse model of adenomatous polyposis by expansion of MDSCs and inhibition of cytotoxic CD8 response. *Neoplasia* 19: 595-605.



30. De Oliveira T, Ramakrishnan M, Diamanti MA, Ziegler PK, Brombacher F and Greten FR. (2019). Loss of Stat6 affects chromatin condensation in intestinal epithelial cells causing diverse outcome in murine models of inflammation-associated and sporadic colon carcinogenesis. *Oncogene* 38: 1787-1801.
31. Todaro M, Perez Alea M, Scopelliti A, Medema JP and Stassi G. (2008). IL-4-mediated drug resistance in colon cancer stem cells. *Cell Cycle* 7: 309-313.
32. Di Stefano AB, Iovino F, Lombardo Y, Eterno V, Höger T, Dieli F, Stassi G and Todaro M. (2010). Survivin is regulated by interleukin-4 in colon cancer stem cells. *J Cell Physiol* 225: 555-561.
33. Buzza MS, Johnson TA, Conway GD, Martin EW, Mukhopadhyay S, Shea-Donohue T and Antalis TM. (2017). Inflammatory cytokines down-regulate the barrier-protective prostasin-matriptase proteolytic cascade early in experimental colitis. *J Biol Chem* 292: 10801-10812.
34. Shajib MS, Wang HQ, Kim JJ, Sunjic I, Ghia JE, Denou E, Collins M, Denburg JA and Khan WI. (2013). Interleukin 13 and Serotonin: Linking the immune and endocrine systems in murine models of intestinal inflammation. *PLoS One* 8: e72774.
35. Cao H, Zhang J, Liu H, Wan L, Zhang H, Huang Q, Xu E and Lai M. (2016). IL-13/STAT6 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *Oncotarget* 7: 61183-6119.
36. Chen J, Gong C, Mao H, Li Z, Fang Z, Chen Q, Lin M, Jiang X, Hu Y, Wang W. (2018). E2F1/SP3/STAT6 axis is required for IL-4-induced epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *Int J Oncol* 53: 567-578.
37. Kanai T, Watanabe M, Hayashi A, Nakazawa A, Yajima T, Okazawa A, Yamazaki M, Ishii H and Hibi T. (2000). Regulatory effect of interleukin-4 and interleukin-13 on colon cancer cell adhesion. *Br J Cancer* 82: 1717-1723.
38. Cosin-Roger J, Ortiz-Masia D, Calatayud S, Hernandez C, Esplugues JV and Barrachina MD. (2016). The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD. *Mucosal Immunol* 9: 986-998.
39. Wick EC, LeBlanc RE, Ortega G, Robinson C, Platz E, Pardoll DM, Iacobuzio-Donahue C and Sears CL. (2012). Shift from pStat6 to pStat3 predominance is associated with inflammatory bowel disease-associated dysplasia. *Inflamm Bowel Dis* 18: 1267-1274.
40. Wang CG, Ye YJ, Yuan J, Liu FF, Zhang H and Wang S. (2010). EZH2 and STAT6 expression profiles are correlated with colorectal cancer stage and prognosis. *World J Gastroenterol* 16: 2421-2427.

41. Jiang L, Cheng Q, Zhang B and Zhang M. (2016). IL-13 induces the expression of 11 $\beta$  HSD2 in IL-13R $\alpha$ 2 dependent manner and promotes the malignancy of colorectal cancer. *Am J Transl Res* 8: 1064-1072.
42. Barderas R, Bartolome RA, Fernandez-Acenero MJ, Torres S and Casal JI. (2012). High expression of IL-13 receptor  $\alpha$ 2 in colorectal cancer is associated with invasion, liver metastasis, and poor prognosis. *Cancer Res* 72: 2780-2790.
43. Liu H, Antony S, Roy K, Juhasz A, Wu Y, Lu J, Meitzler JL, Jiang G, Polley E and Doroshow JH. (2017). Interleukin-4 and inter-leukin-13 increase NADPH oxidase 1-related proliferation of human colon cancer cells. *Oncotarget* 8: 38113-38135.
44. Delgado-Ramirez, Y., Colly, V., Villanueva Gonzalez, G., & Leon-Cabrera, S. (2020). Signal transducer and activator of transcription 6 as a target in colon cancer therapy (Review). *Oncology Letters*, 20(1), 455–464. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11614>
45. Li, Y., Dearing, J., Peppelenbosch, M. P., Kuipers, E. J., de Haar, C., & van der Woude, C. J. (2012). STAT1, STAT6 and Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate (cAMP) Signaling Drive SOCS3 Expression in Inactive Ulcerative Colitis. *Molecular Medicine*, 18(10), 1412–1419. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00277>
46. Ni, Z., Lou, W., Lee, S. O., Dhir, R., DeMiguel, F., Grandis, J. R., & Gao, A. C. (2002). Selective activation of members of the signal transducers and activators of transcription family in prostate carcinoma. *The Journal of urology*, 167(4), 1859–1862.
47. Skinnider, B. F., Elia, A. J., Gascoyne, R. D., Patterson, B., Trumper, L., Kapp, U., & Mak, T. W. (2002). Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 99(2), 618–626. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.2.618>
48. Chua, K. H., Ng, J. G., Ng, C. C., Hilmi, I., Goh, K. L., & Kee, B. P. (2016). Association of NOD1, CXCL16, STAT6 and TLR4 gene polymorphisms with Malaysian patients with Crohn's disease. *PeerJ*, 4, e1843. <https://doi.org/10.7717/peerj.1843>
49. Klein, W., Tromm, A., Folwaczny, C., Hagedorn, M., Duerig, N., Epplen, J., Schmiegel, W., & Griga, T. (2005). The G2964A polymorphism of the STAT6 gene in inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease*, 37(3), 159–161. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2004.10.011>

50. XIA, B., CRUSIUS, J. B. A., WU, J., ZWIERS, A., van BODEGRAVEN, A. A., & PEÑA, A. S. (2003). Signal transducer and activator of transcription 6 gene G2964A polymorphism and inflammatory bowel disease. *Clinical & Experimental Immunology*, 131(3), 446–450. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02079.x>
51. Rosen, M. J., Frey, M. R., Washington, M. K., Chaturvedi, R., Kuhnhein, L. A., Matta, P., Revetta, F. L., Wilson, K. T., & Polk, D. B. (2011). STAT6 activation in ulcerative colitis: a new target for prevention of IL-13-induced colon epithelial cell dysfunction. *Inflammatory bowel diseases*, 17(11), 2224–2234. <https://doi.org/10.1002/ibd.21628>
52. Di Stefano, A. B., Iovino, F., Lombardo, Y., Eterno, V., Höger, T., Dieli, F., Stassi, G., & Todaro, M. (2010). Survivin is regulated by interleukin-4 in colon cancer stem cells. *Journal of cellular physiology*, 225(2), 555–561. <https://doi.org/10.1002/jcp.22238>
53. Binnemars-Postma, K., Bansal, R., Storm, G., & Prakash, J. (2018). Targeting the Stat6 pathway in tumor-associated macrophages reduces tumor growth and metastatic niche formation in breast cancer. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 32(2), 969–978. <https://doi.org/10.1096/fj.201700629R>
54. Linde, N., Lederle, W., Depner, S., van Rooijen, N., Gutschalk, C. M., & Mueller, M. M. (2012). Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages. *The Journal of pathology*, 227(1), 17–28. <https://doi.org/10.1002/path.3989>
55. Ostrand-Rosenberg, S., Sinha, P., Clements, V., Dissanayake, S. I., Miller, S., Davis, C., & Danna, E. (2004). Signal transducer and activator of transcription 6 (Stat6) and CD1: inhibitors of immunosurveillance against primary tumors and metastatic disease. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 53(2), 86–91. <https://doi.org/10.1007/s00262-003-0446-z>
56. Sather, B. D., Treuting, P., Perdue, N., Miazgowiec, M., Fontenot, J. D., Rudensky, A. Y., & Campbell, D. J. (2007). Altering the distribution of Foxp3(+) regulatory T cells results in tissue-specific inflammatory disease. *The Journal of experimental medicine*, 204(6), 1335–1347. <https://doi.org/10.1084/jem.20070081>
57. Vignali, D. A. A., Collison, L. W., & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*, 8(7), 523–532. <https://doi.org/10.1038/nri2343>
58. Ohkura, N., Kitagawa, Y., & Sakaguchi, S. (2013). Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity*, 38(3), 414–423. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.03.002>

59. Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology*, 4(4), 330–336. <https://doi.org/10.1038/ni904>
60. Hori, S., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5609), 1057–1061. <https://doi.org/10.1126/science.1079490>
61. Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., & Rudensky, A. Y. (2012). Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual review of immunology*, 30, 531–564. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623>
62. Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature immunology*, 6(11), 1142–1151. <https://doi.org/10.1038/ni1263>
63. Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M. L., Rossini, P. M., Battistini, L., Rötzschke, O., & Falk, K. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110(4), 1225–1232. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064527>
64. Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B., & Robson, S. C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine*, 204(6), 1257–1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20062512>
65. Kobie, J. J., Shah, P. R., Yang, L., Rebhahn, J. A., Fowell, D. J., & Mosmann, T. R. (2006). T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(10), 6780–6786. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.6780>
66. Saraiva, M., & O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 170–181. <https://doi.org/10.1038/nri2711>
67. Huber, S., Schramm, C., Lehr, H. A., Mann, A., Schmitt, S., Becker, C., Protschka, M., Galle, P. R., Neurath, M. F., & Blessing, M. (2004). Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(11), 6526–6531. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6526>

68. Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I., Pedersen, A., Harada, N., Nawata, H., & Strober, W. (2004). TGF- $\beta$ 1 Plays an Important Role in the Mechanism of CD4+CD25+ Regulatory T Cell Activity in Both Humans and Mice. *The Journal of Immunology*, 172(2), 834–842. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.834>
69. Collison, L. W., Pillai, M. R., Chaturvedi, V., & Vignali, D. A. (2009). Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 182(10), 6121–6128. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803646>
70. Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., & Vignali, D. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450(7169), 566–569. <https://doi.org/10.1038/nature06306>
71. Sakaguchi S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology*, 22, 531–562. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122>
72. Whiteside T. L. (2018). FOXP3+ Treg as a therapeutic target for promoting anti-tumor immunity. *Expert opinion on therapeutic targets*, 22(4), 353–363. <https://doi.org/10.1080/14728222.2018.1451514>
73. Ward-Hartstonge, K. A., & Kemp, R. A. (2017). Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response. *Clinical & translational immunology*, 6(9), e154. <https://doi.org/10.1038/cti.2017.43>
74. Jess, T., Frisch, M., & Simonsen, J. (2013). Trends in overall and cause-specific mortality among patients with inflammatory bowel disease from 1982 to 2010. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 11(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2012.09.026>
75. Miyara, M., & Sakaguchi, S. (2007). Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in molecular medicine*, 13(3), 108–116. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.01.003>
76. Liu, Z., Huang, Q., Liu, G., Dang, L., Chu, D., Tao, K., & Wang, W. (2014). Presence of FOXP3(+)/Treg cells is correlated with colorectal cancer progression. *International journal of clinical and experimental medicine*, 7(7), 1781–1785.
77. Argon, A., Vardar, E., Kebat, T., Erdinç, Ö., & Erkan, N. (2016). The Prognostic Significance of FoxP3+ T Cells and CD8+ T Cells in Colorectal Carcinomas. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology : official organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 35(2), 121–131. <https://doi.org/10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.2016014602>

78. Reimers, M. S., Engels, C. C., Putter, H., Morreau, H., Liefers, G. J., van de Velde, C. J., & Kuppen, P. J. (2014). Prognostic value of HLA class I, HLA-E, HLA-G and Tregs in rectal cancer: a retrospective cohort study. *BMC cancer*, 14, 486. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-486>.
79. Soh, J. S., Jo, S. I., Lee, H., Do, E. J., Hwang, S. W., Park, S. H., Ye, B. D., Byeon, J. S., Yang, S. K., Kim, J. H., Yang, D. H., Kim, S. Y., & Myung, S. J. (2019). Immunoprofiling of Colitis-associated and Sporadic Colorectal Cancer and its Clinical Significance. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42986-1>
80. Vlad, C., Kubelac, P., Fetica, B., Vlad, D., Irimie, A., & Achimas-Cadariu, P. (2015). The prognostic value of FOXP3+ T regulatory cells in colorectal cancer. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*, 20(1), 114–119.
81. Saito, T., Nishikawa, H., Wada, H., Nagano, Y., Sugiyama, D., Atarashi, K., Maeda, Y., Hamaguchi, M., Ohkura, N., Sato, E., Nagase, H., Nishimura, J., Yamamoto, H., Takiguchi, S., Tanoue, T., Suda, W., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., Sakaguchi, S. (2016). Two FOXP3+CD4+ T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nature Medicine*, 22(6), 679–684. <https://doi.org/10.1038/nm.4086>.
82. Correale, P., Rotundo, M. S., Del Vecchio, M. T., Remondo, C., Migali, C., Ginanneschi, C., Tsang, K. Y., Licchetta, A., Mannucci, S., Loiacono, L., Tassone, P., Francini, G., & Tagliaferri, P. (2010). Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 33(4), 435–441. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181d32f01>
83. Loddenkemper, C., Schernus, M., Noutsias, M., Stein, H., Thiel, E., & Nagorsen, D. (2006). In situ analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer. *Journal of translational medicine*, 4, 52. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-4-52>
84. Liu, Y. J., Tang, B., Wang, F. C., Tang, L., Lei, Y. Y., Luo, Y., Huang, S. J., Yang, M., Wu, L. Y., Wang, W., Liu, S., Yang, S. M., & Zhao, X. Y. (2020). Parthenolide ameliorates colon inflammation through regulating Treg/Th17 balance in a gut microbiota-dependent manner. *Theranostics*, 10(12), 5225–5241. <https://doi.org/10.7150/thno.43716>

85. Olguín, J. E., Medina-Andrade, I., Molina, E., Vázquez, A., Pacheco-Fernández, T., Saavedra, R., Pérez-Plasencia, C., Chirino, Y. I., Vaca-Paniagua, F., Arias-Romero, L. E., Gutierrez-Cirlos, E. B., León-Cabrera, S. A., Rodríguez-Sosa, M., & Terrazas, L. I. (2018). Early and Partial Reduction in CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cells during Colitis-Associated Colon Cancer Induces CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cell Activation Inhibiting Tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 9(2), 239–249. <https://doi.org/10.7150/jca.21336>
86. Bruns, H. A., Schindler, U., & Kaplan, M. H. (2003). Expression of a constitutively active Stat6 in vivo alters lymphocyte homeostasis with distinct effects in T and B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(7), 3478–3487. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.7.3478>
87. Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., & Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer science*, 94(11), 965–973. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01386.x>
88. Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B., & Robson, S. C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine*, 204(6), 1257–1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20062512>
89. Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M. L., Rossini, P. M., Battistini, L., Röttschke, O., & Falk, K. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110(4), 1225–1232. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-064527>
90. Sallusto, F., Lanzavecchia, A., & Mackay, C. R. (1998). Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunology today*, 19(12), 568–574. [https://doi.org/10.1016/s0167-5699\(98\)01346-2](https://doi.org/10.1016/s0167-5699(98)01346-2)
91. Humbles, A. A., Lu, B., Friend, D. S., Okinaga, S., Lora, J., Al-Garawi, A., Martin, T. R., Gerard, N. P., & Gerard, C. (2002). The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(3), 1479–1484. <https://doi.org/10.1073/pnas.261462598>
92. Fulkerson, P. C., Zimmermann, N., Hassman, L. M., Finkelman, F. D., & Rothenberg, M. E. (2004). Pulmonary chemokine expression is coordinately regulated by STAT1, STAT6, and IFN- $\gamma$ . *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(12), 7565–7574. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.12.7565>



93. Pastille, E., Bardini, K., Fleissner, D., Adamczyk, A., Frede, A., Wadwa, M., von Smolinski, D., Kasper, S., Sparwasser, T., Gruber, A. D., Schuler, M., Sakaguchi, S., Roers, A., Müller, W., Hansen, W., Buer, J., & Westendorf, A. M. (2014). Transient ablation of regulatory T cells improves antitumor immunity in colitis-associated colon cancer. *Cancer research*, 74(16), 4258–4269. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3065>
94. Ishibashi, Y., Tanaka, S., Tajima, K., Yoshida, T., & Kuwano, H. (2006). Expression of Foxp3 in non-small cell lung cancer patients is significantly higher in tumor tissues than in normal tissues, especially in tumors smaller than 30 mm. *Oncology reports*, 15(5), 1315–1319.
95. Ingram, N., Northwood, E. L., Perry, S. L., Marston, G., Snowden, H., Taylor, J. C., Scott, N., Bishop, D. T., Coletta, P. L., & Hull, M. A. (2013). 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*, 34(10), 2341–2349. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt222>
96. Li, B. H., Yang, X. Z., Li, P. D., Yuan, Q., Liu, X. H., Yuan, J., & Zhang, W. J. (2008). IL-4/Stat6 activities correlate with apoptosis and metastasis in colon cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 369(2), 554–560. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.052>
97. Lin, Y., Li, B., Yang, X., Liu, T., Shi, T., Deng, B., Zhang, Y., Jia, L., Jiang, Z., & He, R. (2019). Non-hematopoietic STAT6 induces epithelial tight junction dysfunction and promotes intestinal inflammation and tumorigenesis. *Mucosal Immunology*, 12(6), 1304–1315. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0204-y>
98. Vignali, D. A. A., Collison, L. W., & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nature Reviews Immunology*, 8(7), 523–532. <https://doi.org/10.1038/nri2343>
99. Ling, Z. A., Zhang, L. J., Ye, Z. H., Dang, Y. W., Chen, G., Li, R. L., & Zeng, J. J. (2018). Immunohistochemical distribution of FOXP3+ regulatory T cells in colorectal cancer patients. *International journal of clinical and experimental pathology*, 11(4), 1841–1854.
100. Ma, Q., Liu, J., Wu, G., Teng, M., Wang, S., Cui, M., & Li, Y. (2018). Co-expression of LAG3 and TIM3 identifies a potent Treg population that suppresses macrophage functions in colorectal cancer patients. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, 45(10), 1002–1009. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12992>



101. Clarke, S. L., Betts, G. J., Plant, A., Wright, K. L., El-Shanawany, T. M., Harrop, R., Torkington, J., Rees, B. I., Williams, G. T., Gallimore, A. M., & Godkin, A. J. (2006). CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells suppress anti-tumor immune responses in patients with colorectal cancer. *PloS one*, 1(1), e129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000129>
102. Le Gouvello, S., Bastuji-Garin, S., Aloulou, N., Mansour, H., Chaumette, M. T., Berrehar, F., Seikour, A., Charachon, A., Karoui, M., Leroy, K., Farcet, J. P., & Sobhani, I. (2008). High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas. *Gut*, 57(6), 772–779. <https://doi.org/10.1136/gut.2007.123794>
103. Zorn, E., Nelson, E. A., Mohseni, M., Porcheray, F., Kim, H., Litsa, D., Bellucci, R., Raderschall, E., Canning, C., Soiffer, R. J., Frank, D. A., & Ritz, J. (2006). IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood*, 108(5), 1571–1579. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-004747>
104. Correale, P., Rotundo, M. S., Del Vecchio, M. T., Remondo, C., Migali, C., Ginanneschi, C., Tsang, K. Y., Licchetta, A., Mannucci, S., Loiacono, L., Tassone, P., Francini, G., & Tagliaferri, P. (2010). Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, 33(4), 435–441. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3181d32f01>
105. Loddenkemper, C., Schernus, M., Noutsias, M., Stein, H., Thiel, E., & Nagorsen, D. (2006). In situ analysis of FOXP3+ regulatory T cells in human colorectal cancer. *Journal of translational medicine*, 4, 52. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-4-52>
106. Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C., & Iacopetta, B. (2009). Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(2), 186–192. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.18.7229>

107. Watanabe, K., Rao, V. P., Poutahidis, T., Rickman, B. H., Ohtani, M., Xu, S., Rogers, A. B., Ge, Z., Horwitz, B. H., Fujioka, T., Erdman, S. E., & Fox, J. G. (2008). Cytotoxic-T-lymphocyte-associated antigen 4 blockade abrogates protection by regulatory T cells in a mouse model of microbially induced innate immune-driven colitis. *Infection and immunity*, 76(12), 5834–5842. <https://doi.org/10.1128/IAI.00542-08>
108. Canavan, J. B., Scottà, C., Vossenkämper, A., Goldberg, R., Elder, M. J., Shoval, I., Marks, E., Stolarczyk, E., Lo, J. W., Powell, N., Fazekasova, H., Irving, P. M., Sanderson, J. D., Howard, J. K., Yagel, S., Afzali, B., MacDonald, T. T., Hernandez-Fuentes, M. P., Shpigel, N. Y., Lombardi, G., ... Lord, G. M. (2016). Developing in vitro expanded CD45RA+ regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn's disease. *Gut*, 65(4), 584–594. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306919>
109. Clough, J. N., Omer, O. S., Tasker, S., Lord, G. M., & Irving, P. M. (2020). Regulatory T-cell therapy in Crohn's disease: challenges and advances. *Gut*, 69(5), 942–952. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319850>.

