



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE STAT6 EN LA MODULACIÓN DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS
DURANTE LAS ETAPAS TEMPRANAS DEL CÁNCER DE COLON ASOCIADO A COLITIS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANA CATALINA RIVERA RUGELES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA SONIA ANDREA LEÓN CABRERA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR HERIBERTO PRADO GARCÍA

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

“ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

LOS REYES IZTACALA, EDO. MÉXICO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

**PARTICIPACIÓN DE STAT6 EN LA MODULACIÓN DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS
DURANTE LAS ETAPAS TEMPRANAS DEL CÁNCER DE COLON ASOCIADO A COLITIS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

ANA CATALINA RIVERA RUGELES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA SONIA ANDREA LEÓN CABRERA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR HERIBERTO PRADO GARCÍA

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

“ISMAEL COSÍO VILLEGAS”

LOS REYES IZTACALA, EDO. MÉXICO, 2022



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/415/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **21 de febrero de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **(BIOMEDICINA)** de la estudiante **RIVERA RUGELES ANA CATALINA** con número de cuenta **520461930** con la tesis titulada **"Participación de STAT6 en la modulación de las células T reguladoras durante las etapas tempranas del cáncer de colon asociado a colitis"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SONIA ANDREA LEON CABRERA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. SALVADOR FONSECA CORONADO
Vocal: DRA. NADIA JUDITH JACOBO HERRERA
Vocal: DRA. EDA PATRICIA TENORIO ZUMÁRRAGA
Vocal: DRA. MARIA ISABEL SOTO CRUZ
Secretario: DR. HERIBERTO PRADO GARCÍA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 11 de mayo de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

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

Agradecimientos institucionales

Este trabajo de grado fue realizado dentro del programa de posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el laboratorio de Inmunidad Tumoral de la Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

EL PRESENTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR LAS SIGUIENTES INSTITUCIONES Y PROYECTOS:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): A1-S- 23944, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica (PAPIIT), UNAM, Proyecto IN215421 y Fondo para la Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico del Estado de México, COMECYT proyecto FICDTEM-2021-079.

La alumna Ana Catalina Rivera Rugeles recibió una beca por parte del CONACyT (750194) y del proyecto PAPIIT IN215421.

Este trabajo de grado fue realizado con la asesoría de la Dra. Sonia Andrea León Cabrera como Tutora Principal, y de los miembros del Comité Tutorial formado por la Dra. Laura Cecilia Bonifaz Alfonso y el Dr. Heriberto Prado García.

Agradecimientos personales

La terminación de mis estudios de maestría no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas. Me gustaría agradecerle a la Dra. Sonia Andrea León Cabrera por darme la oportunidad de realizar mi investigación en su laboratorio, por compartir sus ideas conmigo y por su confianza en mis habilidades y mis ideas. Gracias a mis compañeros del Laboratorio de Inmunidad Tumoral, especialmente a Yael y a Eduardo, por explicarme y hacerme parte de sus proyectos de investigación, en los que se apoya mi propio trabajo. Gracias a la Dra. Mónica Mendoza, la Dra. Yadira Ledesma, el Dr. Efraín Olguín y la Dra. Leticia de la FES Iztacala UNAM, por su apoyo para acceder y trabajar en los diferentes laboratorios donde desarrollé mis actividades de investigación. Gracias al Dr. Galileo Escobedo por su apertura, disposición para ayudar, y apoyo logístico para realizar algunos de los experimentos de este trabajo. Finalmente, gracias a los miembros de mi jurado de examen de grado que me apoyaron con sus comentarios a mi manuscrito de tesis, en especial a la Dra. Eda Patricia Tenorio Zumarraga, por su tiempo, disposición y valiosísimas aportaciones.

Me gustaría agradecer a todas las personas cuya presencia en mi vida convirtió a México en mi segundo hogar. Y por supuesto, me gustaría agradecer a todos los amigos y familiares que, desde Colombia, mi país natal, siempre estuvieron dispuestas a escucharme y acompañarme a la distancia, en este proceso largo y a veces incierto que fue completar mi tesis.

Gracias a mi mamá y a mi hermano, quienes siempre me han demostrado su apoyo y amor. Gracias a Mackarena, parte irremplazable de mi vida en este último año, y en los años que vengan.

Contenido

Resumen.....	1
Abstract	3
1. Introducción	4
1.1. Cáncer de colon.....	4
1.1.1. Epidemiología.....	4
1.1.2. Factores de riesgo	5
1.2. Cáncer de colon asociado a colitis	6
1.2.1. Carcinogénesis en el cáncer de colon asociado a colitis	6
1.2.2. Respuesta inmune en el cáncer de colon asociado a colitis	9
1.2.3. Modelo murino de CAC.....	10
1.3. Las células T reguladoras y su rol en el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis	10
1.3.1. Generalidades	10
1.3.2. Fenotipo supresor de las Tregs	13
1.3.3. Las Tregs en IBD y CAC	15
1.4. Evidencias de la participación de STAT6 en el cáncer de colon asociado a colitis.....	16
1.4.1. La ausencia de STAT6 protege del desarrollo de tumores en el colon y es un blanco terapéutico atractivo.....	17
2. Antecedentes	20
2.1. Evidencias directas de la participación de STAT6 en el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis inducido por azoximetano/dextrán sulfato de sodio	20
3. Hipótesis.....	23
4. Objetivos	24
4.1. Objetivo principal.....	24
4.2. Objetivos específicos.....	24

II

5.	Estrategia experimental	25
5.1.	Estrategia experimental para la caracterización de una cepa de ratones STAT6 ^{-/-} / Foxp3 ^{EGFP} knock-in de fondo genético BALB/c	25
5.2.	Estrategia experimental para la determinación de la capacidad de diferenciación <i>in vitro</i> de Tregs a partir de linfocitos T CD4 ⁺ naïve provenientes de ratones WT y STAT6 ^{-/-}	26
5.3.	Estrategia experimental para el estudio de la frecuencia y el fenotipo de Tregs durante el transcurso del CAC en ratones FoxP3 ^{EGFP} y STAT6 ^{-/-} /FoxP3 ^{EGFP}	27
5.4.	Estrategia experimental para la determinación de la capacidad de supresión de Tregs provenientes de ratones WT y deficientes en STAT6	28
6.	Metodología	29
6.1.	Ratones.....	29
6.2.	Soluciones	29
6.3.	Modelo murino de cáncer de colon asociado a colitis.....	31
6.4.	Extracción de ADN genómico y PCR en punto final	32
6.5.	Diferenciación de Tregs <i>in vitro</i>	34
6.5.1.	Obtención de esplenocitos.....	34
6.5.2.	Separación magnética de linfocitos T CD4 ⁺ naïve	34
6.5.3.	Cultivo celular para diferenciación de Tregs <i>in vitro</i>	35
6.6.	Ensayo de supresión de Tregs <i>in vitro</i>	35
6.6.1.	Separación magnética de linfocitos T CD4 ⁺ totales	35
6.6.2.	<i>Cell sorting</i> de Tregs	35
6.6.3.	Preparación de los esplenocitos respondedores	36
6.6.4.	Cocultivo de Tregs con esplenocitos respondedores.....	36
6.7.	Citometría de flujo	37
6.7.1.	Tinción extracelular.....	37
6.8.	Análisis estadísticos.....	38
7.	Resultados	40