## Anexos

1. **Delgado-Ramirez, Y.**, Ocaña-Soriano, A., Ledesma-Soto, Y., Olguín, J. E., Hernandez-Ruiz, J., Terrazas, L. I., & Leon-Cabrera, S. (2021). STAT6 Is Critical for the Induction of Regulatory T Cells In Vivo Controlling the Initial Steps of Colitis-Associated Cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 4049. <https://doi.org/10.3390/ijms22084049>
2. **Delgado-Ramirez, Y.**, Baltazar-Perez, I., Martinez, Y., Callejas, B. E., Medina-Andrade, I., Olguín, J. E., Delgado-Buenrostro, N. L., Chirino, Y. I., Terrazas, L. I., & Leon-Cabrera, S. (2021). STAT1 Is Required for Decreasing Accumulation of Granulocytic Cells via IL-17 during Initial Steps of Colitis-Associated Cancer. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7695. <https://doi.org/10.3390/ijms22147695>
3. **Delgado-Ramirez, Y.**, Colly, V., Gonzalez, G. V., & Leon-Cabrera, S. (2020). Signal transducer and activator of transcription 6 as a target in colon cancer therapy. *Oncology letters*, 20(1), 455–464. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11614>
4. Leon-Cabrera, S., Vázquez-Sandoval, A., Molina-Guzman, E., **Delgado-Ramirez, Y.**, Delgado-Buenrostro, N. L., Callejas, B. E., Chirino, Y. I., Pérez-Plasencia, C., Rodríguez-Sosa, M., Olguín, J. E., Salinas, C., Satoskar, A. R., & Terrazas, L. I. (2018). Deficiency in STAT1 Signaling Predisposes Gut Inflammation and Prompts Colorectal Cancer Development. *Cancers*, 10(9), 341. <https://doi.org/10.3390/cancers10090341>
5. Leon-Cabrera, S. A., Molina-Guzman, E., **Delgado-Ramirez, Y. G.**, Vázquez-Sandoval, A., Ledesma-Soto, Y., Pérez-Plasencia, C. G., Chirino, Y. I., Delgado-Buenrostro, N. L., Rodríguez-Sosa, M., Vaca-Paniagua, F., Ávila-Moreno, F., Gutierrez-Cirlos, E. B., Arias-Romero, L. E., & Terrazas, L. I. (2017). Lack of STAT6 Attenuates Inflammation and Drives Protection against Early Steps of Colitis-Associated Colon Cancer. *Cancer immunology research*, 5(5), 385–396. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-16-0168>



Communication

# STAT6 Is Critical for the Induction of Regulatory T Cells In Vivo Controlling the Initial Steps of Colitis-Associated Cancer

Yael Delgado-Ramirez<sup>1</sup>, Angel Ocaña-Soriano<sup>1</sup>, Yadira Ledesma-Soto<sup>1</sup>, Jonadab E. Olguín<sup>1,2</sup>,  
Joselín Hernández-Ruiz<sup>3</sup> , Luis I. Terrazas<sup>1,2</sup> and Sonia Leon-Cabrera<sup>1,4,\*</sup>

- <sup>1</sup> Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Edo. De México 54090, Mexico; sonr\_sanjlv@hotmail.com (Y.D.-R.); angelaos\_7@outlook.com (A.O.-S.); lesy\_790413@yahoo.com.mx (Y.L.-S.); je.olguin@iztacala.unam.mx (J.E.O.); literrazas@unam.mx (L.I.T.)
  - <sup>2</sup> Laboratorio Nacional en Salud, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Edo. De México 54090, Mexico
  - <sup>3</sup> Servicio de Farmacología Clínica, Hospital General de México Dr. Eduardo Liceaga, Mexico City 06720, Mexico; hernandezjoselin@hotmail.com
  - <sup>4</sup> Carrera de Médico Cirujano, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Edo. De México 54090, Mexico
- \* Correspondence: soleonca@comunidad.unam.mx; Tel.: +52-55-5623-1333 (ext. 39782)



**Citation:** Delgado-Ramirez, Y.; Ocaña-Soriano, A.; Ledesma-Soto, Y.; Olguín, J.E.; Hernández-Ruiz, J.; Terrazas, L.I.; Leon-Cabrera, S. STAT6 Is Critical for the Induction of Regulatory T Cells In Vivo Controlling the Initial Steps of Colitis-Associated Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4049. <https://doi.org/10.3390/ijms22084049>

Academic Editor: Marco Erreni

Received: 24 March 2021

Accepted: 9 April 2021

Published: 14 April 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Inflammation is the main driver of the tumor initiation and progression in colitis-associated colorectal cancer (CAC). Recent findings have indicated that the signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) plays a fundamental role in the early stages of CAC, and STAT6 knockout (STAT6<sup>-/-</sup>) mice are highly resistant to CAC development. Regulatory T (Treg) cells play a major role in coordinating immunomodulation in cancer; however, the role of STAT6 in the induction and function of Treg cells is poorly understood. To clarify the contribution of STAT6 to CAC, STAT6<sup>-/-</sup> and wild type (WT) mice were subjected to an AOM/DSS regimen, and the frequency of peripheral and local Treg cells was determined during the progression of CAC. When STAT6 was lacking, a remarkable reduction in tumor growth was observed, which was associated with decreased inflammation and an increased number of CD4+CD25+Foxp3+ cells in the colon, circulation, and spleen, including an over-expression of TGF-beta, IL-10, and Foxp3, compared to WT mice, during the early stages of CAC development. Conversely, WT mice showed an inverse frequency of Treg cells compared with STAT6<sup>-/-</sup> mice, which was followed by intestinal tumor formation. Increased mucosal inflammation, histological damage, and tumorigenesis were restored to levels observed in WT mice when an early inhibition/depletion of Treg cells was performed in STAT6<sup>-/-</sup> mice. Thus, with STAT6 deficiency, an increased number of Treg cells induce resistance against tumorigenesis, arresting tumor-promoting inflammation. We reported a direct role of STAT6 in the induction and function of Treg cells during CAC development and suggest that STAT6 is a potential target for the modulation of immune response in colitis and CAC.

**Keywords:** STAT6; colorectal cancer; regulatory T cells; colitis-associated-cancer

## 1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most commonly diagnosed neoplasm, with the second highest cancer-associated mortality rate in the world [1]. In 2018, a total of 881,000 deaths associated with CRC were reported, and 1.8 million newly diagnosed cases were registered worldwide [2]. Epidemiological studies suggest that chronic inflammatory processes, such as ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), are associated with the risk of developing colitis-associated colorectal cancer (CAC). The relationship between inflammation-dysplasia and cancer in CAC has been well established, supporting the idea that chronic inflammation is the main driving force associated with carcinogenesis [3,4].

The signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) is a member of the STAT family of proteins formed by seven transcription factors involved in cytokine-related signaling [5]. In particular, STAT6 participates in the cellular response to interleukin- (IL-) 4 and IL-13 and it is involved in the generation of CD4<sup>+</sup> Th2 cells [5]. Recently, STAT6 signaling has been associated with the initiation of malignant transformation and tumor establishment, and STAT6-phosphorylation has frequently been found in malignant cells that regulate several genes crucial for the immune response and proliferation [6]. The persistent activation of STAT6 has been observed in the development of prostate, breast, and colon carcinomas [7–9]. Patients with colorectal cancer exhibit a significant STAT6 activity in the colonic epithelium, and STAT6 expression is associated with lower survival rates, lymph node metastasis, changes in the epithelial barrier function, and alterations in the inflammatory response [9–12].

Previously, we demonstrated that STAT6 plays important roles in the early stages of CAC, and it modulates inflammatory responses, while controlling cell recruitment and proliferation in the colon [13]. The induction of CAC in STAT6-deficient mice (STAT6<sup>-/-</sup>) in an azoxymethane (AOM)/DSS model resulted in a reduced tumorigenicity, associated with reduced inflammation, decreased concentrations of cyclooxygenase-2 (Cox-2) and nuclear  $\beta$ -catenin protein in the colon, and decreased mRNA expression levels of IL-17A and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [13]. In addition, the number of circulating inflammatory monocytes and granulocytes was decreased in STAT6<sup>-/-</sup> mice, suggesting that immunoregulatory mechanisms are involved.

Regulatory T (Treg) cells play a major role in coordinating immunomodulation during CRC [14]. Foxp3 is a transcription factor essential for the initiation and maintenance of the Treg-suppressive phenotype. The infiltration of Treg cells in the colon has been positively correlated with lymph node metastasis and increased degree of malignancy [15]. However, recent studies have found that high densities of intra-tumoral Foxp3(+) T cells in an earlier CRC stage showed a positive correlation with overall survival [16–19], and distinct subpopulations of tumor-infiltrating Foxp3(+) T cells contribute in opposing ways to the determination of CRC prognosis [20]. In an experimental CAC model, the frequency and suppressive capacity of Treg cells and the expression of Tim-3, PD-1, and CD127 molecules were increased in late-stage of CAC [21]. Conversely, in early CAC, a reduced percentage of Treg cells and decreased expression of molecules that correlate with suppression were detected in the blood and spleen [21], suggesting that Treg cells could modify their phenotype depending on the grade of alterations in CRC.

STAT6 is implicated in the regulation of T cell proliferation and in the activity of Treg cells through a direct interaction with the transcription factor, Foxp3. Mice expressing an active form of STAT6 have reduced T cell numbers [22]. Indeed, in a model of TCR transgenic mice, the absence of STAT6 impaired the generation of antigen-specific CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells, indicating the role of the STAT6 pathway in the induction of Foxp3 expression [23]. A highly conserved STAT-binding site, located in the first intron of the FOXP3 gene, has been reported [24], and a chromatin immunoprecipitation assay identified a silencing region in the Foxp3 transcript, with a specific binding site for STAT6, preventing Foxp3 mRNA expression [25]. In a murine model of allergic lung inflammation, STAT6<sup>-/-</sup> mice were highly resistant to airway eosinophilia, which is correlated with a high number of Treg cells in the lungs and spleens, compared to wild-type animals [26]. The depletion of Treg cells partially restores airway inflammation and remodeling in STAT6<sup>-/-</sup> mice [26]. Together, these findings suggest that STAT6 may play a critical role regulating the function of Treg cells. Thus, the effects of STAT6 on Treg cells in CAC need to be further elucidated.

We have shown that STAT6 deficiency prevents tumorigenesis in an AOM/DSS mouse model by reducing the infiltration of inflammatory cells and down-regulating inflammatory mediators in a disease stage-dependent manner, and we have raised the possibility that STAT6 could also play a yet undetermined function in the development of Treg cells in CAC progression. In the present study, we evaluated the frequency of peripheral and local Treg cells in the course of CAC during STAT6 deficiency and analyzed the effect of Treg

cells depletion in the early stages of tumor progression. Interestingly, we found that tumor growth was restored in STAT6<sup>-/-</sup> mice with the Treg cells reduction, and extensive chronic inflammation was reestablished. Thus, the STAT6 pathway is critical for modulating the activity of Treg cells in the early stages of CAC. With STAT6 deficiency, increased Treg populations induce resistance against tumor-promoting inflammation, and tumorigenesis is therefore stopped.

## 2. Results

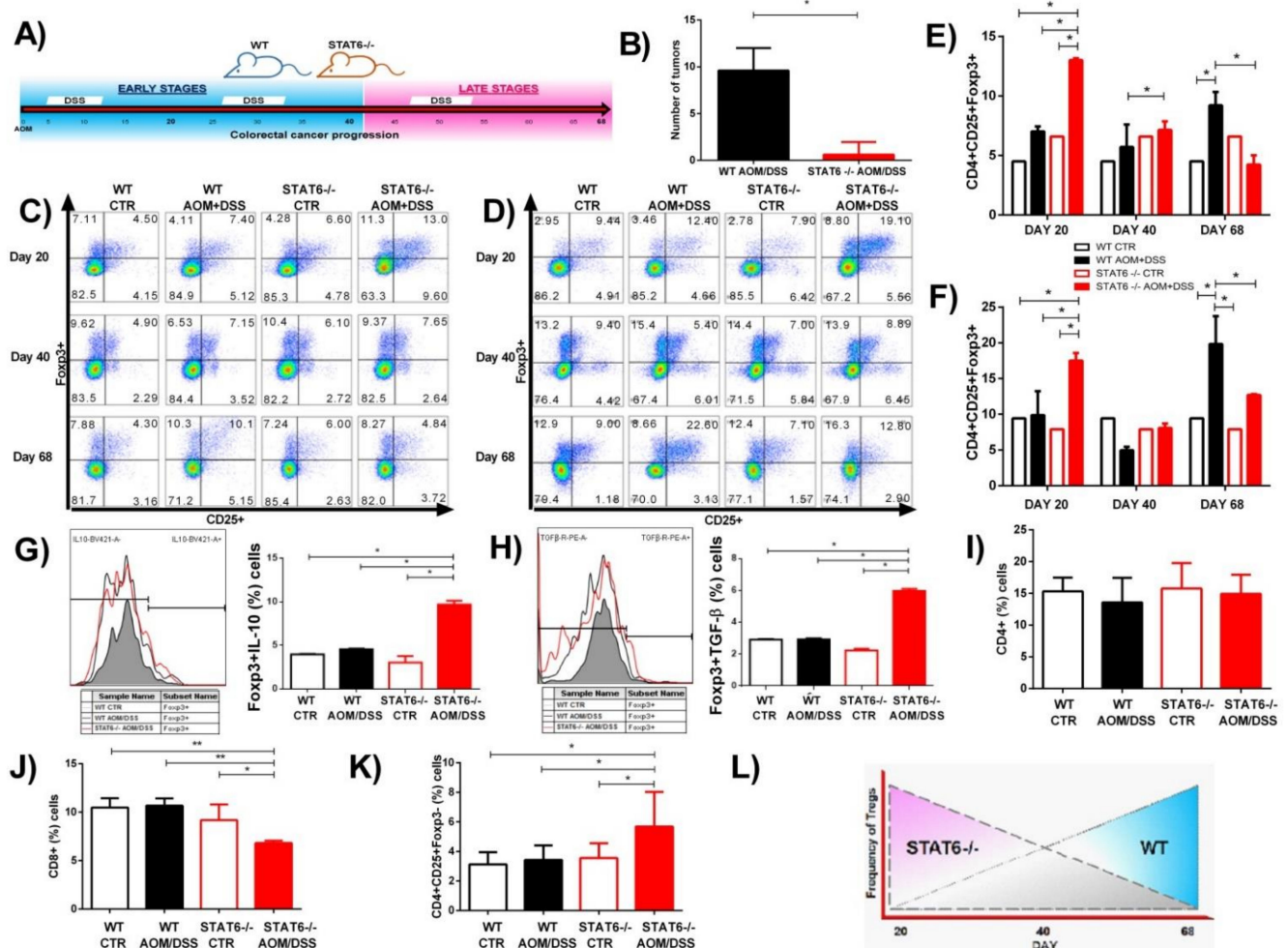
### 2.1. The Absence of STAT6 Increases the Number of CD4+CD25+Foxp3+ Cells in Circulation and Spleen during the Early Stages of CAC Development

Previously, we determined the role of STAT6 in the development of CAC using the azoxymethane (AOM)/dextran sodium sulfate (DSS) model [13]. STAT6-deficient mice display high resistance to CAC development. The reduced tumorigenicity was associated with diminished inflammation, without changes in the number of goblet cells, and a decreased mRNA expression of IL-17A and TNF $\alpha$  but increased IL-10 expression in early CAC (Day-20), compared to WT mice [13]. Considering that the inflammation is the main driver of tumor initiation in CAC, one potential mechanism contributing to the suppression of the inflammatory response in STAT6<sup>-/-</sup> mice may be an increased recruitment of Treg cells. Patients with more Foxp3+ cells in CAC tended to have a better prognosis [18]. To test this hypothesis, we subjected WT and STAT6<sup>-/-</sup> mice to an AOM/DSS regimen and analyzed the CAC progression at Day 20, Day 40 (early stages), and Day 68 (late stage of tumor development, where adenoma-like lesions are observed) as an approximation of different stages of tumor progression (Figure 1A). As expected, the WT mice displayed both increased numbers of tumors as well as increased tumor load at Day 68 ( $9.6 \pm 2.4$ ), whereas only 30% of STAT6<sup>-/-</sup> animals developed tumors, and they were scarce ( $0.6 \pm 1.3$ ,  $p < 0.05$ ) (Figure 1B). Next, we analyzed the kinetics of Treg cells (CD4+CD25+Foxp3+) at Day 20, Day 40, and Day 68 after AOM injection by flow cytometry in blood and spleens (Figure 1C,D). In the WT AOM/DSS animals, Treg cells were maintained at a similar frequency as those in control animals in the blood and spleen at Day 20 and Day 40. However, remarkably, a significant increase in the frequency of Treg cells was observed at Day 68, compared to the control and STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS mice ( $9.44 \pm 0.1$  vs.  $19.85 \pm 3.8$ ,  $p < 0.05$ ;  $12.7 \pm 0.1$  vs.  $19.85 \pm 3.8$ ,  $p < 0.05$ ) (Figure 1C–F). In contrast, we found an increased Treg frequency in the blood and spleen of STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS animals at Day 20 (early stages of tumor development), compared to the control and WT AOM/DSS mice ( $17.5 \pm 1$  vs.  $9.44 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$ ;  $17.5 \pm 1$  vs.  $9.8 \pm 3.3$ ,  $p < 0.05$ ) (Figure 1C–F). There was no difference in the frequency of Treg cells between the STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS, WT AOM/DSS, and control mice at Day 40. However, at Day 68, the Treg cells frequency dropped in STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS animals to similar levels as those in control mice, which is consistent with the fact that there was a lower tumor load (Figure 1C–F). Given that the secretion of suppressive cytokines, such as TGF- $\beta$  and IL-10, has been considered a mechanism used by Treg cells to suppress the immune responses [14], we decided to evaluate whether Treg cells isolated from spleens with early-stage CAC development (Day 20) may show a different expression of these cytokines under STAT6 deficiency. As shown in Figure 1G,H, at Day 20 of the CAC progression, we observed a higher expression of TGF- $\beta$  and IL-10 cytokines in CD4+CD25+Foxp3+ cells (Figure 1H) from STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS compared to WT AOM/DSS mice. In addition, the frequency of CD4+ cells at Day 20 in the STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS and WT AOM/DSS animals was similar (Figure 1I). However, at this time, the proportion of CD8+ cells was lower in the STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS in comparison to the WT AOM/DSS mice (Figure 1J). At Day 20, the number of CD4+CD25+Foxp3- cells was higher in STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS mice compared to WT AOM/DSS animals (Figure 1K).

Therefore, we detected an inverse frequency of Treg cells between WT AOM/DSS and STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS mice as CAC progressed (Figure 1L). At early stages of the CAC induction, tumor-bearing WT mice only reached 9.8% of Treg cells, while STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS mice reached 17.5% at the same time point of analysis. However, as CAC progressed, the percentage of Treg cells dropped significantly in the STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS



(12.7%) animals but was significantly increased in the WT AOM/DSS mice (19.85%) (Figure 1L). These results suggest that STAT6 may influence the induction of Treg cells in vivo in the initial stages of CAC development.

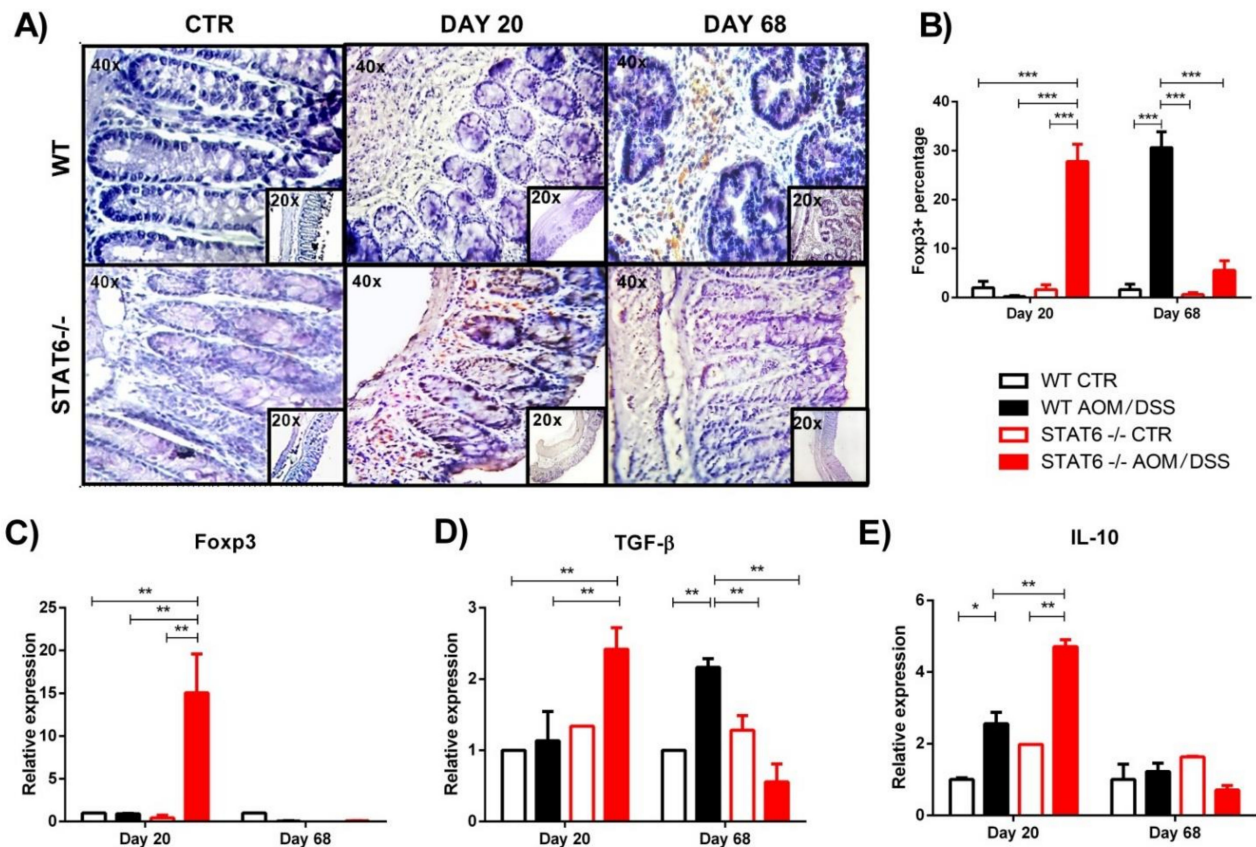


**Figure 1.** STAT6<sup>-/-</sup> animals display twice the percentage of CD4+CD25+Foxp3<sup>+</sup> Treg cells during early colitis-associated colorectal cancer (CAC) development. (A) Schematic time schedule of azoxymethane (AOM) and dextran sodium sulfate (DSS) administration in WT and STAT6<sup>-/-</sup> mice. After the initial AOM injection (12.5 mg/kg), DSS was given in drinking water for 7 days, followed by 14 days of regular drinking water. The mice were sacrificed on Day 20, Day 40 (early tumor development), and Day 68 (late tumor development), after an AOM injection. (B) The number of colorectal tumors in the WT and STAT6<sup>-/-</sup> mice 68 days after the AOM/DSS administration. The circulating and spleen cells were obtained from the WT or STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS-treated or control mice at the indicated time intervals and were analyzed for the expression of Foxp3 and CD25 in living CD4<sup>+</sup> cell populations by flow cytometry. Representative dot plots in total blood (C) and in splenocytes (D). (E,F) The frequencies of CD4+CD25+Foxp3<sup>+</sup> cells in the blood (E) and splenocytes (F). (G,H) IL-10 (G) and TGF- $\beta$  (H) expressions in CD4+CD25+Foxp3<sup>+</sup> cells in the splenocytes of the WT or STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS-treated or control mice. Representative histogram plots are shown, as well as graphs showing the percentages of positive cell populations. (I–K) The frequencies of total CD4<sup>+</sup> cells (I), CD8<sup>+</sup> T cells (J), and CD4+CD25+Foxp3<sup>-</sup> (activated cells) (K) in the peripheral blood at Day 20. (L) The inverse frequency of Treg cells in the WT or STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS-treated animals as CAC progressed. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM and are representative of two independent experiments with at least three mice per group per day of the analysis. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

## 2.2. STAT6 Deficiency Increase the Accumulation of Treg Cells in the Colon in Early CAC

The defective colonic inflammatory response observed in the STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS mice at early stages of CAC, which is correlated with few tumor developments, led us to examine the local recruitment of Treg cells. We analyzed the colonic protein expression

of Foxp3 by immunohistochemistry during early and late stages of colon tumorigenesis. Our analysis revealed a significant increased accumulation of Foxp3<sup>+</sup> cells in the colon of the STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS mice, compared to the WT AOM/DSS animals, at Day 20 of the CAC progression ( $27.8 \pm 7.8$  vs.  $0.2 \pm 0.05$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 2A,B). In contrast, during the advanced stages of tumor development (Day 68), the Foxp3<sup>+</sup> cells were significantly higher in the tumor-bearing WT mice, compared to the STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS animals, ( $30.6 \pm 7.3$  vs.  $5.6 \pm 4.2$ ,  $p < 0.001$ ) (Figure 2A,B). Colonic biopsies of the control mice showed barely detectable Foxp3 staining (Figure 2A,B).



**Figure 2.** A more pronounced expression of the Foxp3 protein and mRNA in the colon of STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS-treated animals was observed during early CAC development. (A) A representative example of Foxp3 expression evaluated immunohistochemically in intestinal biopsies from the WT or STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS-treated or control mice at Day 20 and Day 68 of the AOM/DSS administration. The sections of tissue were analyzed at 20× and 40× using an optical microscope (B) The average percentages of Foxp3<sup>+</sup> cells in the colon at Day 20. The quantification of Foxp3<sup>+</sup> cells was performed using ImageJ software v.1.48 by counting cells in 10 high-powered fields, with at least three slides per animal. (C–E) The quantitative real-time PCR analysis of the colonic mRNA expression of Foxp3 (C), TGF-β (D), and IL-10 (E) in the WT or STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS-treated or control mice at Day 20 of the AOM administration. The data are expressed as the mean ± SEM and are representative of two independent experiments, with at least three mice per group per day of the analysis. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Next, we analyzed the colonic mRNA expression of Foxp3. Similar to the immunohistochemistry results, the relative expression of Foxp3 was significantly higher in the STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS mice, compared to the WT AOM/DSS mice, at Day 20 ( $15 \pm 6.4$  vs.  $0.9 \pm 0.07$ ,  $p < 0.05$ ) (Figure 2C). No differences were observed in the Foxp3 expression at Day 40 and Day 68 between the groups (Figure 2C).

To corroborate our findings in the peripheral blood and spleen, we analyzed the gene expression in the colon of TGF-β and IL-10 cytokines that promote the suppressive function of Treg cells. We observed a significant increase levels of TGF-β transcripts in the colons of the STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS mice, compared to the WT AOM/DSS mice, at



Day 20 ( $2.4 \pm 0.5$  vs.  $1.13 \pm 0.71$ ;  $p < 0.001$ ) (Figure 2D). On the contrary, the expression of TGF- $\beta$  mRNA was increased in the colons of the tumor-bearing WT mice, compared to the STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS animals, at Day 68 of the CAC progression ( $2.1 \pm 0.2$  vs.  $0.5 \pm 0.4$ ;  $p < 0.01$ ) (Figure 2D). At day 20, IL-10 levels were also increased in STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS mice compared to the WT AOM/DSS mice ( $4.7 \pm 0.2$  vs.  $2.5 \pm 0.5$ ,  $p < 0.01$ ) (Figure 2E). Interestingly, we observed similar IL-10 mRNA transcripts in the colon of both the WT and STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS-treated mice during the advanced stages of tumor development (Figure 2E). Taken together, our results demonstrate that STAT6 deficiency promotes the development of Treg cells responses during early CAC.

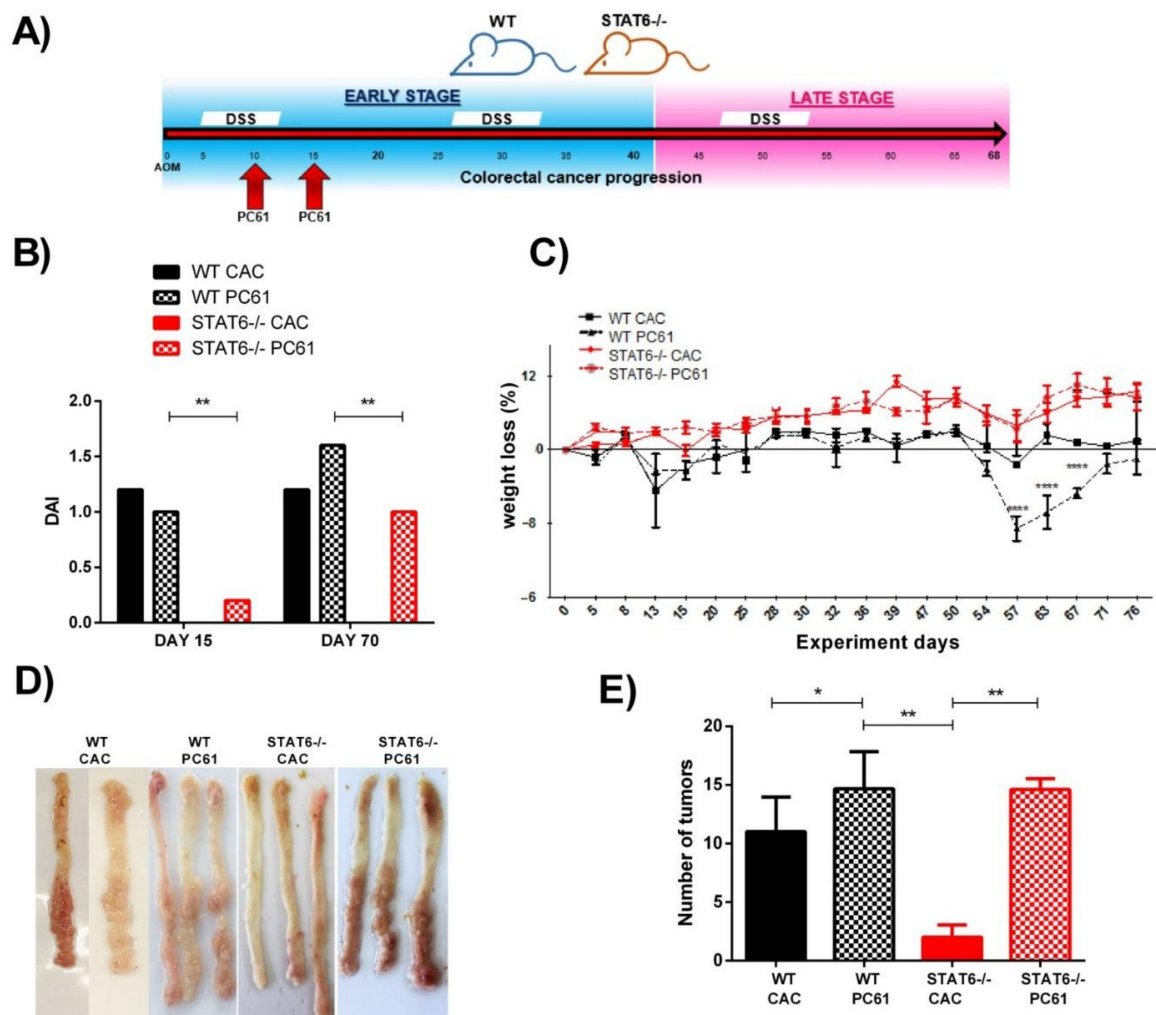
### 2.3. Treg Cells Depletion during Early CAC Restores Tumor Development in STAT6-Deficient Mice

We observed that the STAT6<sup>-/-</sup> mice had twice the Treg cells (CD4+CD25+Foxp3+) in the peripheral blood and spleen than the WT mice during the initial stages of the CAC development. In addition, an increased mRNA and protein Foxp3 expression was observed at Day 20 in the STAT6<sup>-/-</sup> AOM/DSS colons, which are highly resistant to CAC development. Thus, to investigate the interaction between Treg cells and STAT6 during early CAC, we hypothesized that if the observed increase in Treg numbers was responsible for the resistance of the STAT6<sup>-/-</sup> mice to tumor development, then the depletion of Treg cells would restore inflammation and tumorigenesis to the levels observed in WT mice. To test this hypothesis, we provided an AOM/DSS regimen to the STAT6<sup>-/-</sup> and WT mice and at Days 10 and 15, the animals were treated with the PC61 clone of anti-mouse CD25 antibody (Figure 3A). The use of PC61 to deplete Treg cells has been shown previously [27].

Then, we evaluated the CAC progression for 77 days. We monitored the stool consistency and changes in body weight and tumor development. As expected, the WT CAC mice, treated or untreated with PC61 antibody, rapidly showed piloerection and clinical signs of the disease (DAI) throughout the experiment (Figure 3B) and concomitant weight loss (Figure 3C). Conversely, the STAT6<sup>-/-</sup> CAC mice did not have diarrhea or rectal bleeding during the treatment, compared with the similarly treated WT animals (Figure 3B). However, when the STAT6<sup>-/-</sup> animals received the PC61 antibody, they showed an increased DAI score, particularly during late CAC development compared to the STAT6<sup>-/-</sup> CAC mice (Figure 3B). In addition, STAT6<sup>-/-</sup> PC61 animals showed less body weight loss when compared to the WT CAC and WT PC61 mice (Figure 3C). Interestingly, in the necropsy on Day 77, only 30% of the STAT6<sup>-/-</sup> CAC mice developed tumors, whereas 100% of the STAT6<sup>-/-</sup> PC61 animals displayed reddish polypoid tumors in the medial and distal zones of the colon, macroscopic damage, and pathologic alterations, which were similar to the lesions observed in the WT CAC mice (Figure 3D). Additionally, the tumor load in the WT CAC, WT PC61, and STAT6<sup>-/-</sup> PC61 mice was similar (Figure 3E), demonstrating that STAT6-deficient mice can be made susceptible to CAC development through the early depletion of Treg cells.

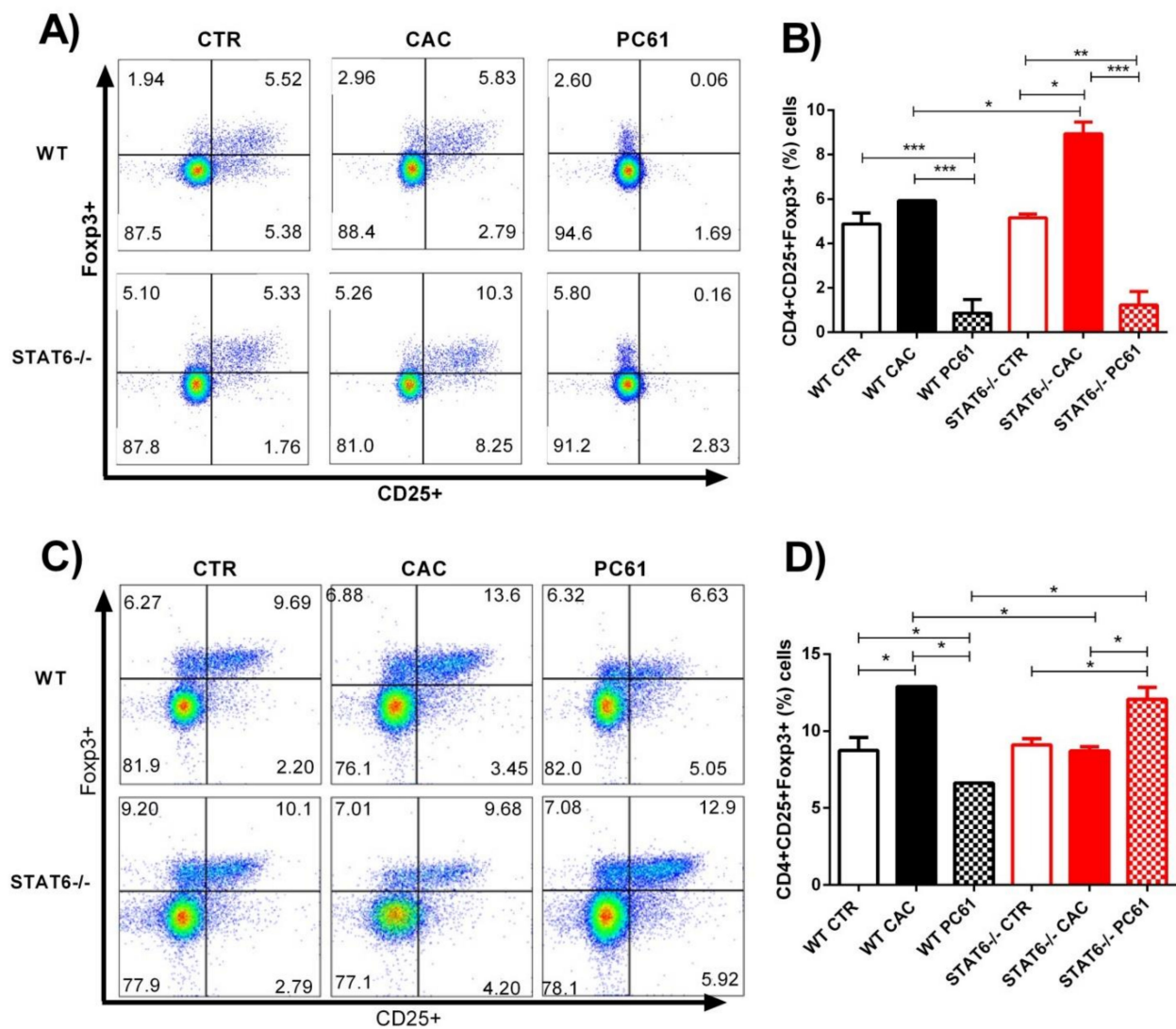
### 2.4. Injection of PC61 Antibody during Early CAC in STAT6<sup>-/-</sup> Mice Promotes Histological Damage

Previous studies have shown that the in vivo depletion of Treg cells by a single injection of the PC61 antibody reaches its peak on Day 8 and remains for 12 days [27]. To validate the use of PC61, we tested the extent of the Treg cell depletion 5 and 71 days after the PC61 antibody administration in the WT and STAT6<sup>-/-</sup> mice, according to the schedule provided in Figure 3A. In the WT and STAT6<sup>-/-</sup> CAC-induced mice, around 70% of the CD4+Foxp3+ cells express high levels of CD25, while the remaining cells expressed low levels or no CD25 (Figure 4A, middle panel). In the peripheral blood, five days after the PC61 administration, the CD4+CD25+Foxp3+ cells decreased significantly from  $5.9 \pm 1.2$  to  $0.86 \pm 0.08$ ,  $p < 0.05$  in the WT CAC mice, and from  $8.9 \pm 1$  to  $1.2 \pm 1$ ,  $p < 0.05$  in the STAT6<sup>-/-</sup> CAC mice (Figure 4A,B). Thus, in response to the PC61 injection, around 75% of the CD4+CD25+Foxp3+ cells were depleted in the peripheral blood, while the CD4+CD25-Foxp3+ cells persisted (Figure 4A, right panel).