III

7.1.	Caracterización de ratones STAT6 ^{-/-} /Foxp3 ^{EGFP} <i>knock-in</i> de fondo genético BALB/c.	40
7.2.	La ausencia de STAT6 no altera la diferenciación de linfocitos T CD4 ⁺ naïve a Tregs <i>in vitro</i> . 41	
7.3.	La ausencia de STAT6 aumenta la capacidad de diferenciación de Tregs <i>in vitro</i> a partir de células T CD4 ⁺ naïve provenientes de ratones con inducción de CAC	45
7.4.	El porcentaje de linfocitos T CD8 ⁺ disminuye en ratones STAT6 ^{-/-} /FoxP3 ^{EGFP} en etapas iniciales de CAC	45
7.5.	Las Tregs provenientes de ratones STAT6 ^{-/-} en tratamiento de CAC tienen mayor capacidad supresora sobre linfocitos T CD4 ⁺ y T CD8 ⁺	54
8.	Discusión	61
9.	Conclusiones.....	70
10.	Perspectivas	71
11.	Referencias bibliográficas	72

Lista de figuras

Figura 1. Transformación maligna desencadenada por inflamación en el colon.....	8
Figura 2. Mecanismos inhibitorios empleados por los linfocitos T reguladores.....	13
Figura 3. Vía de señalización JAK-STAT.....	17
Figura 4. La activación de STAT6 en células inmunes y células no inmunes contribuye a la patología asociada con IBD y CRC.	19
Figura 5. Estrategia experimental para la caracterización de una cepa de ratones STAT6 ^{-/-} / Foxp3 ^{EGFP} knock-in de fondo genético BALB/c.....	25
Figura 6. Estrategia experimental para la determinación de la capacidad de diferenciación in vitro de células T reguladoras a partir de linfocitos T CD4 ⁺ naïve provenientes de ratones WT y STAT6 ^{-/-}	26
Figura 7. Estrategia experimental para el estudio de la frecuencia y el fenotipo de Tregs durante el transcurso del CAC en ratones FoxP3 ^{EGFP} y STAT6 ^{-/-} /FoxP3 ^{EGFP}	27
Figura 8. Estrategia experimental para la determinación de la capacidad de supresión de Tregs provenientes de ratones WT y deficientes en STAT6.....	28
Figura 9. Modelo murino de inducción de cáncer de colon asociado a colitis mediante el tratamiento con AOM y DSS.	32
Figura 10. Genotipos de ratones STAT6 ^{-/-} /FoxP3 ^{EGFP}	41
Figura 11. Identificación de Tregs a partir de sangre periférica de ratones Foxp3 ^{EGFP} y doble transgénicos con base en la expresión de CD4 y FoxP3 ^{EGFP}	42
Figura 12. Estrategia para la identificación de Tregs en cultivos celulares de linfocitos T CD4 ⁺ naïve con base en la expresión de CD4, CD25 y FoxP3.	43
Figura 13. Capacidad de diferenciación de linfocitos T CD4 ⁺ naïve provenientes de ratones deficientes en STAT6 a Tregs.....	44
Figura 14. La deficiencia de STAT6 aumenta la capacidad de diferenciación de células T naïve provenientes de ratones con inducción de CAC, a Tregs in vitro.	46
Figura 15. Desarrollo tumoral en ratones STAT6 ^{-/-} /Foxp3 ^{EGFP} con tratamiento de AOM/DSS.	48
Figura 16. Estrategia para la identificación y caracterización de Tregs a partir de esplenocitos de ratones doble transgénicos y reporteros en tratamiento con AOM/DSS.	49

Figura 17. Poblaciones celulares en ratones FoxP3^{EGFP} y STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} en etapas tempranas de desarrollo de CAC.	51
Figura 18. Caracterización de Tregs de ratones FoxP3^{EGFP} y STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} en etapas tempranas de desarrollo de CAC.	53
Figura 19. IMF de moléculas de superficie de Tregs en ratones FoxP3^{EGFP} y STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} en etapas tempranas de desarrollo de CAC.....	54
Figura 20. Pureza de las muestras obtenidas mediante separación magnética y cell sorting.....	55
Figura 21. Estrategia para el análisis de la supresión inducida por Tregs de ratones FoxP3^{EGFP} y STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} en tratamiento de inducción CAC, sobre la proliferación de células totales de bazo.....	56
Figura 22. Supresión de la proliferación celular de linfocitos T CD4⁺ por parte de Tregs de ratones en tratamiento de inducción de cáncer de colon asociado a colitis.....	59
Figura 23. Supresión de la proliferación celular de linfocitos T CD8⁺ por parte de Tregs de ratones en tratamiento de inducción de cáncer de colon asociado a colitis.....	60

Lista de tablas

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados en la PCR en punto final para genotipificación.	33
Tabla 2. Mezcla utilizada para la PCR en punto final para genotipificación.....	33
Tabla 3. Pasos del termociclador para la amplificación del gen STAT6.....	33
Tabla 4. Pasos del termociclador para la amplificación del gen FoxP3.	33
Tabla 5. Detalles de las tinciones empleadas en cada ensayo del proyecto de tesis.	39

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>AOM</i>	Azoximetano
<i>BALB/c</i>	Bagg albino.
<i>CAC</i>	Cáncer de colon asociado a colitis
<i>CRC</i>	Cáncer colorrectal
<i>CTLA-4</i>	Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos
<i>CTV</i>	CellTrace Violet
<i>DAI</i>	Índice de daño
<i>DC</i>	Célula dendrítica
<i>DSS</i>	Dextrán sulfato de sodio
<i>EGFP</i>	Proteína dverde fluorescente mejorada
<i>FACS</i>	sorting de células activado por fluorescencia
<i>FoxP3</i>	Forkhead box P3
<i>IBD</i>	Enfermedad inflamatoria intestinal
<i>IMF</i>	Intensidad media de fluorescencia
<i>IL</i>	Interleucina
<i>iTregs</i>	Linfocitos T reguladores inducidos
<i>JAK</i>	Quinasa Janus
<i>PD-1</i>	Proteína de muerte celular programada 1
<i>PD-L1</i>	Ligando de la proteína de muerte celular programada 1
<i>pTregs</i>	Linfocitos T reguladores periféricos
<i>STAT</i>	Transductor de señales y activador de la transcripción
<i>STAT6^{-/-}</i>	Knockout de STAT6.
<i>TCR</i>	Receptor de células T
<i>Tim-3</i>	Inmunoglobulina de linfocitos T y proteína de dominio de mucina 3
<i>Tregs</i>	Linfocitos T reguladores
<i>tTregs</i>	Linfocitos T reguladores tímicos
<i>WT</i>	Wild type

Resumen

Se ha reportado que los ratones deficientes en STAT6 (STAT6^{-/-}) son altamente resistentes a la tumorigénesis inducida en un modelo murino de cáncer de colon asociado a colitis (CAC). La protección frente al desarrollo tumoral observada en estos animales coincide con un número elevado de células T reguladoras (Tregs) intestinales y sistémicas en etapas tempranas de la carcinogénesis. Este proyecto tuvo como objetivo analizar la diferenciación y la capacidad supresora de las Tregs presentes en un modelo murino deficiente de STAT6 y sus implicaciones en el desarrollo del CAC. Para determinar si la deficiencia en STAT6 afecta la capacidad de generación de Tregs *in vitro*, linfocitos T CD4⁺ naïve fueron aislados de ratones WT y STAT6^{-/-} y se cultivaron durante seis días con IL-2, TGF-β y ácido holo-transretinoico. Se observó que la deficiencia de STAT6 no promueve una mayor diferenciación de células CD4⁺FoxP3⁺ (Tregs). Por el contrario, al emplear linfocitos T CD4⁺ naïve de animales a los cuales se les indujo CAC experimental empleando azoximetano y dextrán sulfato de sodio (AOM/DSS), se estableció que las células provenientes de ratones STAT6^{-/-} se diferenciaron tres veces más a Tregs a los 6 días de cultivo. Estos datos sugieren que cuando STAT6 está ausente, se favorece la diferenciación *in vitro* de células CD4⁺ naïve obtenidas durante el desarrollo de CAC, a Tregs. Con el fin de estudiar las Tregs provenientes de ratones STAT6^{-/-} y de emplearlas en ensayos funcionales *in vitro*, se caracterizó mediante PCR y citometría de flujo una cepa de ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} *knock-in* de fondo genético BALB/c, generada previamente en el laboratorio. Después de su caracterización, estos ratones se sometieron a tratamiento con AOM/DSS y se estableció que en etapas tempranas del desarrollo tumoral (día 20) los ratones STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} presentan un porcentaje de células CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ más elevado y un porcentaje de células CD8⁺ menor, que los ratones FoxP3^{EGFP}. Además, las Tregs provenientes de ratones STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} en etapas tempranas del CAC tienen una mayor capacidad supresora de la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺. en comparación con las Tregs obtenidas de ratones WT. Estos resultados sugieren que STAT6 determina la diferenciación, activación y capacidad supresora de las Tregs durante el CAC. La deficiencia de STAT6 en etapas tempranas de CAC promueve la diferenciación de Tregs *in vitro* y favorece su fenotipo supresor, generando Tregs capaces de controlar mejor la inflamación en el desarrollo del CAC.

Palabras clave: cáncer de colon asociado a colitis, STAT6, linfocito T regulador, inflamación, FoxP3, diferenciación, supresión, marcador de superficie.

Abstract

STAT6-deficient (STAT6^{-/-}) mice have been reported to be highly resistant to induced tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated colon cancer (CAC). The protection against tumor development observed in these animals coincides with a high number of intestinal and systemic regulatory T cells (Tregs) in early stages of carcinogenesis. This project aimed to analyze the differentiation and suppressive capacity of Tregs present in a STAT6-deficient murine model and its implications in the development of CAC. To determine whether STAT6 deficiency affects the ability to generate Tregs *in vitro*, naïve CD4⁺ T lymphocytes were isolated from WT and STAT6^{-/-} mice and cultured for six days with IL-2, TGF-β, and all-trans retinoic acid. It was observed that STAT6 deficiency does not promote a greater differentiation of CD4⁺FoxP3⁺ cells (Tregs). In contrast, using naïve CD4⁺ T lymphocytes from animals in which experimental CAC was induced using azoxymethane and sodium dextran sulfate (AOM/DSS), it was established that cells from STAT6^{-/-} mice differentiated three times more to Tregs after 6 days of culture. These data suggest that when STAT6 is absent, *in vitro* differentiation of naïve CD4⁺ cells obtained during CAC development to Tregs is favored. To study the Tregs from STAT6^{-/-} mice and to use them in *in vitro* functional assays, a strain of STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} knock-in mice with BALB/c genetic background was characterized by PCR and flow cytometry. After characterization, these mice were subjected to AOM/DSS treatment and it was established that in early stages of tumor development (day 20) STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} mice present a higher percentage of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ cells, and a lower percentage of CD8⁺ cells, than FoxP3^{EGFP} mice. In addition, Tregs from STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} mice in early stages of CAC have a greater capacity to suppress the proliferation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes compared to Tregs obtained from WT mice. These results suggest that STAT6 determines the differentiation and suppressive capacity of Tregs during CAC. STAT6 deficiency in early stages of CAC promotes Treg differentiation *in vitro* and favors its suppressive phenotype, making Tregs capable of better controlling inflammation in CAC development.

Key words: colitis-associated colon cancer, STAT6, regulatory T lymphocyte, inflammation, FoxP3, differentiation, suppression, surface marker.

1. Introducción

1.1. Cáncer de colon

1.1.1. Epidemiología

El cáncer colorrectal (CRC, por sus siglas en inglés), que agrupa las neoplasias de colon, recto y ano, es el cuarto tipo de cáncer más común en el mundo, después del cáncer de seno, próstata y pulmón, para ambos sexos (1).

Las estadísticas demuestran que más del 60% de los nuevos casos ocurren en personas mayores de 60 años, mientras que solo el 10% de la incidencia sucede en personas menores de 50 años (2). La incidencia y prevalencia de CRC en diferentes países del mundo indican que factores socioeconómicos y geográficos afectan el desarrollo de esta enfermedad. Así, se ha reportado una mayor incidencia en países con un alto nivel de índice de desarrollo humano (HDI, por sus siglas en inglés), lo cual está ligado a cierto estilo de vida que ha sido reportado como factor de riesgo para el desarrollo de esta enfermedad, como el consumo elevado de carne procesada, azúcar, granos procesados y bebidas alcohólicas, alto nivel de grasa corporal, y poca actividad física (3).

Se ha reportado que los hombres tienen una mayor incidencia de CRC que las mujeres, con 1,065,960 hombres y 865,630 mujeres que desarrollaron la enfermedad en 2019; así como una mayor mortalidad, pues en este mismo año 515,637 hombres y 419,536 mujeres murieron por causa del CRC. Esto quiere decir que tanto la incidencia como la mortalidad son alrededor de 25% menores en mujeres que en hombres (4). Por ende, es posible que factores socioculturales y de género, sean los responsables (5). Sin embargo, también existen factores biológicos que inciden en el riesgo de desarrollar CRC.