**Figure 3.** Depletion of Treg cells with anti-CD25 antibody (PC61) during early CAC restores tumor development in STAT6<sup>-/-</sup> mice. (A) A schematic time schedule of the PC61 antibody administration in the WT and STAT6<sup>-/-</sup> mice that received the AOM/DSS administration (CAC-induced mice). After 10 and 15 days, the groups of WT or STAT6<sup>-/-</sup> CAC-induced mice were injected i.p. with 200  $\mu$ g of PC61 antibody. The CAC progression was analyzed over 77 days. (B–E) The disease activity index (DAI) (B), body weight loss (C), representative photographs of colons opened longitudinally, showing macroscopic aspects (D), and number of tumors (E) on Day 77, after the AOM/DSS administration in the WT CAC, WT PC61, STAT6<sup>-/-</sup> CAC, and STAT6<sup>-/-</sup> PC61 mice, are shown. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM and are representative of two independent experiments, with at least five mice per group. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.001$ .

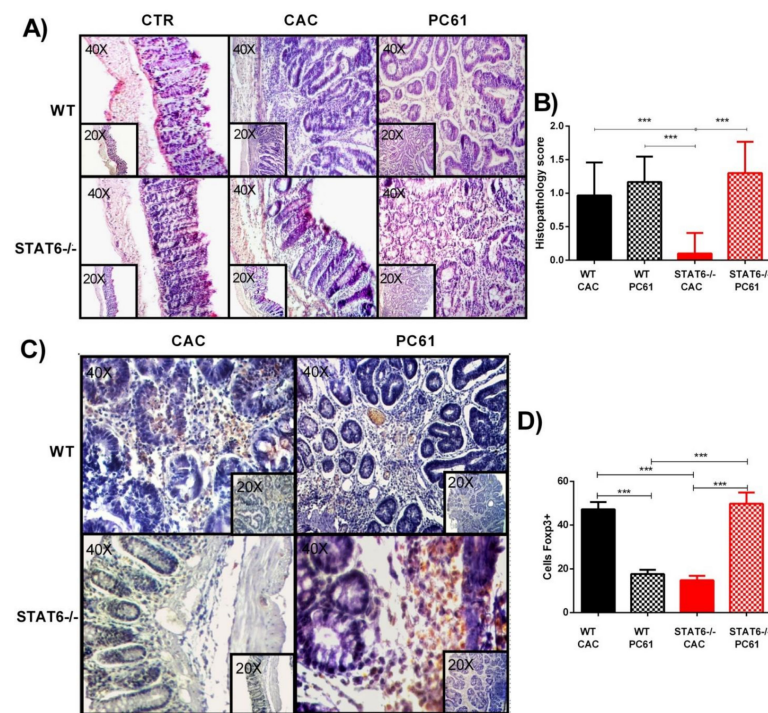
Next, we decided to determine if the early depletion of Treg cells during CAC development remained until Day 77, when late-stage tumorigenesis was observed. As shown in Figure 4C,D, the WT CAC mice that did not receive the PC61 antibody showed a significant increased frequency of CD4+CD25+Foxp3+ cells in the peripheral blood, compared to the WT CTR mice ( $12.9 \pm 0.2$  vs.  $8.7 \pm 1.4$ ;  $p < 0.05$ ). However, the WT PC61 mice had a slightly decreased in the frequencies of Treg cells, compared to the WT CTR mice ( $12.9 \pm 0.2$  vs.  $6.63 \pm 0.6$ ;  $p < 0.05$ ). The STAT6<sup>-/-</sup> CAC mice had similar percentages of Treg cells ( $8.7 \pm 0.6$ ) as the STAT6<sup>-/-</sup> CTR mice ( $9.11 \pm 0.6$ ) (Figure 4C,D). Interestingly, in the STAT6<sup>-/-</sup> PC61 mice, there was a significant increase in the frequency of CD4+CD25+Foxp3+ cells, compared to the STAT6<sup>-/-</sup> CAC mice ( $12.9 \pm 0.2$  vs.  $8.7 \pm 0.6$ ;  $p < 0.05$ ). Additionally, the percentages of Treg cells in the STAT6<sup>-/-</sup> PC61 mice were similar to those in the WT CAC mice, showing that the use of this antibody during the early stages of carcinogenesis impacted the recruitment of Treg cells under STAT6 deficiency.



**Figure 4.** Treatment with anti-CD25 antibody (PC61) during early CAC. The treatment of the mice is shown in Figure 3A. At Day 25 and Day 77, different populations of circulating cells were analyzed by flow cytometry. (A) Representative dot plots (A,C) and frequencies (B,D) of the CD4+CD25+Foxp3+ cells from the WT CAC or STAT6<sup>-/-</sup> CAC and PC61-treated WT or STAT6<sup>-/-</sup> mice at Day 25 (A,B) or Day 77 (C,D) after the AOM/DSS administration. The data are expressed as the mean  $\pm$  SEM and are representative of two independent experiments, with at least three mice per group per day of the analysis. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Next, we analyzed the consequences of Treg cells depletion at the local level. Histological analysis revealed that the STAT6<sup>-/-</sup> PC61 mice displayed intense inflammatory cell infiltration, accompanied by a worse structural integrity, compared to the STAT6<sup>-/-</sup> CAC mice (Figure 5A). High-grade-dysplasia areas were alternated with normal areas in the intestinal tissue of the STAT6<sup>-/-</sup> PC61 mice, which was like to the histological damage observed in the WT CAC and WT PC61 mice (Figure 5A,B). Additionally, Foxp3+ cells were clearly observed in the intestine of the WT CAC mice during the late stages of tumor progression (Day 76) (Figure 5C). However, colonic tissue from the WT PC61 mice displayed a significantly lower Foxp3 expression at the same time (Figure 5D). In contrast, the Foxp3+ cells were elevated in the colonic tumors of the STAT6<sup>-/-</sup> PC61 animals during the late stages of CAC development, compared to the STAT6<sup>-/-</sup> CAC and WT PC61 mice (Figure 5C,D). Taken together, our results suggest that the Treg cell populations in the tumor microenvironment and peripheral organs prevent tumor progression in STAT6<sup>-/-</sup> mice.





**Figure 5.** Treatment with anti-CD25 antibody (PC61) favors histological damage in STAT6<sup>-/-</sup> mice. (A) H&E sections and the histological score (B) of the colons isolated from the WT CAC or STAT6<sup>-/-</sup> CAC and PC61-treated WT or STAT6<sup>-/-</sup> mice at day 77 after the AOM administration. (C) A representative example of Foxp3 expression evaluated immunohistochemically in intestinal biopsies of the WT CAC, WT PC61 or STAT6<sup>-/-</sup> CAC, and STAT6<sup>-/-</sup> PC61 mice at day 77 after the AOM administration. (D) The average percentages of Foxp3<sup>+</sup> cells in the colon at day 77. The quantification of Foxp3<sup>+</sup> cells was performed using ImageJ software v.1.48 by counting cells in 10 high-powered fields in at least three slides per animal. The sections of tissue were analyzed at 20× and 40× using an optical microscope. The data are expressed as the mean ± SEM and are representative of two independent experiments, with at least three mice per group per day of the analysis. \*\*\*  $p < 0.001$ .

### 3. Discussion

STAT6 has important roles in the function and activation of immune cells. Here, we showed that STAT6 deficiency is necessary for controlling tumor growth in a model of CAC. Mechanistically, the absence of STAT6 resulted in an increased accumulation of local and peripheral Treg cells and an overexpression of molecules associated with the function of Treg cells during the initial stages of CAC. These data are in accordance with our previous analyses, where the colons of STAT6<sup>-/-</sup> mice showed a reduction in cell infiltration and decreased production of proinflammatory markers and cytokines in the initial tumor stage [13]. An early depletion of Treg cells during CAC development in STAT6<sup>-/-</sup> mice restores tumor growth, along with inflammatory infiltration in the colon. These data identify STAT6 as a critical pathway for the induction and function of Treg cells during CAC progression.

IL-4 and IL-13 are canonical inducers of STAT6 activation, when dimers of STAT6 become phosphorylated and are translocated to the nucleus, where they activate or repress target genes. Phospho-STAT6 (p-STAT6) levels have been commonly detected in the colon of patients with clinically detectable CD or UC, and tumoral p-STAT6 is positively correlated to a clinical stage and poor prognosis of human CRC [9,12]. The STAT6 signaling pathway favors the expression of anti-apoptotic proteins [11] and promotes the proliferation of polyp epithelial cells in the colon [12]. Similarly, the persistent activation of STAT6 modifies the expression of proteins involved in epithelial barrier permeability and interrupts tight junction integrity, resulting in the recurrent exposure of luminal microbiota, favoring

inflammation and CAC development [12,28]. While these findings suggest the intrinsic importance of STAT6 in regulating tumor growth, our studies have found an important role of STAT6 in non-tumor cells for controlling tumor growth. AOM/DSS administration resulted in a significant decrease in inflammation and tumor development under STAT6 deficiency. In addition, in the STAT6<sup>-/-</sup> animals, we found a remarkable increase in the frequency of Treg cells during early CAC, relative to the WT mice. The relationship between STAT6 and immune cells was shown to be important in a model of oxazolone-induced colitis, where T cells, macrophages, and natural killer T cells exhibit an increased STAT6 phosphorylation during colitis development [28]. Additionally, ApcMin/+Stat6<sup>-/-</sup> mice developed few polyps, with a reduced proliferation at the small intestine and MDSCs expansion, decreased PD-1 expression in CD4+ cells, and strong CD8-mediated cytotoxic response [29].

Treg cells have an oncogenic role in tumor progression through the suppression of antitumor immunity and prevention of an active cytotoxic process [30]. Chemokines and cytokines are released in the tumor microenvironment (TME) by cancer cells and tumor stroma-infiltrating cells, leading to the recruitment of Treg cells. In the TME of many tumors, Treg cells suppress effector immune responses, overwhelming the anti-tumor activity mediated by natural killer cells and cytotoxic CD8+ T cells. However, the role of Treg cells in CRC is controversial. Some reports relate Foxp3+ cell infiltration with poor clinical outcomes [31–33]. The colonic increase in Foxp3(+) cells is significantly higher in patients with CRC, compared to healthy controls or patients with inflammatory bowel disease [34], and Treg cells with a higher expression of several molecules that correlate with suppression, such as Tim-3, LAG-3, TGF-β, IL-10, CD25, and CTLA-4, are observed in CRC patients [32]. In contrast, a local accumulation and Foxp3 (+) cell density is associated with an improved survival rate and is considered as a good independent prognostic biomarker in the initial stage of colorectal cancers [19,35,36]. The role of Treg cells in CRC seems to be dependent on the co-existence in the tumor tissue and the time of action of different subsets of Foxp3-expressing cells. A study identified two types of Treg cells in CRC, Foxp3<sup>hi</sup> Treg cells and Foxp3<sup>lo</sup> non-suppressive T cells [20]. The latter are characterized by secreted inflammatory cytokines along with the instability of Foxp3 and the absence of CD45RA expression, a naive T cell marker [20]. In the present study, we found that in early CAC development, Treg cells were efficiently recruited in STAT6<sup>-/-</sup> colons, whereas increasing Foxp3 (+) cells in the colon of WT mice were detected only in the late stages of CAC. Interestingly, our previous results for WT mice showed that Treg cells from the late stages of CAC displayed an activated phenotype by expressing PD1, CD127, and Tim-3, along with an increased suppressive capacity in T-CD4+ and T-CD8+ cells. In contrast, Treg cells from WT mice in early CAC were scant and less suppressive [21]. Due to the lack of STAT6<sup>-/-</sup> Foxp3EGFP reporter mice, we were not able to determine the suppressive capacity of Treg cells in vitro that developed under STAT6 deficiency. However, the immunohistological analyses and H&E staining showed that the STAT6<sup>-/-</sup> CAC-induced mice displayed decreased inflammatory infiltrate, with less destruction of the intestinal muscle and mucosa, supporting the idea that immunoregulatory mechanisms are taking place. Furthermore, the significant decrease in CD8+ T cells and the positive correlation between the frequency of Treg cells and the transcription levels of Foxp3, TGF-beta, and IL-10 in STAT6<sup>-/-</sup> colons indicate that the latter are a consequence of the modulating function of Treg cells during CAC progression.

Some authors have suggested that distinct subpopulations of tumor-infiltrating Foxp3 (+) T cells contribute in opposing ways to the determination of CRC prognosis [37,38]. During the early CAC development, epithelial tight junction dysfunction promotes enhanced gut permeability, resulting in the deregulation of the interactions between the intestinal epithelial cells, immune cells, and gut microbiota. Continual exposure to luminal microbiota leads to intestinal inflammation, characterized by the recruitment of innate immune cells, the release of inflammatory mediators, and the subsequent generation and expansion of T-helper 17 (Th17) cells [39]. The local increase of Treg cells in early CAC

could suppress or prevent tumor formation through Th17 cell suppression. Here, we use an anti-CD25 monoclonal antibody (PC61) to deplete Treg cells only during early CAC. Interestingly, we observed histological damage and tumor growth recovery during STAT6 deficiency, supporting the idea that Treg cells developed in STAT6<sup>-/-</sup> mice are protective against colon tumorigenesis. This finding seems to be compatible with that of a recent study showing that the administration of the natural compound, Parthenolide, during experimental colitis significantly relieved colon inflammation and improved the colitis symptoms [40]. The protective effect of this molecule was associated with an increased frequency of colonic Treg cells, a downregulation of the ratio of colonic Th17 cells, together with a more abundant gut microbial diversity and flora composition [40]. One possible reason for the protection observed in the STAT6<sup>-/-</sup> mice during CAC progression could be the alterations in gut microbiota. Thus, this condition needs further research. Because the balance between Th17/Treg cells and these regulatory factors is decisive in CAC progression, it could be interesting to determine if the tumor growth observed in STAT6<sup>-/-</sup> mice after Treg depletion is Th17-mediated.

Depending on the grade of alteration during CRC progression, Treg cells may modify their phenotype and exert different effects on cancer progression. Foxp3 (+) cells infiltrating colorectal carcinomas could be associated with their capacity to suppress tumor-promoting inflammatory immune response caused by infectious stimuli from bacterial translocation through the mucosal barrier [41]. In a number of murine models, adoptively transferred Treg cells prevent the onset of colitis or treat established colitis [42–44], and the *in vitro* expansion of Treg cells from the blood of patients with CD is considered as a feasible adoptive cell therapy for this disease [45,46]. The significantly higher percentages of Treg cells found in STAT6<sup>-/-</sup> CAC-induced colons, compared with those found in WT colons, suggest that STAT6 limits Treg generation and recruitment by undetermined mechanisms. Additionally, a previous study from our laboratory demonstrated that the number of circulating CD11b+Ly6C<sup>hi</sup>CCR2+ monocytes and CD11b+Ly6C<sup>low</sup>Ly6G+ granulocytes was decreased in a STAT6-dependent manner [13]. Additionally, a significant reduction in the expression of the chemokines, CCL9 and CCL25, and the chemokine receptor, CXCR2, both involved in the recruitment of inflammatory cells, was shown in STAT6<sup>-/-</sup> mice during CAC progression. CCR2 is responsible for the recruitment of Ly6C<sup>hi</sup> “inflammatory monocytes” to peripheral sites of inflammation, where they display inflammatory, phagocytic, and proteolytic functions [47]. Thus, the STAT6 pathway in Treg cells has an intricate outcome and should be addressed in the context of an inflammatory environment. However, the local increase of Foxp3 (+) cells could be used to suppress antitumor immunity in a final phase of tumor formation. In our lab, when the Treg cells were depleted during the second DSS cycle of experimental CAC in WT mice, a reduction of 50% of Treg cells resulted in a better prognostic value, with a significant reduction in the tumor load [22]. In contrast, in the present study, an earlier Treg depletion slightly increased the tumor load in WT mice. All these results suggest that Treg cells have a dynamic behavior influenced by STAT6 during CAC development.

Recently, a study demonstrated that STAT6 plays a critical role in the generation of Treg cells induced by B cells (Treg-of-B cells) [48]. STAT6 phosphorylation was associated with the capacity of Treg-of-B cells to alleviate inflammation in an animal model of asthma *in vivo* [48]. In accordance with our results, in an allergic disease model, a high number of Treg cells in the lungs and spleens in STAT6<sup>-/-</sup> mice, compared to WT animals, were associated with a decreased allergic response [26]. However, it would be interesting to determine if the stability in the expression of Foxp3 and therefore the differentiation and functional properties of Treg cells are modified in a STAT6-dependent manner. Furthermore, the role of STAT6 in modulating different types of Treg cells (natural, induced, type 1 T regulatory cells, and Treg-of-B cells) may be useful to develop new therapeutic strategies for relieving CAC or CRC.

In conclusion, STAT6 seems to play a central role in the regulation of the activity of Treg cells, particularly during the initial stages of CAC development, through the modulation of intense inflammatory responses.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Mice

Eight- to 10-week-old female BALB/c and STAT6<sup>-/-</sup> mice were purchased from Harlan Laboratories (México City, México) and maintained in a pathogen-free environment at the Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) animal facilities. The animals were fed Purina Diet 5015 and water ad libitum. All experimental procedures were in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (USA) and were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the FES-I (UNAM).

### 4.2. CAC Induction

Mice received an intraperitoneal (i.p.) injection of 12.5 mg/kg azoxymethane (AOM) (Sigma, Santa Cruz, CA, USA). Five days later, 2% dextran sulfate sodium (DSS, MW: 40000, (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)) in drinking water was administered ad libitum for 7 days. Mice were then provided regular water for 14 days and subjected to two more DSS cycles. To examine the early and late transformative stages in CAC, the mice were slaughtered on day 20 and day 40 (early tumor development), and day 68 or day 77 (late tumor development) after AOM injection. Throughout the experiment, mice were monitored weekly for body weight, stool consistency or diarrhea, and presence of blood in the rectum or stool. The disease activity score (DAI) was calculated as described previously [49]. At the sacrifice, the colon was removed, weighed, and submitted for macroscopic inspection.

### 4.3. Histological Analysis

Longitudinal sections from the large intestine were immediately fixed according to previously described protocols [13]. Colon sections with a thickness of 5 µm were stained with hematoxylin and eosin (H&E) to visualize morphology and inflammatory changes were evaluated in 5 sections from each sample. For immunohistochemical staining, sections were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies against Foxp3 (GeneTex, Irvine, CA, USA), and were then developed following a conventional technique. The quantification of Foxp3 (+) cells was performed using ImageJ software v.1.48 by counting cells in 10 high-powered fields, with at least three slides per animal.

### 4.4. Flow Cytometry

Single cell suspensions from spleens and the circulation were obtained during the sacrifice and incubated with anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD25 antibodies (BioLeg-end, San Diego, CA, USA) or anti-LAP (TGF beta1) and anti-IL-10 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 30 min (4 °C, in the dark). Then, cells were washed and incubated in FOXP3 Fix/Perm Buffer Set (BioLeg-end, San Diego, CA, USA) for 30 min following the manufacturer's instructions and then stained with anti-Foxp3 antibody (Becton Dickinson, San Jose, CA; USA). Cells were washed, resuspended in PBS, and analyzed on Attune™ NxT Flow Cytometer (ThermoFisher Scientific) cytometer. The flow data were analyzed using flow cytometry analysis software (FlowJo; Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

### 4.5. RNA Extraction and RT-PCR

Tissues were obtained and processed as previously described [17]. The RNA was purified using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. One microgram of RNA was used for first-strand cDNA synthesis with RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A



CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, México City, México) and a SYBR Select Master Mix for CFX (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) were used for quantitative real-time RT-PCR analysis. The relative expression levels for a target gene were normalized by GAPDH. Primer sequences used in qRT-PCR analysis are: IL-10F (TGCTGCCTGCTCT-TACTGAC), IL-10 R (GGGGCATCACTTCTACCAGG); TGF- $\beta$  F (GCCCTTCCTGCTC-CTCAT), TGF- $\beta$  R (TTGGCATGGTAGCCCTTG); Foxp3 F (CCTTCTCCAGGACAGA), Foxp3 R (GATCATGGCTGGGTTGT), and GAPDH F (TCACGCCACAGTTTCCCGGAG), GAPDH R (CCTCAAGATCAGCAATGCCT).

#### 4.6. Treg Depletion

WT and STAT6<sup>-/-</sup> mice were injected i.p. with 200  $\mu$ g/mouse of InVivoMAb anti-mouse CD25 (IL-2R $\alpha$ ) (clone PC-61.5.3) (BioXcell, West Lebanon, NH, USA) in 200  $\mu$ L of PBS at day 10 and 15 after AOM/DSS administration. CAC induction and progression were analyzed as mentioned in Section 4.2.

#### 4.7. Statistical Analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparisons test or unpaired two-tailed t-tests depending on the number of groups using GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA). All statistical tests were performed considering 95% confidence intervals. The data are expressed as the mean  $\pm$  S.E. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ .

**Author Contributions:** Conceptualization, L.I.T., J.H.-R., and S.L.-C. methodology, Y.D.-R., A.O.-S., and Y.L.-S.; histology, Y.D.-R. and A.O.-S.; cytometry, J.E.O., Y.D.-R., and Y.L.-S.; investigation, Y.D.-R. and S.L.-C.; resources, L.I.T. and S.L.-C.; writing—original draft preparation, Y.D.-R. and S.L.-C.; writing—review and Editing, S.L.-C., J.H.-R., and L.I.T.; supervision, S.L.-C. and L.I.T.; project administration, S.L.-C.; and funding acquisition, S.L.-C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by grants from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT, UNAM, Grant number IA204218 and IN215421. CONACYT, grant A1S23944.

**Institutional Review Board Statement:** All experimental procedures were in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (USA), and were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the FES-I (UNAM), under number CE/FESI/102016/1096 (18/10/16).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** Y.D.-R. is a PhD student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and the receiver of a fellowship (606590) from CONACYT. The authors would like to thank MVZ Leticia Flores and Biol. Tomás Villamar for their help in the animal care.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Siegel, R.; DeSantis, C.; Jemal, A. Colorectal cancer statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.* **2014**, *64*, 104–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *68*, 394–424. [[CrossRef](#)]
3. Colotta, F.; Allavena, P.; Sica, A.; Garlanda, C.; Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 1073–1081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Van Der Kraak, L.; Gros, P.; Beauchemin, N. Colitis-associated colon cancer: Is it in your genes? *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 11688–11699. [[CrossRef](#)]
5. Hebenstreit, D.; Wirnsberger, G.; Horejs-Hoeck, J.; Duschl, A. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2006**, *17*, 173–188. [[CrossRef](#)]



6. Delgado-Ramirez, Y.; Colly, V.; Gonzalez, G.V.; Leon-Cabrera, S. Signal transducer and activator of transcription 6 as a target in colon cancer therapy (Review). *Oncol. Lett.* **2020**, *20*, 455–464. [[CrossRef](#)]
7. Andre, F.; Arnedos, M.; Baras, A.S.; Baselga, J.; Bedard, P.L.; Berger, M.F.; Bierkens, M.; Calvo, F.; Cerami, E.; Chakravarty, D.; et al. AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discov.* **2017**, *7*, 818–831.
8. Uhlén, M.; Zhang, C.; Lee, S.; Sjöstedt, E.; Fagerberg, L.; Bidkhori, G.; Benfeitas, R.; Arif, M.; Liu, Z.; Edfors, F.; et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* **2017**, *357*, eaan2507. [[CrossRef](#)]
9. Wang, C.-G.; Ye, Y.-J.; Yuan, J.; Liu, F.-F.; Zhang, H.; Wang, S. EZH2 and STAT6 expression profiles are correlated with colorectal cancer stage and prognosis. *World J. Gastroenterol.* **2010**, *16*, 2421–2427. [[CrossRef](#)]
10. Wick, E.C.; Leblanc, R.E.; Ortega, G.; Robinson, C.; Platz, E.; Pardoll, E.M.; Iacobuzio-Donahue, C.; Sears, C.L. Shift from pStat6 to pStat3 predominance is associated with inflammatory bowel disease-associated dysplasia. *Inflamm. Bowel Dis.* **2012**, *18*, 1267–1274. [[CrossRef](#)]
11. Li, B.H.; Yang, X.Z.; Li, P.D.; Yuan, Q.; Liu, X.H.; Yuan, J.; Zhang, W.J. IL-4/Stat6 activities correlate with apoptosis and metastasis in colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *369*, 554–560. [[CrossRef](#)]
12. Lin, Y.; Li, B.; Yang, X.; Liu, T.; Shi, T.; Deng, B.; Zhang, Y.; Jia, L.; Jiang, Z.; He, R. Non-hematopoietic STAT6 induces epithelial tight junction dysfunction and promotes intestinal inflammation and tumorigenesis. *Mucosal Immunol.* **2019**, *12*, 1304–1315. [[CrossRef](#)]
13. Leon-Cabrera, S.A.; Molina-Guzman, E.; Delgado-Ramirez, Y.G.; Vázquez-Sandoval, A.; Ledesma-Soto, Y.; Pérez-Plasencia, C.G.; Chirino, Y.I.; Delgado-Buenrostro, N.L.; Rodríguez-Sosa, M.; Vaca-Paniagua, F.; et al. Lack of STAT6 Attenuates Inflammation and Drives Protection against Early Steps of Colitis-Associated Colon Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2017**, *5*, 385–396. [[CrossRef](#)]
14. Olguín, J.E.; Medina-Andrade, I.; Rodríguez, T.; Rodríguez-Sosa, M.; Terrazas, L.I. Relevance of Regulatory T Cells during Colorectal Cancer Development. *Cancers* **2020**, *12*, 1888. [[CrossRef](#)]
15. Liu, Z.; Huang, Q.; Liu, G.; Dang, L.; Chu, D.; Tao, K.; Wang, W. Presence of FOXP3+Treg cells is correlated with colorectal cancer progression. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2014**, *7*, 1781–1785.
16. Argon, A.; Vardar, E.; Kebat, T.; Ömer, E.; Erkan, N. The Prognostic Significance of FoxP3+ T Cells and CD8+ T Cells in Colorectal Carcinomas. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **2016**, *35*, 121–131. [[CrossRef](#)]
17. Reimers, M.S.; Engels, C.C.; Putter, H.; Morreau, H.; Liefers, G.J.; Van De Velde, C.J.H.; Kuppen, P.J.K. Prognostic value of HLA class I, HLA-E, HLA-G and Tregs in rectal cancer: A retrospective cohort study. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 486. [[CrossRef](#)]
18. Soh, J.S.; Jo, S.I.; Lee, H.; Do, E.-J.; Hwang, S.W.; Park, S.H.; Ye, B.D.; Byeon, J.-S.; Yang, S.-K.; Kim, J.H.; et al. Immunoprofiling of Colitis-associated and Sporadic Colorectal Cancer and its Clinical Significance. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–10. [[CrossRef](#)]
19. Vlad, C.; Kubelac, P.; Fetica, B.; Vlad, D.; Irimie, A.; Achimas-Cadariu, P. The prognostic value of FOXP3+ T regulatory cells in colorectal cancer. *J. BUON* **2015**, *20*, 114–119.
20. Saito, T.; Nishikawa, H.; Wada, H.; Nagano, Y.; Sugiyama, D.; Atarashi, K.; Maeda, Y.; Hamaguchi, M.; Ohkura, N.; Sato, E.; et al. Two FOXP3+CD4+ T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 679–684. [[CrossRef](#)]
21. Olguín, J.E.; Medina-Andrade, I.; Molina, E.; Vázquez, A.; Pacheco-Fernández, T.; Saavedra, R.; Pérez-Plasencia, C.; Chirino, Y.I.; Vaca-Paniagua, F.; Arias-Romero, L.E.; et al. Early and Partial Reduction in CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells during Colitis-Associated Colon Cancer Induces CD4+ and CD8+ T Cell Activation Inhibiting Tumorigenesis. *J. Cancer* **2018**, *9*, 239–249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bruns, H.A.; Schindler, U.; Kaplan, M.H. Expression of a Constitutively Active Stat6 In Vivo Alters Lymphocyte Homeostasis with Distinct Effects in T and B Cells. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 3478–3487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Sanchez-Guajardo, V.; Tanchot, C.; O'Malley, J.T.; Kaplan, M.H.; Garcia, S.; Freitas, A.A. Agonist-driven development of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells requires a second signal mediated by Stat6. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 7550–7556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zorn, E.; Nelson, E.A.; Mohseni, M.; Porcheray, F.; Kim, H.; Litsa, D.; Bellucci, R.; Raderschall, E.; Canning, C.; Soiffer, R.J.; et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* **2006**, *108*, 1571–1579. [[CrossRef](#)]
25. Takaki, H.; Ichiyama, K.; Koga, K.; Chinen, T.; Takaesu, G.; Sugiyama, Y.; Kato, S.; Yoshimura, A.; Kobayashi, T. STAT6 inhibits TGF-beta 1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 14955–14962. [[CrossRef](#)]
26. Dorsey, N.J.; Chapoval, S.P.; Smith, E.P.; Skupsky, J.; Scott, D.W.; Keegan, A.D. STAT6 controls the number of regulatory T cells in vivo, thereby regulating allergic lung inflammation. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 1517–1528. [[CrossRef](#)]
27. Setiady, Y.Y.; Coccia, J.A.; Park, P.U. In vivo depletion of CD4(+)FOXP3(+) Treg cells by the PC61 anti-CD25 monoclonal antibody is mediated by Fc gamma RIII+ phagocytes. *Eur. J. Immunol.* **2010**, *40*, 780–786. [[CrossRef](#)]
28. Rosen, M.J.; Chaturvedi, R.; Washington, M.K.; Kuhnlein, L.A.; Moore, P.D.; Coggeshall, S.S.; McDonough, E.M.; Weitkamp, J.-H.; Singh, A.B.; Coburn, L.A.; et al. STAT6 deficiency ameliorates severity of oxazolone colitis by decreasing expression of claudin-2 and Th2-inducing cytokines. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 1849–1858. [[CrossRef](#)]
29. Jayakumar, A.; Bothwell, A.L. Stat6 Promotes Intestinal Tumorigenesis in a Mouse Model of Adenomatous Polyposis by Expansion of MDSCs and Inhibition of Cytotoxic CD8 Response. *Neoplasia* **2017**, *19*, 595–605. [[CrossRef](#)]
30. Vignali, D.A.A.; Collison, L.W.; Workman, C.J. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*, 523–532. [[CrossRef](#)]

31. Ling, Z.-A.; Zhang, L.-J.; Ye, Z.-H.; Dang, Y.-W.; Chen, G.; Li, R.-L.; Zeng, J.-J. Immunohistochemical distribution of FOXP3+ regulatory T cells in colorectal cancer patients. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2018**, *11*, 1841–1854.
32. Ma, Q.; Liu, J.; Wu, G.; Teng, M.; Wang, S.; Cui, M.; Li, Y. Co-expression of LAG3 and TIM3 identifies a potent Treg population that suppresses macrophage functions in colorectal cancer patients. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2018**, *45*, 1002–1009. [[CrossRef](#)]
33. Norton, S.E.; Ward-Hartstonge, K.A.; McCall, J.L.; Leman, J.K.H.; Taylor, E.S.; Munro, F.; Black, M.A.; Groth, B.F.D.S.; McGuire, H.M.; Kemp, R.A. High-Dimensional Mass Cytometric Analysis Reveals an Increase in Effector Regulatory T Cells as a Distinguishing Feature of Colorectal Tumors. *J. Immunol.* **2019**, *202*, 1871–1884. [[CrossRef](#)]
34. Clarke, S.L.; Betts, G.J.; Plant, A.; Wright, K.L.; El-Shanawany, T.M.; Harrop, R.; Torkington, J.; Rees, B.L.; Williams, G.T.; Gallimore, A.M.; et al. CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells Suppress Anti-Tumor Immune Responses in Patients with Colorectal Cancer. *PLoS ONE* **2006**, *1*, e129. [[CrossRef](#)]
35. Hanke, T.; Melling, N.; Simon, R.; Sauter, G.; Bokemeyer, C.; Lebok, P.; Terracciano, L.M.; Izbicki, J.R.; Marx, A.H. High intratumoral FOXP3+ T regulatory cell (Tregs) density is an independent good prognosticator in nodal negative colorectal cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 8227–8235.
36. Shang, B.; Liu, Y.; Jiang, S.J.; Liu, Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3(+) regulatory T cells in cancers: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–9. [[CrossRef](#)]
37. Saito, T.; Yamashita, K.; Tanaka, K.; Yamamoto, K.; Makino, T.; Takahashi, T.; Kurokawa, Y.; Yamasaki, M.; Wada, H.; Nishikawa, H.; et al. Impact of tumor infiltrating effector regulatory T cells on the prognosis of colorectal cancers. *Cancer Sci.* **2021**, *112*, 390.
38. Fantini, M.C.; Favale, A.; Onali, S.; Facciotti, F. Tumor Infiltrating Regulatory T Cells in Sporadic and Colitis-Associated Colorectal Cancer: The Red Little Riding Hood and the Wolf. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6744. [[CrossRef](#)]
39. Omenetti, S.; Pizarro, T.T. The Treg/Th17 Axis: A Dynamic Balance Regulated by the Gut Microbiome. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 639. [[CrossRef](#)]
40. Liu, Y.-J.; Tang, B.; Wang, F.-C.; Tang, L.; Lei, Y.-Y.; Luo, Y.; Huang, S.-J.; Yang, M.; Wu, L.-Y.; Wang, W.; et al. Parthenolide ameliorates colon inflammation through regulating Treg/Th17 balance in a gut microbiota-dependent manner. *Theranostics* **2020**, *10*, 5225–5241. [[CrossRef](#)]
41. Ladoire, S.; Martin, F.; Ghiringhelli, F. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: The paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, *60*, 909–918. [[CrossRef](#)]
42. Maloy, K.J.; Salaun, L.; Cahill, R.; Dougan, G.; Saunders, N.J.; Powrie, F. CD4(+)CD25(+) T-R cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 111–119. [[CrossRef](#)]
43. Mottet, C.; Uhlig, H.H.; Powrie, F. Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 3939–3943. [[CrossRef](#)]
44. Watanabe, K.; Rao, V.P.; Poutahidis, T.; Rickman, B.H.; Ohtani, M.; Xu, S.; Rogers, A.B.; Ge, Z.; Horwitz, B.H.; Fujioka, T.; et al. Cytotoxic-T-Lymphocyte-Associated Antigen 4 Blockade Abrogates Protection by Regulatory T Cells in a Mouse Model of Microbially Induced Innate Immune-Driven Colitis. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 5834–5842. [[CrossRef](#)]
45. Canavan, J.B.; Scotta, C.; Vossenkamper, A.; Goldberg, R.; Elder, M.J.; Shoval, I.; Marks, E.; Stolarczyk, E.; Lo, J.W.; Powell, N.; et al. Developing in vitro expanded CD45RA(+) regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn’s disease. *Gut* **2016**, *65*, 584–594. [[CrossRef](#)]
46. Clough, J.N.; Omer, O.S.; Tasker, S.; Lord, G.M.; Irving, P.M. Regulatory T-cell therapy in Crohn’s disease: Challenges and advances. *Gut* **2020**, *69*, 942–952. [[CrossRef](#)]
47. Desalegn, G.; Pabst, O. Inflammation triggers immediate rather than progressive changes in monocyte differentiation in the small intestine. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1–14. [[CrossRef](#)]
48. Chu, K.-H.; Lin, S.-Y.; Chiang, B.-L. STAT6 Pathway Is Critical for the Induction and Function of Regulatory T Cells Induced by Mucosal B Cells. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 11. [[CrossRef](#)]
49. Leon-Cabrera, S.; Vázquez-Sandoval, A.; Molina-Guzman, E.; Delgado-Ramirez, Y.; Delgado-Buenrostro, N.L.; Callejas, B.E.; Chirino, Y.I.; Pérez-Plasencia, C.; Rodríguez-Sosa, M.; Olguín, J.E.; et al. Deficiency in STAT1 Signaling Predisposes Gut Inflammation and Prompts Colorectal Cancer Development. *Cancers* **2018**, *10*, 341. [[CrossRef](#)]

# Signal transducer and activator of transcription 6 as a target in colon cancer therapy (Review)

Yael Delgado-Ramirez<sup>1</sup>, Vaneesa Colly<sup>1,2</sup>,  
Giovanni Villanueva Gonzalez<sup>2</sup> and Sonia Leon-Cabrera<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Oncoimmunology, Biomedical Research Unit; <sup>2</sup>Medical School, Faculty of Superior Studies Iztacala, National Autonomous University of Mexico, Tlalnepantla, CP 54090, Mexico

Received October 1, 2019; Accepted April 17, 2020

DOI: 10.3892/ol.2020.11614

**Abstract.** Signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) is a member of the STAT family of proteins that serve key roles in the initiation of tumorigenesis and malignant transformation. STAT6 is highly expressed in several types of cancer, including breast, pancreatic, prostate and colorectal cancer. STAT6 transduces signals in response to the binding of interleukin (IL)-4 and IL-13 to their receptors and regulates the expression of genes involved in the immune response, cell survival, tumor proliferation and metastasis. Patients with colorectal cancer exhibit high STAT6 activity in the colonic epithelium, and STAT6 expression is associated with lower survival rates, lymph node metastasis, changes in the epithelial barrier function and alterations in the inflammatory response. A number of studies investigating experimental models and cancer cell lines have revealed that STAT6 is associated with tumor growth and development, as well as with increased invasion and metastasis, suggesting that STAT6 inhibition may serve as a novel therapeutic strategy in colon cancer. The present review summarizes the evidence with regard to the implications of STAT6 in cancer biology and the direct and indirect effects on colon tumor transformation. Furthermore, the current treatment strategies targeting the IL-4/IL-13/STAT6 axis in colon cancer are discussed.