1.1.2. Factores de riesgo

En primer lugar, un historial positivo de CRC familiar es un factor en común para un 10-20% de los pacientes totales de CRC; este riesgo varía dependiendo del número de familiares afectados y la edad de diagnóstico de la enfermedad (6). En conjunto, estos padecimientos comprenden entre un 6-10% de los casos totales de CRC (7). Sin embargo, el porcentaje de casos de CRC con un origen hereditario puede ser mayor; algunos autores sugieren que entre un 10-30% del total de casos de CRC (8), (9), (10). Este tipo está asociado a errores hereditarios en fragmentos del ADN que controlan procesos importantes para el funcionamiento de las células, como el mecanismo *mismatch* de reparación del ADN, o que son mutaciones en oncogenes o supresores tumorales como APC (11), (12), (7).

Sin embargo, la mayoría de los casos de CRC son esporádicos, es decir, no pueden relacionarse a una enfermedad hereditaria, y están asociados a la adquisición de una serie de mutaciones en las células del colon que favorecen la proliferación excesiva, disminución de la apoptosis, adquisición de un fenotipo invasivo, entre otras características distintivas del cáncer (13).

Se ha reportado que el padecimiento de enfermedades inflamatorias intestinales, como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn, aumentan el riesgo de desarrollar CRC; el cual se reporta como responsable del 15% de las muertes de pacientes con IBD (14). La colitis ulcerativa es una enfermedad crónica caracterizada por la inflamación esporádica, pero recurrente, de la mucosa del colon, que comienza en el recto y se extiende a los segmentos proximales del colon (15). Recientemente, la prevalencia de la colitis ulcerativa ha aumentado, con las tasas más altas en países del hemisferio norte, lo cual coincide con las áreas de mayor incidencia del CRC (16). Por otro lado, la enfermedad de Crohn se caracteriza por la inflamación crónica de toda la mucosa del sistema digestivo, y suele aparecer después de estímulos desencadenantes ambientales en pacientes genéticamente susceptibles; este padecimiento se caracteriza como una enfermedad autoinmune (17). Un efecto de las IBD es la disrupción de la barrera intestinal y el cambio en la

microbiota, lo cual puede aumentar la proporción de bacterias mucolíticas en el intestino. Además, las mutaciones en las células de Paneth, encargadas de secretar sustancias antimicrobianas y de albergar en su periferia a células madre del epitelio del colon, se han relacionado con el padecimiento de IBD y de cáncer colorrectal asociado a colitis (CAC, por sus siglas en inglés), un subtipo de CRC que se desarrolla después de un padecimiento crónico de inflamación en el colon (18).

1.2. Cáncer de colon asociado a colitis

Se estima que el riesgo de padecer cáncer colorrectal aumenta de 5 a 8 veces si se ha padecido alguna enfermedad inflamatoria con anterioridad (19). Los pacientes con IBD tienen un riesgo de desarrollar tumores en el colon de un 2% después de 10 años desde el inicio del padecimiento, de un 10% después de 20 años y de un 18% después de 30 años (20). El CAC representa un 2-3% de los casos totales reportados para CRC (21), y debido al aumento de la incidencia de IBD especialmente en países que están adoptando costumbres de vida cada vez más occidentalizadas, el estudio de cómo la inflamación facilita el desarrollo de esta neoplasia se hace importante.

En el caso del CAC, la neoplasia surge a partir de un epitelio inflamado no canceroso. A grandes rasgos, la inflamación induce respuestas genotóxicas (por ejemplo, como resultado de la secreción de especies reactivas de oxígeno, ROS) en las células epiteliales, lo cual desencadena mutaciones en genes como p53, c-src, k-ras, β -catenina y APC, lo cual inicia con la transformación maligna. Adicionalmente, se pueden desregular vías de señalización como Wnt/ β -catenina y la vía de STAT3, lo cual deriva en un aumento de la proliferación y la remodelación de las células epiteliales, que promueven el desarrollo del tumor (22), (23).

1.2.1. Carcinogénesis en el cáncer de colon asociado a colitis

La carcinogénesis en el CAC comprende los procesos de progresión desde una displasia

(crecimiento anormal de células) en menor nivel a una displasia en alto nivel. Este proceso en el CAC es similar al del CRC, particularmente en cuanto a los genes y vías de señalización alteradas; sin embargo, sí hay una diferencia en la temporalidad de las mutaciones. Por ejemplo, la mutación de p53 ocurre en etapas tempranas durante el CAC, pero en etapas tardías en el CRC (24). Contrario a lo que ocurre en el CRC esporádico, en CAC la mutación en APC sucede en etapas tardías de la carcinogénesis, y marca un punto de transición entre displasia de alto grado y carcinoma (19). Estudios en ratones deficientes en IL-10 -una citocina antiinflamatoria- mantenidos en estancias libres de patógenos, y que esporádicamente desarrollan colitis y posteriormente CAC, han demostrado que en etapas tardías del desarrollo tumoral ocurre una acumulación de β -catenina en el núcleo de las células epiteliales del colon, aún sin la mutación de APC (25). Se ha reportado también que la activación de vías de señalización importantes para mediar la inflamación, tales como NF- κ B, PI-3K y Akt, pueden ser responsables de la acumulación de β -catenina en los núcleos de las células sin que sea necesaria la mutación de APC (26), y que la activación de estas vías de señalización está mediada por moléculas de señalización proinflamatorias como TNF- α y PGE₂. De esta manera se entiende que la inflamación pueda desencadenar la tumorigénesis. Sin embargo, es bien sabido que un sello distintivo del cáncer son las mutaciones en diversos genes que le confieren a las células cancerosas propiedades necesarias para desarrollar un tumor. En el caso del CAC, es de destacar que la inflamación es responsable de las mutaciones en el ADN que son necesarias para desarrollar cáncer.

Una de las vías de señalización activadas en la IBD es la de NF- κ B, la cual se ha reportado como hiperactivada tanto en IBD como en CAC. Estudios en modelos murinos han detectado que la activación constante de NF- κ B en células epiteliales conducen a una aceleración en la pérdida de función de genes supresores tumorales y a la tumorigénesis en el colon (27); por el contrario, la eliminación de la señalización mediada por NF- κ B lleva a un aumento en la apoptosis en células epiteliales, y a una reducción en el tamaño de los tumores cuando hay una eliminación de la señalización en células mieloides (28). Una de las citocinas inducida por la señalización de NF- κ B es IL-6, la cual es producida por las células del sistema inmune infiltradas en la lámina propia como consecuencia de la presencia de bacterias mucolíticas en esta parte del colon. IL-6 es una citocina proinflamatoria que además activa a STAT3 en células epiteliales, lo cual se ha asociado a un aumento de la resistencia a la muerte celular (29).

En la IBD, las moléculas proinflamatorias reclutan a células del sistema inmune adaptativo, como linfocitos T CD4⁺ naïve (30), y células del sistema inmune innato, como macrófagos y neutrófilos, los cuales producen especies reactivas de oxígeno (ROS). Los ROS, así como los intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI, por sus siglas en inglés), son capaces de causar graves daños en el ADN (31). El daño en el ADN producido por ROS y demás agentes genotóxicos se ha relacionado con la inactivación de genes involucrados en la reparación del daño al ADN (por ejemplo, el mecanismo de reparación *mismatch*), y con la aparición de la inestabilidad genómica (26). Las ROS pueden causar daños en el epitelio, seguidos por infiltración de bacterias en el epitelio colónico a través de las lesiones, lo cual produce una inflamación generalizada (Figura 1). Las ROS también pueden causar daños en genes como TP53, y cambios en la señalización mediada por STAT3 y NF-κB, lo cual genera displasia de bajo grado. Posteriormente, la inflamación generalizada y la inestabilidad en el genoma generan la acumulación de mutaciones en genes como K-ras y APC, las cuales completan el proceso de transformación maligna (19).

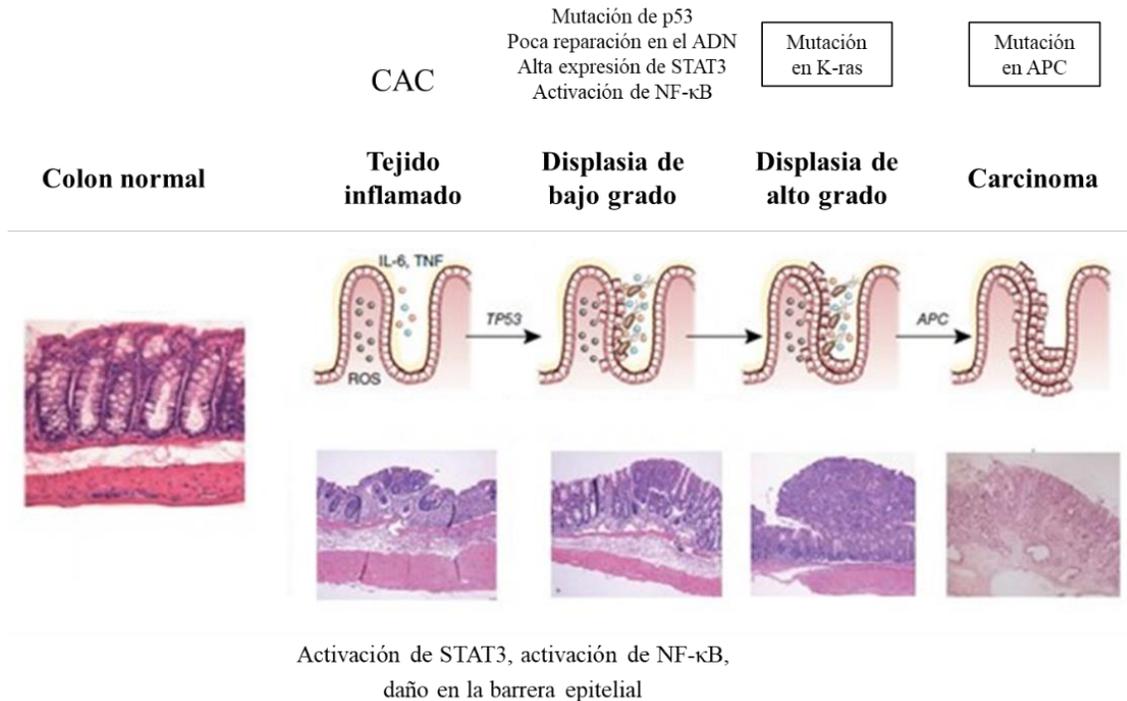


Figura 1. Transformación maligna desencadenada por inflamación en el colon.

Figura modificada de (19).

1.2.2. Respuesta inmune en el cáncer de colon asociado a colitis

El epitelio colónico, en una porción conocida como lamina propria, está habitado por gran variedad de células del sistema inmune, entre las que se cuentan células del sistema inmune innato, como macrófagos, eosinófilos, células dendríticas (DCs, por sus siglas en inglés), y células del sistema inmune adaptativo, como linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Las bacterias que hacen parte de la microbiota, por otro lado, se localizan principalmente en la capa mucosa del epitelio, desde son capaces de interactuar con las células del sistema inmune, y la desregulación de una u otra población altera la homeostasis del intestino y por lo tanto el estatus inflamatorio. Cuando ocurre un daño en la barrera epitelial del colon como consecuencia del padecimiento de enfermedades inflamatorias, algunos microorganismos de la microbiota son capaces de penetrar en la lámina propria e interactuar con células del sistema inmune innato mediante receptores similares a Toll (Toll-like receptors, TLR, por sus siglas en inglés) (19). Esta interacción promueve una respuesta proinflamatoria en el colon, lo cual favorece la carcinogénesis mediante procesos ya mencionados (activación de NF-κB, liberación de ROS). Además de esto, las células del sistema inmune innato producen citocinas proinflamatorias como TNF-α, IL-1β e IL-12, y se reclutan células del sistema inmune adaptativo (linfocitos T CD4⁺ naive) a los sitios de inflamación (30). En el caso de las enfermedades inflamatorias intestinales, el tipo de linfocito T CD4⁺ que se diferencia con mayor prevalencia depende del tipo de trastorno. Por ejemplo, en la enfermedad de Crohn hay un favorecimiento de la diferenciación hacia el tipo Th1, y un aumento en los niveles de TNF-α, IFN-γ, IL-12, así como las citocinas asociados a Th17 como IL-17A, IL-21 e IL-23. Por el contrario, en la colitis ulcerativa hay un aumento de los niveles de IL-5 e IL-13, asociados al tipo Th2 (32). En conjunto, estos fenómenos contribuyen a la inflamación crónica vista en las enfermedades inflamatorias intestinales. Por otro lado, si bien se sabe que el CAC está relacionado con la inflamación, no se ha aclarado el mecanismo específico de inflamación involucrado en la patogenia del CAC, por lo que se hace importante su estudio (33).

1.2.3. Modelo murino de CAC

Para el estudio de los procesos biológicos subyacentes en el desarrollo del CAC, entre ellos la respuesta inmune a lo largo de este, investigadores desarrollaron un modelo murino de inducción de CAC mediante la inyección intraperitoneal de azoximetano (AOM), un químico cancerígeno que es absorbido por el epitelio colónico, seguido por exposición a dextrán sulfato de sodio (DSS) en el agua de consumo, el cual causa inflamación en el colon al alterar su epitelio y permitir el infiltrado de bacterias (34). En este modelo, la lesión y la ulceración generada por el DSS inducen respuestas de regeneración de heridas, que incluyen la migración de células madre, una mayor proliferación de células del epitelio y la expansión de las criptas para regenerar la mucosa dañada (35). Si en las células que están siendo sometidas a ciclos de daño y regeneración surgen mutaciones (por ejemplo, en el gen p53), la resistencia a la muerte celular conferida por la activación de STAT3 da pie a la proliferación de células que acumulan cada vez más mutaciones en protooncogenes o genes supresores tumorales, iniciando de esta manera el desarrollo del tumor. El modelo murino de CAC es útil para estudiar la relación entre inflamación y tumorigénesis; por ejemplo, este modelo recientemente se utilizó para analizar el efecto de la evodiamina, un extracto vegetal, sobre la inflamación y el desarrollo de tumores en el colon, mediante el mantenimiento de la barrera intestinal y la regulación de la composición de la microbiota (36).