## Contents

1. Introduction
2. Overview of the IL-4/IL-13/STAT6 signaling pathway

---

*Correspondence to:* Dr Sonia Leon-Cabrera, Laboratory of Oncoimmunology, Biomedical Research Unit, National Autonomous University of Mexico, Avenida De los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, CP 54090, Mexico  
E-mail: soleonca@comunidad.unam.mx

**Key words:** colon cancer, signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4, interleukin-13, signaling, targeted therapy

3. STAT6 and its role in CRC
4. Targeting STAT6 for colon cancer therapy
5. Targeting IL-4, IL-13, IL-4R and IL-13R $\alpha$ 2 in colon cancer therapy
6. Clinical trials targeting JAKs in colon cancer therapy
7. Conclusions

## 1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) has the second highest cancer-associated mortality rate worldwide and is the third most commonly diagnosed neoplasm; a total of 881,000 CRC-associated mortalities and 1.8 million newly diagnosed cases were reported in 2018 (1). Sporadic CRC may be caused by a hereditary mutation, such as in patients with familial adenomatous polyposis with bi-allelic inactivation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene or in patients with Lynch syndrome. The remaining cases exhibit activating mutations in components of the Wnt signaling pathway that promote malignant cell proliferation (2). Additionally, sustained inflammation in the intestine, such as in patients with inflammatory bowel disease (IBD), favors the development of colitis-associated cancer (CAC).

During chronic inflammation in the intestine, barrier dysfunction increases susceptibility to bacterial infection. Furthermore, mucosal inflammation results in the accumulation of mutations that can result in the development of colon cancer. In CAC, inflammatory cytokines are persistently present in the intestinal tissue, and in patients with sporadic cancer, the administration of anti-inflammatory drugs can prevent or delay the disease, suggesting that inflammatory processes are involved in the initiation of tumorigenesis (3).

Cytokines serve as a means of communication among immune, cancer and non-transformed stromal cells in the tumor microenvironment. The signal transducer and activator of transcription (STAT) family of proteins serve an important role in the initiation of malignant transformation and in tumor establishment, and have been widely studied in experimental models and in patients with cancer (4). Upon cytokine binding to its receptor, Janus kinases (JAKs) mediate STAT phosphorylation. In the nucleus, STAT binds to specific DNA sequences that result in the transcription of target genes (5). Interleukin

(IL)-6, IL-10 and IL-23 signaling is mediated by JAK1 and recruits STAT3. Conversely, STAT6 functions as a transcription factor in the nucleus in response to IL-4 and IL-13 receptor binding after the activation of JAK1 and JAK3 (5). STAT6 orchestrates numerous processes beyond immune response, including cancer cell proliferation, apoptosis resistance, metastasis, epithelial cell function, chromatin compaction, and DNA damage and repair (Table I). STAT6 signaling is frequently activated in malignant cells and regulates several genes crucial for the immune response, inflammation and proliferation (5). Persistent activation of STAT6 in different types of cancer results in proliferation, survival and metastasis, as well as in decreased antitumor immunity. STAT6 polymorphisms have been identified in a subgroup of Malaysian patients suffering from Crohn's disease (CD), as well as in a patient cohort in Germany (6-8), demonstrating the importance of this gene in inflammatory processes in the colon.

Despite the advances in the diagnosis and treatment of CRC, the mortality rates remain high. Therefore, there is a requirement for the development of alternative therapeutic strategies for this disease. Interfering with the activity of STAT6 could be a potential strategy to target the action of IL-4 and IL-13, and the activation of other signaling pathways involved in tumorigenesis.

The present review describes the direct and indirect effects of STAT6 on colon tumor transformation and discusses the role of STAT6 in mucosal biology. Additionally, the current treatment strategies that target the IL-4/IL-13/STAT6 axis in colon cancer are summarized.

## 2. Overview of the IL-4/IL-13/STAT6 signaling pathway

STAT6 serves important roles in signal transduction throughout the cytoplasm and is a transcription factor in the nucleus. Cytokines and growth factors bind to their cognate receptors and activate the JAK family. Once activated, JAKs phosphorylate docking sites in the SH2 domain of STAT molecules. After phosphorylation, STATs form homodimers or heterodimers, which are transported into the nucleus where they regulate the expression of genes (5).

STAT6 activation occurs by IL-4 or IL-13 binding to their receptors. Currently, three types of receptors have been described. The IL-4 type I receptor is composed of the IL-4 receptor  $\alpha$  (IL-4R $\alpha$ ) chain and the common  $\gamma$  chain ( $\gamma$ c). The IL-4R $\alpha$  chain has a high affinity for IL-4, while the  $\gamma$ c is a component of receptors that bind IL-2 and IL-9. IL-4 binds to the IL-4R $\alpha$  chain, resulting in dimerization with the  $\gamma$ c chain and receptor activation (9). However, in human colon carcinoma cells, it has been reported that the IL-4R $\alpha$  chain does not bind with the  $\gamma$ c (10).

The type II receptor is composed of the IL-4R $\alpha$  and IL-13 receptor  $\alpha$  variant 1 (IL-13R $\alpha$ 1) chains, and is able to bind to both IL-4 and IL-13. IL-13 binds to the monomer IL-13R $\alpha$ 1 with low affinity, and requires heterodimerization with IL-4R $\alpha$  to form a high-affinity bond. This complex recruits JAKs and leads to the downstream activation of STAT6 (9).

Additionally, IL-13 can bind to the IL-13 receptor  $\alpha$  variant 2 (IL-13R $\alpha$ 2) chain; this receptor is a monomer that binds IL-13 with higher affinity than IL-13R $\alpha$ 1 and is expressed in T cells, B cells and endothelial cells, among others, where it has

been demonstrated to promote tumorigenesis (11). IL-13R $\alpha$ 2 is considered as a decoy receptor, as it is able to bind IL-13 and prevent it from binding to IL-13R $\alpha$ 1 (11).

After stimulation of the IL-4R $\alpha$  receptor, JAK1-3 and tyrosine kinase 2 (Tyk2) are phosphorylated in the cytoplasmic tails of the receptor. Once active, JAKs phosphorylate the tyrosine residues Y575, Y603 and Y631 on the receptor, generating docking sites for STAT6. When monomers of STAT6 become phosphorylated on tyrosine Y641, the C-terminal of the SH2 domain usually forms homodimers (12) that are translocated to the nucleus, where they can bind DNA and activate or repress target genes. Therefore, the activity of STAT6 depends on tyrosine phosphorylation. However, the proximity of subunits may influence heterodimer formation. The stimulation of B cells with interferon (IFN) type 1 promotes the generation of STAT2:STAT6 heterodimers (13).

Proper regulation of STAT6 signaling is crucial, and specific molecules have been identified to regulate this signaling pathway. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins, particularly SOCS1, repress the activation of JAK1/3 and STAT6, and affect IL-4-induced proliferation (14). STAT6 signaling induces SOCS1 expression in a negative feedback loop, inhibiting the expression of STAT6-responsive genes (14). Additionally, the IL-4/STAT6 signaling pathway induces SOCS3 expression in intestinal epithelial cells. Increased SOCS3 levels in patients with ulcerative colitis (UC) are indicative of disease exacerbation (15). STAT6 activation is responsible for SOCS3 induction and affects the regulation of STAT1 and STAT3 signaling (15).

Protein tyrosine phosphatase (SHP1) negatively regulates IL-4/IL-13 signaling and STAT6 gene induction (16). Studies investigating the overexpression of SHP1 demonstrated a decrease in IL-4/IL-13 signaling, suggesting that tyrosine phosphorylation of STAT6 is regulated by SHP1 (16). Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) has been demonstrated to dephosphorylate cytoplasmic and nuclear STAT6, and attenuate its signaling. In diffuse large B-cell lymphomas, PTP1B contributes to STAT6 dephosphorylation, thereby enhancing tumorigenesis and inflammatory processes (17). Additionally, STAT6 function is regulated by methylation. When STAT6 is methylated on arginine at the N-terminus, decreased phosphorylation, nuclear translocation and DNA-binding activity are observed in response to IL-4 (18).

Several target genes of STAT6 have been identified and characterized. The STAT6 signal transduction pathway serves an important role in mediating the biological functions of IL-4 and IL-13 in processes associated with Th2 immune responses. During allergic reactions, STAT6 mediates T helper 2 (Th2) cells and eosinophil recruitment within sites of allergic inflammation, and is involved in immunoglobulin (Ig) class switching to produce IgE (5).

However, abnormal STAT6 activation may contribute to the pathology of cancer by increasing the expression of proteins involved in proliferation, migration and invasion. The IL-4/STAT6 signaling pathway increases nuclear survivin in CRC stem cells, allowing them to evade cell death (19). Platelet-derived growth factors (PDGFs) are secreted by human vascular endothelial cells, epithelial cells and fibroblasts. PDGF is a survival factor that inhibits apoptosis, promotes proliferation and stimulates mesenchymal cell proliferation

Table I. Different roles of STAT6 in colon cancer.

System/process affected	Mechanism implicated	First author, year (ref.)	
Immune system	IL-4, IL-13, IL-4R and IL-13R are differentially expressed in the colonic mucosa of patients with CRC according to the metastasis and survival rates.	Formentini <i>et al</i> , 2012 (28)	
	T cells, macrophages and natural killer T cells exhibit increased STAT6 phosphorylation during colitis development. STAT6 <sup>-/-</sup> mice exhibit decreased secretion of IL-4, IL-5, IL-13 and interferon- $\gamma$ accompanied by disease amelioration.	Rosen <i>et al</i> , 2013 (29)	
	STAT6 signaling contributes to the pathogenesis of colitis by inducing B cell-dependent mast cell activation. STAT6 <sup>-/-</sup> mice exhibit reduced tumorigenicity associated with decreased inflammation and low mRNA levels of IL-17A and tumor necrosis factor- $\alpha$ in the azoxymethane/DSS model of CAC.	Hoving <i>et al</i> , 2012 (30) Leon-Cabrera <i>et al</i> , 2017 (33)	
	STAT6 orchestrates epithelial cell proliferation and myeloid-derived suppressor cell expansion by decreasing the cytotoxic activity of CD8 T cells in a mouse model of adenomatous polyposis.	Jayakumar and Bothwell, 2017 (34)	
	The STAT6-specific inhibitor AS1517499 decreases the number of tumors and circulating inflammatory monocytes and granulocytes in experimental CAC.	Leon-Cabrera <i>et al</i> , 2017 (33)	
	In DSS-induced colitis, STAT6 deficiency alters chromatin compaction with direct repercussions in the apoptosis of epithelial cells and mucosal damage.	De Oliveira <i>et al</i> , 2019 (35)	
	IL-4-dependent STAT6 signaling pathway favors the expression of anti-apoptotic proteins and epithelial cell growth in colon cancer <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> .	Todaro <i>et al</i> , 2008 (59)	
	Abnormal IL-4/STAT6 activation induces survivin expression that in turn increases apoptosis resistance in colon cancer stem cells.	Di Stefano <i>et al</i> , 2010 (19)	
	IL-13 drives STAT6 phosphorylation and alters epithelial barrier function by increasing claudin-2 activity in colitis.	Rosen <i>et al</i> , 2013 (29)	
	IL-13/STAT6 signaling pathway serves a pivotal role in reducing matrix metalloproteinase and prostasin expression, two proteins involved in epithelial barrier dysfunction.	Buzza <i>et al</i> , 2017 (31)	
Epithelial cells	Administration of IL-13 increases production of colonic serotonin and colitis severity in DSS-induced colitis. The exposure of the colon cancer HT29 and SW480 cell lines to IL-13 enhances EMT-promoting factor zinc finger E-box-binding homeobox 1 expression.	Shajib <i>et al</i> , 2013 (32) Cao <i>et al</i> , 2017 (37)	
	E2F transcription factor 1 increases STAT6 expression in colon cancer cell lines that in turn leads to expression of EMT drivers in CRC cells.	Chen <i>et al</i> , 2018 (40)	
	IL-4 downregulates E-cadherin expression, altering cell-cell adhesion and favoring metastasis in CRC. STAT6 <sup>-/-</sup> mice with acute murine colitis exhibit impaired wound healing and low mucosal expression of Wnt ligands, which are important mediators in response to epithelial injury.	Kanai <i>et al</i> , 2000 (43) Cosin-Roger <i>et al</i> , 2016 (52)	
	STAT6 <sup>-/-</sup> mice exhibit reduced colonic expression of cyclooxygenase-2 and nuclear $\beta$ -catenin in experimentally induced colon cancer.	Leon-Cabrera <i>et al</i> , 2017 (33)	
	Patients with CAC exhibit a shift from pSTAT6 to pSTAT3 in colonic epithelial and mucosal immune cells during neoplastic transformation.	Wick <i>et al</i> , 2012 (36)	
	Proliferation		

Table I. Continued.

System/process affected	Mechanism implicated	First author, year (ref.)
Metastasis	High STAT6 expression levels concur with lymph node metastasis and low survival rates in patients with CCR patients. IL-13R $\alpha$ 2 signaling favors 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression, a key enzyme involved in liver metastasis during CCR development. Activation of PI3K, Akt and SRC in response to IL-13 is associated with increased levels of IL-13R $\alpha$ 2 in highly metastatic CRC cells. Increasing IL-4 abundance contributes to NADPH oxidase 1 expression along with production of reactive oxygen species in human colon cancer cells.	Wang <i>et al</i> , 2010 (26) Jiang <i>et al</i> , 2016 (38) Barderas <i>et al</i> , 2012 (39) Liu <i>et al</i> , 2017 (42)
DNA damage		

CRC, colorectal cancer; CAC, colitis-associated cancer; DSS, dextran sulfate sodium; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; IL-R, interleukin (receptor); pSTAT, phosphorylated signal transducer and activator of transcription.

and migration (20). A previous study suggested that PDGF and STAT6 have related functions. PDGF is able to activate STAT6 in fibroblasts to promote their proliferation (21). The IL-13/STAT6 signaling pathway upregulates PDGF mRNA expression levels in lung fibroblasts, and STAT6 is required for PDGF-A and PDGF-C gene expression, with important implications in tumor development (22). Therefore, STAT6 is a key regulatory molecule with tumor proliferating functions that may aid the identification of molecular targets for the treatment of colon cancer.

### 3. STAT6 and its role in CRC

Clinically detectable IBD increases the risk of CAC; patients with UC have an increased risk (2.4-fold) of developing CAC (23), while patients with CD have an increased risk (2.59-fold) of developing CAC in the next two decades, compared with the general population (24).

Expression of the constitutively activated IL-4/IL-13/STAT6 axis during UC, CD and in colon cancer tissues suggests that this pathway may contribute to the underlying pathology of these diseases. In a previous study, immunohistochemistry analyses were performed to detect phosphorylated STAT6 (pSTAT6) in colonic tissues of pediatric subjects with UC or CD, and it was demonstrated that nuclear pSTAT6 was significantly upregulated in the colonic epithelium (25). Furthermore, STAT6 was significantly upregulated in neoplastic tissues of patients with CRC, and its expression was associated with lower survival rates and with lymph node metastasis (26). Gene expression levels of IL-4, IL-5 and IL-13 were significantly upregulated in tumors compared with those in normal tissues of patients with CRC; however, no apparent effect on clinical outcome was observed (27). By contrast, a study performed by Formentini *et al* (28) revealed that IL-4, IL-13, IL-4R and IL-13R were expressed in CRC specimens, and that high expression levels of IL-4, IL-4R and IL-13R were associated with a lower frequency of lymph node metastasis, while IL-13 expression was associated with a better overall survival rate.

IL-13-induced activation of STAT6 has been implicated in mediating the host inflammatory cascade in UC. A mouse model of oxazolone-induced UC demonstrated that IL-13 is responsible for inducing the expression of the pore-forming tight junction protein claudin-2, increasing epithelial barrier permeability and compromising gastrointestinal barrier function (29). In addition, epithelial cells, T cells, macrophages and natural killer T cells exhibit increased STAT6 phosphorylation during colitis development (29). When colitis was induced in STAT6-deficient mice, decreased pathology, claudin-2 expression, and secretion of IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- $\gamma$  were observed (29). CD4<sup>+</sup> Th2 cells produce IL-13, which favors IgE production by B cells, and induce mast cell activation, suggesting that STAT6 contributes to the pathogenesis of colitis (30). Therefore, IL-13 seems to drive STAT6 phosphorylation, alter epithelial barrier function, regulate Th2 cytokine production and mediate the inflammatory response to colitis.

The IL-13/STAT6 signaling pathway may be detrimental for intestinal epithelial cell function. The downregulation of matriptase and prostasin, two membrane-anchored serine proteases important for the epithelial barrier development and for homeostasis, was observed in a dextran sulfate sodium



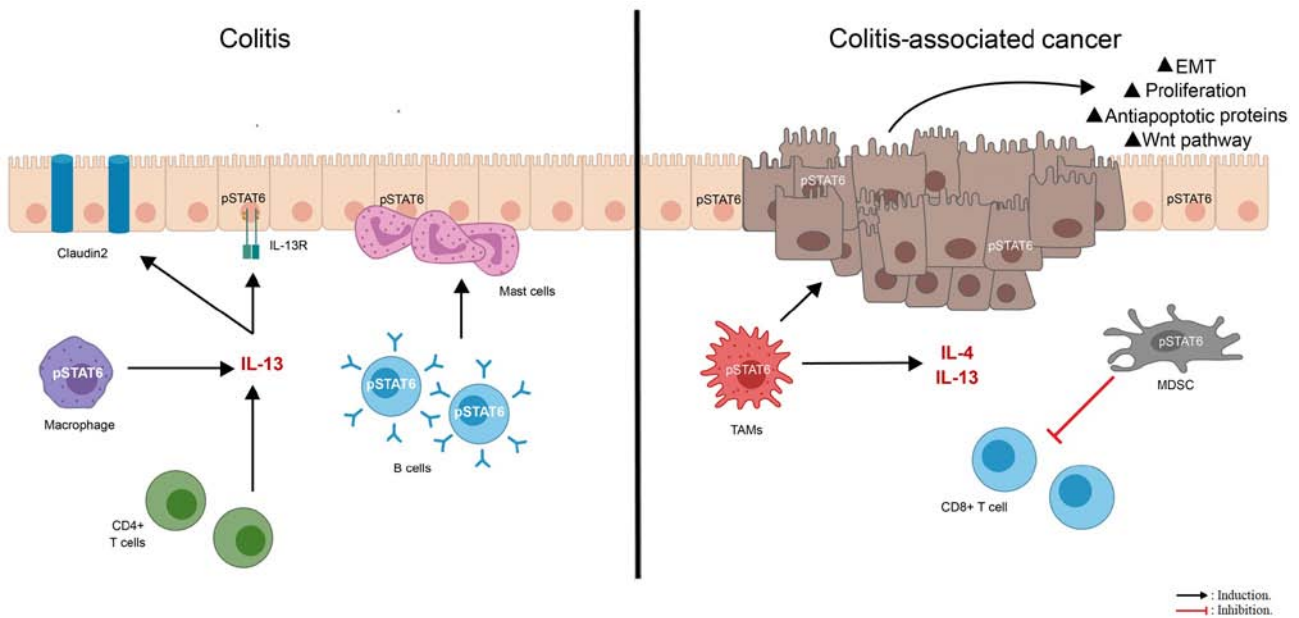


Figure 1. STAT6 modulates pro-colitis and pro-cancer responses. The IL-13/STAT6 signaling pathway appears to be detrimental to the function of intestinal epithelial cells in subjects with ulcerative colitis or Crohn's disease, in which nuclear pSTAT6 is significantly increased in the colonic epithelium. IL-13 signaling alters the expression of proteins, including the pore-forming tight junction protein claudin-2, matriptase, prostasin and serotonin, involved in epithelial barrier permeability and gastrointestinal barrier function via STAT6. In addition, IL-13 produced by CD4<sup>+</sup> T helper 2 cells favors STAT6 phosphorylation in mast cells, B cells and macrophages during the development of colitis, suggesting that STAT6 signaling in immune cells favors the progression of the disease. In the tumor microenvironment, STAT6 coordinates both polyp cell proliferation and myeloid-derived suppressor cell expansion. Furthermore, the IL-4/STAT6 signaling pathway induces the expression of anti-apoptotic proteins and the growth of epithelial colon cancer cells. STAT6 activation prompts the differentiation of infiltrating macrophages into a tumor-associated phenotype with pro-tumoral functions; these M2 macrophages promote mucosal repair through the activation of the Wnt signaling pathway. However, mutations that cause aberrant Wnt signaling are responsible for polyp development in the small intestine and colon. Additionally, the exposure to IL-13 enhances the expression of epithelial-to-mesenchymal transition-promoting factors, resulting in a decrease in adhesion, migration, invasion and metastatic colonization. pSTAT6, phosphorylated signal transducer and activator of transcription 6; IL-R, interleukin receptor; TAMs, tumor-associated macrophages; MDSC, myeloid-derived suppressor cell.