1.3. Las células T reguladoras y su rol en el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis

1.3.1. Generalidades

Cuando las células T reciben señales en el TCR (receptor de células T, por sus siglas en inglés) se activan y se diferencian a células T efectoras. En un ambiente inflamatorio, y en presencia de células presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés), las células T reciben señales en el TCR al encontrarse con el complejo MHC-péptido de las APC; además, las células T reciben señales en CD28 a través de sus ligandos CD80/CD86 presentes en las APC, lo cual promueve su

activación y proliferación. Las células T activadas producen IL-2 y CD25, generándose así un *loop* positivo que induce la activación (37). Sin embargo, una parte de células T CD4⁺ no produce respuesta inmunológica; por el contrario, suprimen la actividad de otras células T, y se conocen como linfocitos T reguladores (Tregs).

Las Tregs se caracterizan por la expresión constitutiva del factor de transcripción FoxP3, la cual es esencial para mantener el fenotipo inmunoregulador de las Tregs, además de controlar su diferenciación y función. Las Tregs expresan constitutivamente algunas moléculas asociadas a la activación de las células T: CD25, CTLA-4, GITR y LAG-3 (38). Es por esto que muchos autores identifican a las Tregs como linfocitos T CD4⁺FoxP3⁺ (39) (40); sin embargo, otros autores describen que la mayoría de las Tregs tienen un fenotipo activado y de memoria (CD25^{high}CD45RB^{low}), y las identifican entonces como linfocitos T CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ (41) (42) (43). Estas caracterizaciones no son contrarias, pues la primera describe al linaje de Tregs, y la segunda, a un fenotipo activado de las Tregs. Las Tregs activadas expresan correceptores inhibidores, denominados puntos de control inmunológico. Cuando se unen a ligandos que se encuentran en células presentadoras de antígenos y otras células en el entorno inmunológico, disminuyen la respuesta inflamatoria (44).

Las Tregs se pueden diferenciar en el timo o en la periferia; de esta forma, las Tregs provenientes del timo se conocen como Tregs naturales o tímicas (tTregs), mientras que las que se diferencian en la periferia pueden ser conocidas como pTregs (45). Las tTregs se generan en el timo en el proceso de maduración de los linfocitos T, a partir de linfocitos CD4⁺ que además expresan naturalmente CD25⁺; las tTregs se generan como consecuencia de la exposición a antígenos propios en el timo. Por el contrario, las pTregs se diferencian en la periferia a partir de linfocitos de fenotipo CD4⁺ que aún no han sido activados, también conocidos como linfocitos T CD4⁺ naïve, los cuales se caracterizan además por su fenotipo CD44^{low}CD62L⁺; su diferenciación es desencadenada por antígenos foráneos presentados por DCs (46). Para que haya diferenciación de pTregs es necesaria una estimulación sub-óptima del TCR y una señal inhibitoria producida por la co-estimulación con CTLA-4; se ha observado que los ratones deficientes en CTLA-4 no generan este tipo de linfocito regulador (47). Por otro lado, se ha demostrado que en condiciones *in vitro* es necesaria la señalización iniciada por IL-2 y TGF-β, además de señalización inducida sobre el TCR, para inducir

la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ naïve a Tregs; estas Tregs se conocen como Tregs inducidas, o iTregs (48). Estas citocinas además son importantes para mantener la expresión de FoxP3 a lo largo del tiempo, tanto en Tregs naturales como en iTregs (49). Sin embargo, sin importar el origen de la células T reguladora, la capacidad supresora de este tipo de linfocito depende la alta expresión de FoxP3, la cual puede ser regulada de manera transcripcional o epigenética (37). Aunque los mecanismos de supresión mediados por Tregs todavía se debaten, FoxP3 aumenta la expresión de CD25 y otros marcadores de Tregs, y confiere actividades supresoras a las células T CD4⁺ (37).

Las Tregs son capaces de suprimir la respuesta inmune mediante diversos mecanismos (**Figura 2**). En primer lugar, mediante la secreción de citocinas inhibitorias como IL-10, IL-35 y TGF- β . IL-10 se ha asociado a la capacidad de las Tregs de modular la respuesta inmune en membranas que están en contacto con el exterior, como las vías aéreas y el intestino, por lo cual su producción en enfermedades inflamatorias como colitis ha sido particularmente estudiada (50) (51); por otro lado, el TGF- β secretado por las Tregs es esencial para modular la respuesta de las células T CD4⁺ efectoras del tipo Th2; más allá, TGF- β es necesario para la diferenciación de las Tregs y de las Th17 (52). También se ha demostrado que las Tregs median la citólisis a través la producción de granzima A, granzima B y perforina *in vitro* e *in vivo* (53). Adicionalmente, las Tregs suprimen la respuesta inmune mediante las siguientes vías de disrupción metabólica: el acaparamiento de IL-2 a través de su alta expresión de CD25, reduciendo la cantidad de esta citocina importante para el crecimiento y activación de los linfocitos (54); la señalización a través de las ectoenzimas CD39 y CD73 con la producción de adenosina inmunosupresora (55); y la transferencia intracelular de adenosín monofosfato (AMP) cíclico a una célula diana a través de las uniones comunicantes de la membrana (56). Por último, está la interacción de Tregs con células presentadoras de antígenos: si esta interacción es mediada por el Antígeno 4 del Linfocito T citotóxico (CTLA-4), se induce la Indoleamina 2,3 -dioxigenasa (IDO), una potente molécula reguladora; si la interacción es mediante el Gen-3 de Activación de los Linfocitos (LAG-3) y las moléculas MHC-II se inhibe la maduración de DCs (57).