(DSS)-induced model of colitis in mice and in colonic tissues from human subjects with active UC and CD (31). When STAT6 was inhibited by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), the expression levels of matriptase and prostasin were restored and barrier dysfunction was decreased, implicating STAT6 signaling in the loss of the barrier-protective protease pathway (31). Enterochromaffin cells, which are responsible for synthesizing serotonin to increase epithelial cell secretion, express IL-13R (32). In a model of DSS-induced colitis, the administration of IL-13 increased colonic serotonin production and exacerbated the severity of colitis (32). It is unclear whether these effects are unique to colitis or increase the risk of developing CRC. Previous studies have revealed that STAT6 serves important roles in the early steps of colitis-associated carcinogenesis and that it modulates inflammatory responses, as well as controlling cell recruitment and proliferation (33,34). CAC induction in STAT6-deficient mice (STAT6<sup>-/-</sup>) in a azoxymethane/DSS model resulted in reduced tumorigenicity, associated with reduced inflammation, decreased concentrations of cyclooxygenase-2 (COX2) and nuclear  $\beta$ -catenin protein in the colon, and decreased mRNA expression levels of cytokines IL-17A and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (33). In addition, the number of circulating inflammatory monocytes and granulocytes was decreased in STAT6<sup>-/-</sup> mice (33). Furthermore, STAT6 deletion in the Apc<sup>Min/+</sup> mouse model reduced the incidence of polyps in the small intestine and decreased the proliferation of polyp epithelial cells; this effect was attributed to an

expansion of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), implying regulation of the antitumor T-cell response in a STAT6-dependent manner (34). Therefore, STAT6 may serve a broad role in coordinating both polyp cell proliferation and MDSC expansion. By contrast, Oliveira *et al* (35) reported that STAT6-deficient mice are more susceptible to mucosal damage during DSS-induced colitis, and exhibit enhanced intestinal epithelial cell apoptosis, tissue injury and inflammatory responses. Chromatin condensation in intestinal epithelial cells is affected by STAT6 signaling and may protect cells from apoptosis and severe tissue damage (35). However, the role of STAT6 during different stages of colitis and tumor cell proliferation has not been fully elucidated.

The activation and function of STAT6 in colitis along the continuum of inactive disease to CAC are dynamic. In a previous study, immunohistochemistry to detect pSTAT1, pSTAT6 and pSTAT3 in colonic epithelial and mucosal immune cells in patients with UC and CAC was performed. A shift from predominant STAT6 activation in immune cells to STAT3 activation accompanied the onset of dysplasia with a concomitant increase in epithelial cell STAT3 activation in low- and high-grade tumors. STAT6 expression was frequently detected in normal tissues, but not in CAC tissues (36). The decrease in pSTAT6 expression in both immune cells and intestinal epithelial cells indicates that STAT6 signaling may be detrimental in the transition from colitis to cancer. Nevertheless, abnormal STAT6 signaling has been implicated in pro-metastatic processes, including

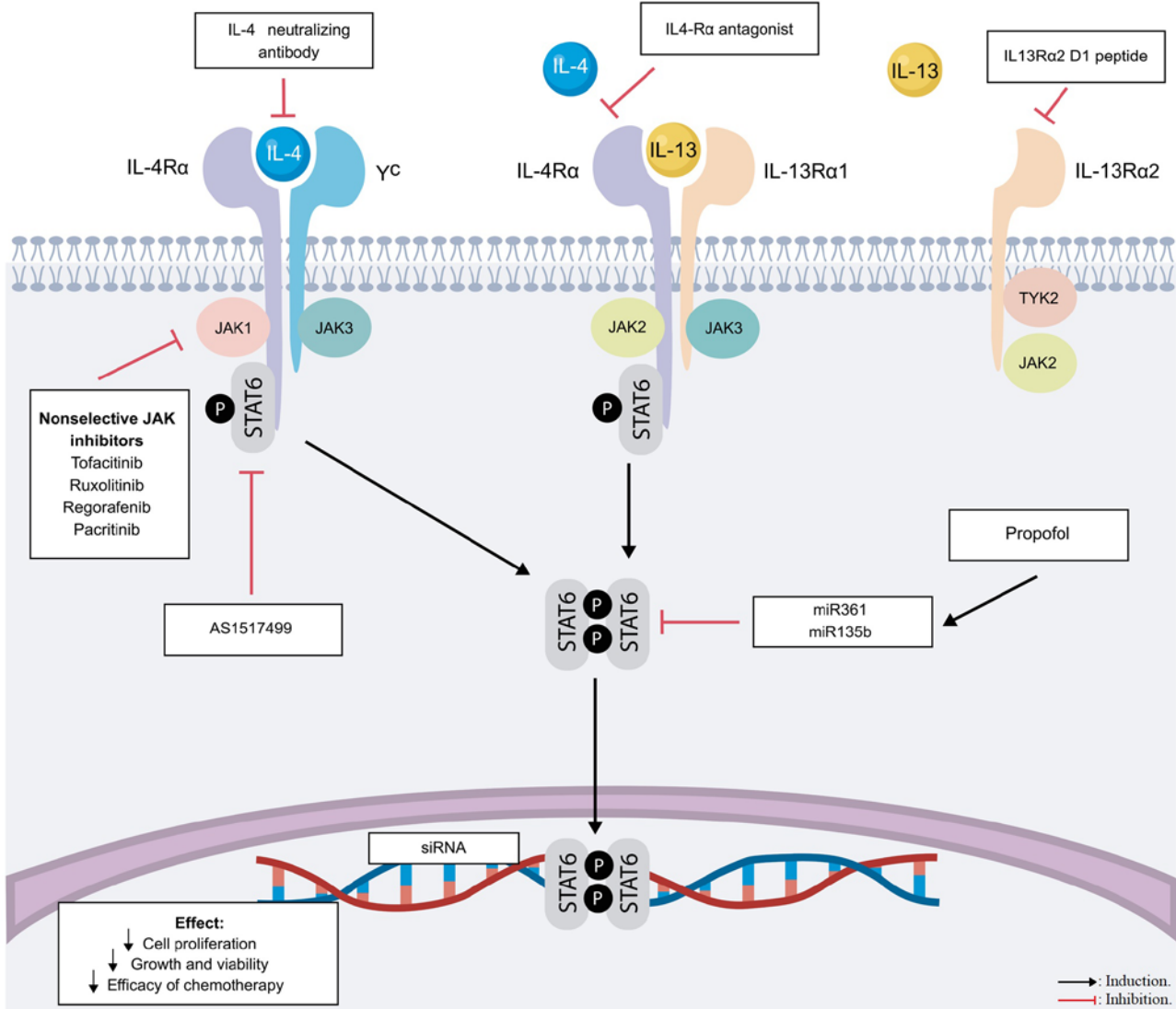


Figure 2. Targeting the IL-4/IL-13/STAT6 signaling pathway for cancer therapy. Upon cytokine-receptor binding, JAK1, JAK2 or tyrosine kinase 2 are recruited and activated, inducing the phosphorylation of STAT6. STAT6 homodimers translocate to the nucleus and bind DNA sequences at genes involved in apoptosis, proliferation and the immune response. Various drug targets have been evaluated to block IL-4, IL-4R, IL-13R $\alpha$ 1 or STAT6. Points of potential therapeutic inhibition of the pathway are indicated. STAT6, signal transducer and activator of transcription 6; IL-R, interleukin receptor; JAK, Janus kinase; miR, microRNA; siRNA, small interfering RNA;  $\gamma$ c,  $\gamma$  chain.

the proliferation and survival of colon cancer cells (37-39). During the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), epithelial cells transform into aggressive phenotypes with enhanced migratory capacity and invasiveness. Exposure to IL-13 enhances the expression of the EMT-promoting factor zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1) in the colon cancer HT29 and SW480 cell lines (37). When STAT6 is blocked or knocked down, the IL-13-induced EMT and ZEB1 induction in CRC cells is reversed (37). Additionally, a positive association between IL-13R $\alpha$ 1 and ZEB1 at the mRNA level has been observed in human CRC samples, demonstrating that the IL-13/STAT6 signaling pathway serves a critical role in promoting EMT and the aggressiveness of CRC (37). 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type II (11 $\beta$ HSD2) is a key enzyme induced in an IL-13R $\alpha$ 2-dependent manner that promotes the expression of Akt and COX2; upon inhibiting 11 $\beta$ HSD2, liver metastasis is decreased, suggesting that IL-13 may regulate malignancy via 11 $\beta$ HSD2 during CRC (38). In

addition, highly metastatic CRC cells express high levels of IL-13R $\alpha$ 2 (39). IL-13R $\alpha$ 2 silencing results in a decrease in adhesion, migration, invasion and metastatic colonization. In a previous study, the upregulation of IL13R $\alpha$ 2 expression in 66% of tumor samples from patients with colon cancer was associated with late stages of progression (metastasis in lymph nodes or liver) and a poor outcome in patients with CRC. Highly metastatic CRC cells exhibit activation of PI3K, Akt and SRC proto-oncogene non-receptor tyrosine kinase in response to IL-13, supporting the role of the IL-13/IL-13R/STAT6 signaling pathway in CRC cell invasion and metastasis (39).

Additionally, STAT6 phosphorylation is induced by IL-4. E2F transcription factor 1 (E2F1), a critical transcription factor for CRC development, increases STAT6 expression in colon cancer cells and increases their susceptibility to IL-4 stimulation. E2F1 acts as an enhancer of the IL-4/STAT6 signaling pathway and increases the expression of EMT drivers in CRC cells (40). IL-4 is able to induce the expression



of anti-apoptotic proteins and the growth of epithelial colon cancer cells *in vivo* and *in vitro*. IL-4 neutralization sensitizes colon carcinoma cells to chemotherapy and to death by the TNF-related apoptosis-inducing ligand (41). Abnormal IL-4/STAT6 activation induces the expression of survivin, a protein with an important role in apoptosis resistance in colon cancer stem cells; the use of leflunomide, a STAT6 inhibitor, has been shown to decrease survivin expression and localization, thereby reducing its anti-apoptotic effect (19). An increase in IL-4 expression contributes to an oxidant milieu, thereby increasing the expression of NADPH oxidase 1 and reactive oxygen species, resulting in DNA damage and the neoplastic transformation of colon cells (42). Further evidence indicates that IL-4 is implicated in the inhibition of colon cancer cell-cell adhesions, acting as a negative regulator in the expression of E-cadherin, a key component of adherent junctions, and in maintaining epithelial cell adhesion and decreasing invasiveness (43).

Increasing evidence demonstrates that STAT6 serves an important role in the regulation of tumor immunity. The use of the STAT6-specific inhibitor AS1517499 has been shown to decrease colonic tumor load and the number of circulating inflammatory monocytes and granulocytes in experimental models of CAC (33). The reduced number of the aforementioned cells may be associated with decreased macrophage infiltration and reduced tumor growth. IL-4/IL-13 cytokines, via STAT6 activation, induce the differentiation of infiltrating macrophages to an M2 phenotype with pro-tumoral functions. The pharmacological inhibition of STAT6 with AS1517499 was shown to attenuate tumor growth and liver metastasis in an orthotopic 4T1 mammary carcinoma mouse model (44). This result was associated with a decrease in tumor-associated macrophages displaying the M2 phenotype, suggesting that IL-4 blockade inhibits tumor angiogenesis and growth by reprogramming macrophages to a less aggressive phenotype (45). In addition, the deletion of the STAT6 gene was demonstrated to improve antitumor immunity in the same model via a type I CD4<sup>+</sup> response (46).

Autocrine production of IL-4 by colon cancer cells protects against apoptosis and chemotherapy-induced cell death (47-50). It was found that IL-4 was highly expressed in cancer-initiating cells obtained from patients with CRC and was associated with low immunogenic profiles; blocking IL-4 increased Th1-type CD8<sup>+</sup> T cells responses *in vitro* (51). Previous studies also revealed that STAT6 maintains mucosal homeostasis by sustaining myeloid cells. STAT6<sup>-/-</sup> mice with acute murine colitis exhibited delayed wound healing and decreased mucosal expression levels of Wnt ligands, which are important responses to epithelial injury (52). The administration of M2 macrophages to STAT6<sup>-/-</sup> mice promoted mucosal repair through the activation of the Wnt signaling pathway; however, mutations that cause aberrant Wnt signaling are responsible for polyp development in the small intestine and colon (52). In the APC<sup>min/+</sup> mouse model, which recapitulates the disease observed in patients with familial APC, STAT6 promoted the expansion of MDSCs and decreased the cytotoxicity of CD8 T cells, contributing to intestinal tumorigenesis (34). The identification of the direct functions of STAT6 on immunosurveillance and epithelial cell homeostasis may serve as the basis for the development of novel immunotherapy strategies.

The aforementioned results demonstrate that the IL-4/IL-13/STAT6 axis may serve a role in inflammation, tumor cell proliferation, cancer cell survival and metastasis, and that the interference of its effects in colitis or in tumor cells may present a novel strategy for the treatment of CRC (Fig. 1; Table I).

#### 4. Targeting STAT6 for colon cancer therapy

To the best of our knowledge, the use of specific STAT6 inhibitors in preclinical and clinical studies for colon cancer has not been reported. However, in experimental models and cancer cell lines, STAT6 inhibition decreases tumor cell proliferation, survival, adhesion, invasion and metastasis, suggesting that STAT6 inhibition may serve as a therapeutic target in colon cancer.

The use of the STAT6-specific inhibitor AS1517499 reduced tumor growth and signs of the disease in mice with CRC (33,53). *In vivo*, STAT6 inhibition reduced colonic tumor load and colon tissue damage, corresponding with a decrease in STAT6 phosphorylation in the intestine (33). In an orthotopic 4T1 mammary carcinoma mouse model, the use of AS1517499 attenuated tumor growth and early liver metastasis (44). Similarly, in primary epithelial cells from patients with prostate cancer, exposure to AS1517499 decreased IL-4-induced colony formation (54). Upregulation of microRNA (miRNA/miR)-361 and miR-135b is associated with a decrease in STAT6 expression (55). The common intravenous anesthetic agent propofol has been associated with a reduction in tumor-associated inflammation and with the ability to induce miRNAs to suppress STAT6 expression (55). The treatment of the CRC SW480 and RKO cell lines with propofol was shown to increase the expression levels of miR-135b and miR-361, which are STAT6-targeting miRNAs, and decrease cell proliferation and migration, suggesting that propofol interferes with the IL-13/STAT6 signaling pathway (55). Nevertheless, the *in vivo* effect of propofol requires further investigation. A preclinical model utilizing small interfering RNA (siRNA) to specifically suppress STAT6 expression in lung epithelial cells was reported (56); the study stated that the intranasal application of STAT6 siRNAs attenuated allergic airway inflammation, demonstrating that STAT6 may be targeted in specific tissues. Therefore, further studies evaluating the possibility of suppressing STAT6 signaling in the colonic epithelium are required. The use of STAT6 inhibitors results in the inhibition of type I and type II IL-4Rs, and therefore, the negative implications for normal immune functions should be determined.

#### 5. Targeting IL-4, IL-13, IL-4R and IL-13R $\alpha$ 2 in colon cancer therapy

IL-4 and IL-13 bind to their receptors and activate the JAK/STAT6 signaling pathway. Therefore, the use of molecules that can block binding or impair the signaling of these cytokines to prevent STAT6 activation may be clinically relevant. Previous studies have revealed that blocking IL-4 and IL-13, as well as their receptors, has different consequences on tumor development (Fig. 2).

The synthetic IL-13R $\alpha$ 2 D1 peptide inhibits IL-13-mediated STAT6 activation through IL-13R $\alpha$ 1, and blocks IL-13 binding to IL-13R $\alpha$ 2, decreasing IL-13 signaling; the administration of IL-13R $\alpha$ 2 D1 peptide was previously shown to repress tumor growth, invasion and proliferation in a metastatic CRC mouse model (57).

The direct administration of anti-IL-4 antibody in combination with chemotherapy suppresses the growth and viability of the Caco cell line; this effect is associated with a decrease in the expression levels of the CRC stem cell marker CD133, suggesting that anti-IL-4 therapy may enhance the efficacy of chemotherapy regimens (58). When conventional drugs, such as 5-fluorouracil or oxaliplatin, are combined with an IL-4 neutralizing antibody or an inhibitory form of IL-4, the efficacy of chemotherapy is enhanced in both mature cancer cells and cancer-stem like cells (59). Similarly, it has been shown that when IL-4 and IL-13 responses are inhibited by an IL-4R $\alpha$  antagonist in nude mice injected with colon cancer spheroids, the tumor response to chemotherapeutic drugs is enhanced (60). The increased production of IL-4 in cancer cells may favor a death-resistant phenotype, and limiting the production and/or signaling of IL-4 may be an alternative approach for treatment-resistant cells.

The antitumor effect of doxorubicin has been widely reported (61). In a previous study, the liposomal form of doxorubicin was conjugated with a ligand of the atherosclerotic plaque-specific peptide-1 (AP1), a peptide characterized by its ability to bind IL-4R; Yang *et al* (62) proposed that AP1-conjugated liposomal doxorubicin exhibits an increased and selective cytotoxic effect on CRC cells, and has potential as a targeted anticancer therapy. Collectively, the aforementioned studies demonstrated that the inhibition of IL-4, IL-4R, IL-13R $\alpha$ 1 and IL-13R $\alpha$ 2 may be beneficial for colon cancer.

## 6. Clinical trials targeting JAKs in colon cancer therapy

It is well known that IL-4R,  $\gamma$ c and IL-13R $\alpha$ 1 activate JAK1/2 and Tyk2. STAT6 is phosphorylated following JAK activation and forms homodimers that translocate to the nucleus. JAK molecules have been targeted therapeutically to treat rheumatoid arthritis, psoriasis and IBD (63,64). The inhibition of the JAK/STAT inflammatory pathway may be an alternative for the treatment of CRC. However, to the best of our knowledge, JAK inhibitors have not been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of colon cancer.