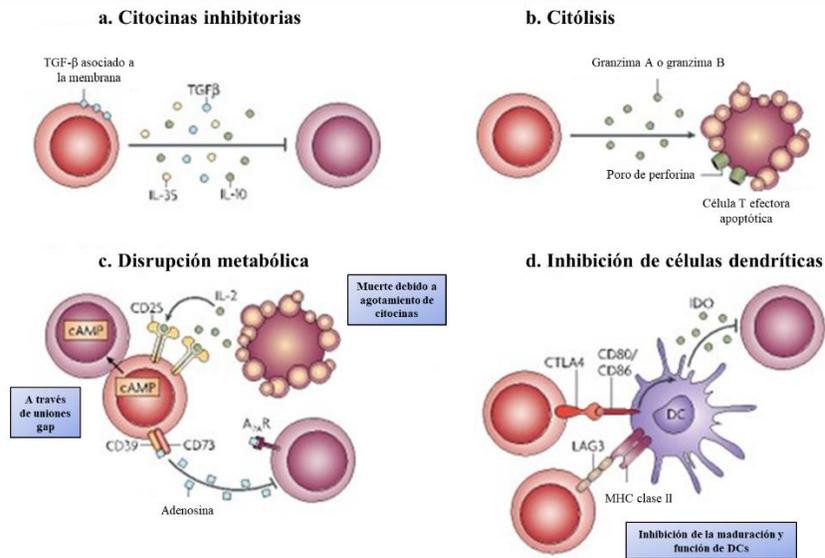


Figura 2. Mecanismos inhibitorios empleados por los linfocitos T reguladores.

(a). Producción de citocinas anti-inflamatorias, como TGF- β e IL-10. (b). Inducción de la citólisis mediada por la producción de granzima A, granzima B y perforina. (c). Disrupción metabólica mediada por moléculas como cAMP, el mecanismo CD36/CD73/adenosina, y la depleción de IL-2 a través de CD25. (d). Modulación de la maduración/función de las células NK mediante moléculas de superficie como CTLA-4 y LAG3. Las células NK (“asesinas naturales”) son importantes para inducir la activación de linfocitos T efectoras. Figura tomada de (57).

1.3.2. Fenotipo supresor de las Tregs

Una expresión constante de FoxP3 hace que las Tregs se conviertan en Tregs efectoras (eTregs), mediante un proceso conocido como maduración de las Tregs (58). Las Tregs se caracterizan por expresar diversas moléculas en su superficie, las cuales juegan un papel importante en controlar la respuesta inmune montada por células efectoras (linfocitos T CD8⁺, CD4⁺ y células NK) o DCs. La expresión de estas moléculas importantes para la inmunosupresión permite la tolerancia inmunológica ante situaciones fisiológicas, pero usualmente son desreguladas en los procesos de transformación maligna. Algunas de estas moléculas son:

- CTLA-4 (antígeno 4 de linfocito T citotóxico, por sus siglas en inglés) es una molécula análoga a CD28, una proteína co-estimuladora de los linfocitos T; ambas moléculas se unen a CD80 y CD86, expresadas en los linfocitos T convencionales (59).

CTLA-4 es una molécula expresada constitutivamente en las Tregs (60). Como molécula altamente endocítica, CTLA-4 puede capturar ligandos coestimuladores de otras células mediante un proceso de conocido como transendocitosis. Al restringir la expresión del ligando coestimulador de esta manera, CTLA-4 controla la activación de las células T dependiente de CD28 (61). Además, la señalización mediada por CTLA-4 perjudica la diferenciación de linfocitos CD4⁺ naive, lo que resulta en una regulación de la respuesta inmune y tolerancia (62).

- PD-1 (Proteína de muerte celular programada 1, por sus siglas en inglés) se expresa principalmente en linfocitos T y B activados, así como en macrófagos activados y junto a su ligando PD-L1 constituyen un eje de control de la respuesta inmune (63). Cuando PD-1 se une a PD-L1 se atenúa la señalización mediada por el TCR y se deteriora la actividad de las cascadas de señalización PI3K/Akt y Ras/MEK/Erk, requeridas para iniciar la activación de las células T (61). Se ha reconocido que la vía PD-1/PD-L1 modula y mantiene la tolerancia de los linfocitos CD4⁺ periféricos, incluidas las Tregs y los linfocitos T CD8⁺ en varios niveles. Puede regular a la baja las células T autorreactivas durante la presentación del autoantígeno por parte de las DC (65). Además, PD-1 puede promover directamente la secreción de IL-10 por parte de las células T e inhibir la maduración de las DCs (65). En las Tregs, PD-L1 actúa en conjunto con TGF- β para promover la diferenciación de células pTreg a través de PD-1 (66). Además, PD-1 está involucrado en el mantenimiento del fenotipo supresor de las Tregs evitando su conversión en células T de memoria efectoras proinflamatorias (67).

- Tim-3 (Inmunoglobulina de linfocitos T y proteína de dominio de mucina 3): se ha asociado a la regulación de las respuestas inmunes y la inmunidad contra el cáncer. Tim-3 es expresada por linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ productores de IFN- γ , pero también se encuentra en Tregs, células mieloides, células NK y mastocitos. El principal ligando de Tim-3 es galectina 9; cuando ocurre la unión de estos receptores se genera la inhibición de células T y la muerte celular (68). En el microambiente tumoral, las Tregs Tim3⁺ son potentes supresores de las respuestas inmunitarias en el tejido tumoral y pueden promover el desarrollo de un fenotipo disfuncional en las células T

CD8⁺ intratumorales (69). Además, las Tregs Tim3⁺ muestran una mayor capacidad para reprimir la proliferación de células T naïve (70).

1.3.3. Las Tregs en IBD y CAC

Una de las principales funciones del sistema inmunitario intestinal es mantener la homeostasis inmunitaria entre el microbioma intestinal no patógeno, los antígenos alimentarios exógenos inofensivos, los microbios patógenos y los autoantígenos asociados al daño. En condiciones fisiológicas, las Tregs regulan las respuestas inmunitarias a antígenos propios, microbios y antígenos alimentarios. Esta supresión requiere una señal dependiente del TCR, pero también puede realizarse mediante la secreción de citocinas inmunosupresoras. La principal citocina inmunosupresora secretada por las Tregs intestinales es IL-10. IL-10 funciona para inhibir la polarización de células T-helper 1 (Th1), Th17 y Th1/Th17 (66). Los principales receptores coestimuladores expresados en las Tregs intestinales durante la homeostasis son el PD-1 y CTLA-4. La transferencia de células adoptivas, tanto de células T CD4⁺ naïve e iTregs, suprime la colitis (71) (72). En conclusión, la pérdida de la función supresora causada por Tregs produce inflamación intestinal en ratones y contribuye a la IBD en humanos.

Debido a la capacidad de inmunosupresión de las Tregs, estas se han estudiado con frecuencia en el contexto del cáncer. Las Tregs se han asociado con pronósticos desfavorables en carcinomas de ovario, mama, hepatocelular y gástrico (73). Se ha descrito que un aumento en el nivel de Tregs puede aumentar en etapas tardías del CRC (73). Estas Tregs infiltradas en tumores tienen expresión elevada de Tim-3 y PD-1, lo que se relaciona a un fenotipo más supresor, pues cuando se hace un bloqueo de la señalización mediada por estas moléculas, se disminuye el agotamiento de linfocitos T CD8⁺, restaurando su capacidad efectora antitumoral (74). Estas Tregs son capaces también de suprimir la proliferación de los linfocitos T CD4⁺ (75). En consecuencia con esta observación, se ha reportado que las Tregs provenientes de ratones con CRC en etapas avanzadas presentan un fenotipo altamente supresor con niveles elevados de algunas moléculas de superficie como PD-1, Tim-3, y una alta expresión de CD127, una molécula comúnmente expresada en niveles bajos en las Tregs, la cual se relaciona también a altas expresiones de CD103 e ICOS (76) (77).