In addition to activating STAT6, JAKs mediate a number of cytokine receptor responses (3). While several cytokines are involved in inflammatory responses that may promote cancer development, other cytokines regulate processes involved in mucosal healing, barrier function and immunosurveillance (3-5). For example, the inhibition of JAK1 may alter the signaling of IL-2, IL-7, IL-9, IL-6 and IL-10 (4). Changes in IL-10, an important anti-inflammatory cytokine, may affect intestinal homeostasis. In addition, the function of T cells and natural killer cells may be altered as a result of changes in cytokine signaling (3,4). The inhibition of JAKs in response to IL-4 mediates alterations in Akt, ERK and mTOR, which are involved in several processes (12). Therefore, it is difficult to discern and control the effect of JAK inhibition, particularly in cancer development, where the tumor and stromal cells

are actively interacting through cytokines. Consequently, the use of JAK inhibitors for the treatment of colon cancer is not widespread. Ruxolitinib, an oral selective inhibitor of JAK1/2, is approved by the FDA for use in myelofibrosis (65). Ruxolitinib was tested in a phase 2 study in combination with regorafenib, an oral multi-targeted kinase inhibitor, in patients with advanced and metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum (66). However, there was no significant difference in the overall survival rate or progression-free survival rate between the regorafenib + placebo vs. regorafenib + ruxolitinib groups (66). Nevertheless, the treatment was administered in the advanced stages of tumor development, and the trial was terminated early per sponsor decision; therefore, further investigation is required, particularly during early stages of CRC.

Pacritinib, an oral inhibitor of JAKs and other kinases, was administered to patients with metastatic CRC; however, the study did not produce conclusive results as the trial was discontinued prior to completion (64). Additionally, the use of tofacitinib, a JAK1/3 inhibitor widely used for the treatment of rheumatoid arthritis, was found to be associated with an increase in lung metastasis accompanied with a decrease in natural killer cell number in a mouse model of colon cancer (67). Therefore, the development of selective tissue-specific inhibitors may overcome these types of complications.

## 7. Conclusions

Several studies have revealed that the IL-4/IL-13/STAT6 axis contributes to the pathology of IBD and colon cancer. Nuclear pSTAT6 is significantly increased in colonic epithelium and in neoplastic tissues obtained from patients with CRC, and its expression is associated with lower survival rates. Additionally, STAT6 seems to regulate mechanisms that promote the proliferation, survival, invasion and metastasis of tumor cells, as well as the suppression of antitumor immunity. Inhibiting STAT6 signaling in experimental models and cancer cell lines has resulted in a decrease in cancer-associated processes. Therefore, STAT6 may serve as a potential target in the treatment of colon cancer. However, to the best of our knowledge, STAT6 inhibitors in preclinical and clinical studies for colon cancer have not been reported. The indirect inhibition of the STAT6 signaling pathway through IL-4, IL-13 or JAKs may inhibit carcinogenesis, but it may also result in side effects as a consequence of alterations in the immune response. Therefore, preclinical and clinical studies investigating specific STAT6 inhibitors with a targeted organ distribution are required to evaluate the potential of STAT6 as a target for colon cancer therapy.

## Acknowledgements

Not applicable.

## Funding

The present study was supported by grants from Support Program for Research Projects and Technological Innovation (PAPIIT)(grant no. IA204218) and National Council for Science and Technology (CONACYT)(grant no. A1-S23944).

**Availability of data and materials**

Not applicable.

**Authors' contributions**

YDR and SLC contributed to the conception of the study, writing the manuscript and performing the literature search. VC and GVG collected and analyzed data. All authors read and approved the final manuscript.

**Ethics approval and consent to participate**

Not applicable.

**Patient consent for publication**

Not applicable.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' information**

YDR is a doctoral student from the Biomedical Sciences Doctorate Program, at the National University of Mexico and received a National Council for Science and Technology fellowship (606590).

**References**

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA and Jemal A: Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 68: 394-424, 2018.
- Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, van de Velde CJ and Watanabe T: Colorectal cancer. *Nat Rev Dis Primers* 1: 15065, 2015.
- West NR, McCuaig S, Franchini F and Powrie F: Emerging cytokine networks in colorectal cancer. *Nat Rev Immunol* 15: 615-629, 2015.
- Yu H, Pardoll D and Jove R: STATs in cancer inflammation and immunity: A leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* 9: 798-809, 2009.
- Hebenstreit D, Wirnsberger G, Horejs-Hoeck J and Duschl A: Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev* 17: 173-188, 2006.
- Chua KH, Ng JG, Ng CC, Hilmi I, Goh KL and Kee BP: Association of NOD1, CXCL16, STAT6 and TLR4 gene polymorphisms with Malaysian patients with Crohn's disease. *PeerJ* 4: e1843, 2016.
- Klein W, Tromm A, Folwaczny C, Hagedorn M, Duerig N, Epplen J, Schmiegel W and Griga T: The G2964A polymorphism of the STAT6 gene in inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 37: 159-161, 2005.
- Xia B, Crusius JB, Wu J, Zwiers A, van Bodegraven AA and Pena AS: Signal transducer and activator of transcription 6 gene G2964A polymorphism and inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 131: 446-450, 2003.
- Mueller TD, Zhang JL, Sebald W and Duschl A: Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochim Biophys Acta* 1592: 237-250, 2002.
- Murata T, Noguchi PD and Puri RK: Receptors for interleukin (IL)-4 do not associate with the common gamma chain, and IL-4 induces the phosphorylation of JAK2 tyrosine kinase in human colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 270: 30829-30836, 1995.
- Sengupta S, Thaci B, Crawford AC and Sampath P: Interleukin-13 receptor alpha 2-targeted glioblastoma immunotherapy. *Biomed Res Int* 2014: 952128, 2014.
- Mikita T, Campbell D, Wu P, Williamson K and Schindler U: Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6. *Mol Cell Biol* 16: 5811-5820, 1996.
- Gupta S, Jiang M and Pernis AB: IFN-alpha activates Stat6 and leads to the formation of Stat2:Stat6 complexes in B cells. *J Immunol* 163: 3834-3841, 1999.
- Dickensheets H, Vazquez N, Sheikh F, Gingras S, Murray PJ, Ryan JJ and Donnelly RP: Suppressor of cytokine signaling-1 is an IL-4-inducible gene in macrophages and feedback inhibits IL-4 signaling. *Genes Immun* 8: 21-27, 2007.
- Li Y, Deuring J, Peppelenbosch MP, Kuipers EJ, de Haar C and van der Woude CJ: STAT1, STAT6 and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) signaling drive SOCS3 expression in inactive ulcerative colitis. *Mol Med* 18: 1412-1419, 2012.
- Hanson EM, Dickensheets H, Qu CK, Donnelly RP and Keegan AD: Regulation of the dephosphorylation of Stat6. Participation of Tyr-713 in the interleukin-4 receptor alpha, the tyrosine phosphatase SHP-1, and the proteasome. *J Biol Chem* 278: 3903-3911, 2003.
- Lu X, Malumbres R, Shields B, Jiang X, Sarosiek KA, Natkunam Y, Tiganis T and Lossos IS: PTP1B is a negative regulator of interleukin 4-induced STAT6 signaling. *Blood* 112: 4098-4108, 2008.
- Chen W, Daines MO and Hershey GK: Methylation of STAT6 modulates STAT6 phosphorylation, nuclear translocation, and DNA-binding activity. *J Immunol* 172: 6744-6750, 2004.
- Di Stefano AB, Iovino F, Lombardo Y, Eterno V, Höger T, Dieli F, Stassi G and Todaro M: Survivin is regulated by interleukin-4 in colon cancer stem cells. *J Cell Physiol* 225: 555-561, 2010.
- Huang F, Wang D, Yao YL and Wang M: PDGF signaling in cancer progression. *Int J Clin Exp Med* 10: 9918-9929, 2017.
- Patel BK, Wang LM, Lee CC, Taylor WG, Pierce JH and LaRochelle WJ: Stat6 and Jak1 are common elements in platelet-derived growth factor and interleukin-4 signal transduction pathways in NIH 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* 271: 22175-22182, 1996.
- Ingram JL, Antao-Menezes A, Mangum JB, Lyght O, Lee PJ, Elias JA and Bonner JC: Opposing actions of Stat1 and Stat6 on IL-13-induced up-regulation of early growth response-1 and platelet-derived growth factor ligands in pulmonary fibroblasts. *J Immunol* 177: 4141-4148, 2006.
- Jess T, Rungoe C and Peyrin-Biroulet L: Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: A meta-analysis of population-based cohort studies. *Clin Gastroenterol Hepatol* 10: 639-645, 2012.
- von Roon AC, Reese G, Teare J, Constantinides V, Darzi AW and Tekkis PP: The risk of cancer in patients with Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* 50: 839-855, 2007.
- Rosen MJ, Frey MR, Washington MK, Chaturvedi R, Kuhnhein LA, Matta P, Revetta FL, Wilson KT and Polk DB: STAT6 activation in ulcerative colitis: A new target for prevention of IL-13-induced colon epithelial cell dysfunction. *Inflamm Bowel Dis* 17: 2224-2234, 2011.
- Wang CG, Ye YJ, Yuan J, Liu FF, Zhang H and Wang S: EZH2 and STAT6 expression profiles are correlated with colorectal cancer stage and prognosis. *World J Gastroenterol* 16: 2421-2427, 2010.
- Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Pagès F and Galon J: Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 71: 1263-1271, 2011.
- Formentini A, Braun P, Fricke H, Link KH, Henne-Bruns D and Kornmann M: Expression of interleukin-4 and interleukin-13 and their receptors in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 27: 1369-1376, 2012.
- Rosen MJ, Chaturvedi R, Washington MK, Kuhnhein LA, Moore PD, Coggeshall SS, McDonough EM, Weitkamp JH, Singh AB, Coburn LA, *et al*: STAT6 deficiency ameliorates severity of oxazolone colitis by decreasing expression of claudin-2 and Th2-inducing cytokines. *J Immunol* 190: 1849-1858, 2013.
- Hoving JC, Kirstein F, Nieuwenhuizen NE, Fick LC, Hobeika E, Reth M and Brombacher F: B Cells that produce immunoglobulin E mediate Colitis in BALB/c mice. *Gastroenterology* 142: 96-108, 2012.

31. Buzza MS, Johnson TA, Conway GD, Martin EW, Mukhopadhyay S, Shea-Donohue T and Antalis TM: Inflammatory cytokines down-regulate the barrier-protective prostasin-matriptase proteolytic cascade early in experimental colitis. *J Biol Chem* 292: 10801-10812, 2017.
32. Shajib MS, Wang HQ, Kim JJ, Sunjic I, Ghia JE, Denou E, Collins M, Denburg JA and Khan WI: Interleukin 13 and Serotonin: Linking the immune and endocrine systems in murine models of intestinal inflammation. *PLoS One* 8: e72774, 2013.
33. Leon-Cabrera SA, Molina-Guzman E, Delgado-Ramirez YG, Vázquez-Sandoval A, Ledesma-Soto Y, Pérez-Plasencia CG, Chirino YI, Delgado-Buenrostro NL, Rodríguez-Sosa M, Vaca-Paniagua F, *et al*: Lack of STAT6 attenuates inflammation and drives protection against early steps of colitis-associated colon cancer. *Cancer Immunol Res* 5: 385-396, 2017.
34. Jayakumar A and Bothwell ALM: Stat6 promotes intestinal tumorigenesis in a mouse model of adenomatous polyposis by expansion of MDSCs and inhibition of cytotoxic CD8 response. *Neoplasia* 19: 595-605, 2017.
35. De Oliveira T, Ramakrishnan M, Diamanti MA, Ziegler PK, Brombacher F and 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* 38: 1787-1801, 2019.
36. Wick EC, LeBlanc RE, Ortega G, Robinson C, Platz E, Pardoll DM, Iacobuzio-Donahue C and Sears CL: Shift from pStat6 to pStat3 predominance is associated with inflammatory bowel disease-associated dysplasia. *Inflamm Bowel Dis* 18: 1267-1274, 2012.
37. Cao H, Zhang J, Liu H, Wan L, Zhang H, Huang Q, Xu E and Lai M: IL-13/STAT6 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *Oncotarget* 7: 61183-61198, 2016.
38. Jiang L, Cheng Q, Zhang B and Zhang M: IL-13 induces the expression of 11 $\beta$ HSD2 in IL-13R $\alpha$ 2 dependent manner and promotes the malignancy of colorectal cancer. *Am J Transl Res* 8: 1064-1072, 2016.
39. Barderas R, Bartolome RA, Fernandez-Acenero MJ, Torres S and Casal JI: High expression of IL-13 receptor  $\alpha$ 2 in colorectal cancer is associated with invasion, liver metastasis, and poor prognosis. *Cancer Res* 72: 2780-2790, 2012.
40. Chen J, Gong C, Mao H, Li Z, Fang Z, Chen Q, Lin M, Jiang X, Hu Y, Wang W, *et al*: E2F1/SP3/STAT6 axis is required for IL-4-induced epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *Int J Oncol* 53: 567-578, 2018.
41. Todaro M, Lombardo Y, Francipane MG, Alea MP, Cammareri P, Iovino F, Di Stefano AB, Di Bernardo C, Agrusa A, Condorelli G, *et al*: Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell Death Differ* 15: 762-772, 2008.
42. Liu H, Antony S, Roy K, Juhasz A, Wu Y, Lu J, Meitzler JL, Jiang G, Polley E and Doroshov JH: Interleukin-4 and interleukin-13 increase NADPH oxidase 1-related proliferation of human colon cancer cells. *Oncotarget* 8: 38113-38135, 2017.
43. Kanai T, Watanabe M, Hayashi A, Nakazawa A, Yajima T, Okazawa A, Yamazaki M, Ishii H and Hibi T: Regulatory effect of interleukin-4 and interleukin-13 on colon cancer cell adhesion. *Br J Cancer* 82: 1717-1723, 2000.
44. Binnemars-Postma K, Bansal R, Storm G and Prakash J: Targeting the Stat6 pathway in tumor-associated macrophages reduces tumor growth and metastatic niche formation in breast cancer. *FASEB J* 32: 969-978, 2018.
45. Linde N, Lederle W, Depner S, van Rooijen N, Gutschalk CM and Mueller MM: Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages. *J Pathol* 227: 17-28, 2012.
46. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P, Clements V, Dissanayake SI, Miller S, Davis C and Danna E: Signal transducer and activator of transcription 6 (Stat6) and CD1: Inhibitors of immunosurveillance against primary tumors and metastatic disease. *Cancer Immunol Immunother* 53: 86-91, 2004.
47. Conticello C, Pedini F, Zeuner A, Patti M, Zerilli M, Stassi G, Messina A, Peschle C and De Maria R: IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins. *J Immunol* 172: 5467-5477, 2004.
48. Francipane MG, Alea MP, Lombardo Y, Todaro M, Medema JP and Stassi G: Crucial role of interleukin-4 in the survival of colon cancer stem cells. *Cancer Res* 68: 4022-4025, 2008.
49. Li BH, Yang XZ, Li PD, Yuan Q, Liu XH, Yuan J and Zhang WJ: IL-4/Stat6 activities correlate with apoptosis and metastasis in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 369: 554-560, 2008.
50. Li BH, Xu SB, Li F, Zou XG, Saimaiti A, Simayi D, Wang YH, Zhang Y, Yuan J and Zhang WJ: Stat6 activity-related Th2 cytokine profile and tumor growth advantage of human colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Signal* 24: 718-725, 2012.
51. Volonte A, Di Tomaso T, Spinelli M, Todaro M, Sanvito F, Albarello L, Bissolati M, Ghirardelli L, Orsenigo E, Ferrone S, *et al*: Cancer-initiating cells from colorectal cancer patients escape from T cell-mediated immunosurveillance in vitro through membrane-bound IL-4. *J Immunol* 192: 523-532, 2014.
52. Cosin-Roger J, Ortiz-Masia D, Calatayud S, Hernandez C, Esplugues JV and Barrachina MD: The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD. *Mucosal Immunol* 9: 986-998, 2016.
53. Mendoza-Rodriguez MG, Sanchez-Barrera CA, Callejas BE, García-Castillo V, Beristain-Terrazas DL, Delgado-Buenrostro NL, Chirino YI, León-Cabrera SA, Rodríguez-Sosa M, Gutierrez-Cirlos EB, *et al*: Use of STAT6 Phosphorylation inhibitor and trimethylglycine as new adjuvant therapies for 5-fluorouracil in colitis-associated tumorigenesis. *Int J Mol Sci* 21: pii: E2130, 2020.
54. Nappo G, Handle F, Santer FR, McNeill RV, Seed RI, Collins AT, Morrone G, Culig Z, Maitland NJ and Erb HHH: The immunosuppressive cytokine interleukin-4 increases the clonogenic potential of prostate stem-like cells by activation of STAT6 signalling. *Oncogenesis* 6: e342, 2017.
55. Xu K, Tao W and Su Z: Propofol prevents IL-13-induced epithelial-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells. *Cell Biol Int* 42: 985-993, 2018.
56. Healey GD, Lockridge JA, Zinnen S, Hopkin JM, Richards I and Walker W: Development of pre-clinical models for evaluating the therapeutic potential of candidate siRNA targeting STAT6. *PLoS One* 9: e90338, 2014.
57. Bartolome RA, Jaen M and Casal JI: An IL13R $\alpha$ 2 peptide exhibits therapeutic activity against metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 119: 940-949, 2018.
58. Gharib AF, Shalaby SM, Raafat N, Fawzy WMS and Abdel Hakim NH: Assessment of neutralizing interleukin-4 effect on CD133 gene expression in colon cancer cell line. *Cytokine* 97: 66-72, 2017.
59. Todaro M, Perez Alea M, Scopelliti A, Medema JP and Stassi G: IL-4-mediated drug resistance in colon cancer stem cells. *Cell Cycle* 7: 309-313, 2008.
60. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, Tripodo C, Russo A, Gulotta G, Medema JP and Stassi G: Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 1: 389-402, 2007.
61. Rivankar S: An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther* 10: 853-858, 2014.
62. Yang CY, Liu HW, Tsai YC, Tseng JY, Liang SC, Chen CY, Lian WN, Wei MC, Lu M, Lu RH, *et al*: Interleukin-4 receptor-targeted liposomal doxorubicin as a model for enhancing cellular uptake and antitumor efficacy in murine colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 16: 1641-1650, 2015.
63. O'Shea JJ, Kontzias A, Yamaoka K, Tanaka Y and Laurence A: Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis* 72 (Suppl 2): ii111-ii115, 2013.
64. Regenbogen T, Chen L, Trinkaus K, Wang-Gillam A, Tan BR, Amin M, Pedersen KS, Park H, Suresh R, Lim KH, *et al*: Pacritinib to inhibit JAK/STAT signaling in refractory metastatic colon and rectal cancer. *J Gastrointest Oncol* 8: 985-989, 2017.
65. Pardanani A and Tefferi A: How I treat myelofibrosis after failure of JAK inhibitors. *Blood* 132: 492-500, 2018.
66. Fogelman D, Cubillo A, Garcia-Alfonso P, Mirón MLL, Nemunaitis J, Flora D, Borg C, Mineur L, Vieitez JM, Cohn A, *et al*: Randomized, double-blind, phase two study of ruxolitinib plus regorafenib in patients with relapsed/refractory metastatic colorectal cancer. *Cancer Med* 7: 5382-5393, 2018.
67. Shimaoka H, Takeno S, Maki K, Sasaki T, Hasegawa S and Yamashita Y: A cytokine signal inhibitor for rheumatoid arthritis enhances cancer metastasis via depletion of NK cells in an experimental lung metastasis mouse model of colon cancer. *Oncol Lett* 14: 3019-3027, 2017.