Contar con un modelo murino para el estudio de las Tregs en diferentes condiciones experimentales es fundamental. Para facilitar la identificación y el seguimiento de las Tregs FoxP3⁺ *in vivo*, en 2007 se desarrollaron ratones con un locus Foxp3 bicistrónico (Foxp3^{EGFP}) que coexpresa la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP, por sus siglas en inglés) bajo el control de los elementos promotores/potenciadores de FoxP3 endógenos (78). De esta manera se puede analizar esta población mediante citometría de flujo, además de seleccionarla mediante *cell sorting* para posteriores análisis *in vitro*.

En conjunto, se observa que la acción de las Tregs durante la IBD y el CAC es compleja, pues intervienen diversas células y moléculas importantes para la respuesta inmune. Debido a que la comunicación entre células está mediada principalmente por citocinas, estudiar estas moléculas en el contexto del CAC es necesario.

1.4. Evidencias de la participación de STAT6 en el cáncer de colon asociado a colitis

La vía de señalización JAK/STAT es importante en la transducción de señales en las células mediada por diferentes moléculas (79). Los receptores de ciertas citocinas, factores estimulantes de colonias y hormonas tienen una cinasa JAK asociada a su dominio intracelular (**Figura 3**). La señalización por citocinas activa a JAK, la cual fosforila al receptor en sitios específicos que sirven como sitio de anclaje a una familia de factores de transcripción conocido como STAT (80). Las STAT son fosforiladas por las quinasas JAK forman dímeros o heterodímeros y entran al núcleo, donde inducen la transcripción de múltiples genes (**Figura 3**). Se ha observado que la activación aberrante de la vía de señalización está presente en enfermedades inflamatorias, trastornos hematológicos y tumores sólidos (81). Principalmente, existe evidencia extensa del rol de la activación de STAT3 en la promoción de la tumorigénesis. Sin embargo, también se han reportado una desregulación de otras proteínas STAT, como STAT1 y STAT6 en cáncer, con roles que van desde la inhibición de la tumorigénesis hasta una promoción de esta mediante la regulación de la inflamación.

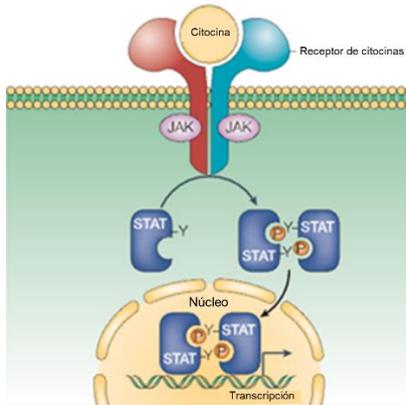


Figura 3. Vía de señalización JAK-STAT.

Tomado de (82).

1.4.1. La ausencia de STAT6 protege del desarrollo de tumores en el colon y es un blanco terapéutico atractivo

El factor de transcripción STAT6 es una molécula que ha recibido atención en los últimos años en el contexto de desarrollo tumoral. La activación de STAT6 en células epiteliales como respuesta a señalización por IL-4 e IL-13 es importante en la regulación de procesos celulares como la diferenciación celular, el crecimiento, y la inducción de resistencia a la apoptosis. En el caso de las células del sistema inmune, la activación de STAT6 es importante para la polarización de células Th2 (83). Se ha reportado que STAT6 está sobreexpresado y activo en células cancerosas de pacientes con cáncer de próstata, colon, linfoma y leucemia. La activación de STAT6 en muestras tumorales de colon se relacionó positivamente con menor supervivencia, metástasis a nódulos linfáticos y a otros sitios del cuerpo, y en general, a un menor pronóstico de vida (84).

STAT6 se asocia a la tumorigénesis de diferentes maneras (Figura 4). Se ha observado que en modelos murinos de IBD la activación de la señalización de IL4/IL13/STAT6 aumenta la actividad de claudina-2 y la transcripción de MLCK2 en células epiteliales, y disminuye la producción de serotonina por parte de las células enterocromafines, las cuales son importantes para el mantenimiento de la barrera epitelial, permitiendo así la infiltración de la microbiota a la lámina

propria (85) (86). Adicionalmente, STAT6 regula la producción de arginasa-1, un sello distintivo de los macrófagos M2 (87). En el microambiente tumoral, los macrófagos asociados a los tumores (TAMs por sus siglas en inglés) generalmente son del fenotipo M2; se ha observado que estos pueden promover el desarrollo del CRC (88).

En el caso del desarrollo tumoral, se ha observado que en líneas celulares de CRC la señalización mediada por STAT6 aumenta la expresión de NOX1, que se correlaciona con la producción de ROS, el daño al ADN y la proliferación (89) (Figura 4). También se aumenta la expresión de genes anti-apoptóticos y pro-metastásicos (survivina, MDM2, TMPRSS4 y ZEB1), mientras que células con baja expresión de STAT6 expresaba más a genes proapoptóticos y anti-metastásicos (BAX, CAV1 y p53) (90) (91) (92). En un modelo murino de CRC, la expresión de STAT6 se correlaciona con altos niveles de MDSC (células supresoras derivadas de mieloides, por sus siglas en inglés) en el bazo y la lámina propia, y una respuesta citotóxica mediada por CD8⁺ disminuida hacia las células tumorales (93). Por último, la activación de STAT6 en líneas celulares de cáncer de colon promueve la expresión de perfiles de citocinas que favorecen la polarización de células Th2, tales como IL-4, IL-13, GATA-3, CDK4, CD44v6 y S100A4. La expresión de citocinas de tipo Th2 se ha relacionado a una prognosis negativa, crecimiento tumoral y metástasis en varios tipos de cáncer (94). Para investigar el papel de STAT6 en procesos como la polarización de células Th2 se pueden seguir diferentes estrategias experimentales, como silenciamiento *in vitro* del gen, o el uso de modelos murinos con alteraciones específicas en el gen de STAT6. Uno de estos modelos murinos consiste en la eliminación de los aminoácidos 505 a 584 que codifican el dominio SH2 de STAT6 (95).

En conjunto, STAT6 es importante para el desarrollo de células cancerosas en el colon y para la modulación de diferentes respuestas inmunes al tumor. Debido a la importancia de la respuesta inmune en el desarrollo del CAC, el estudio del papel de STAT6 en el contexto de esta enfermedad es imperioso.

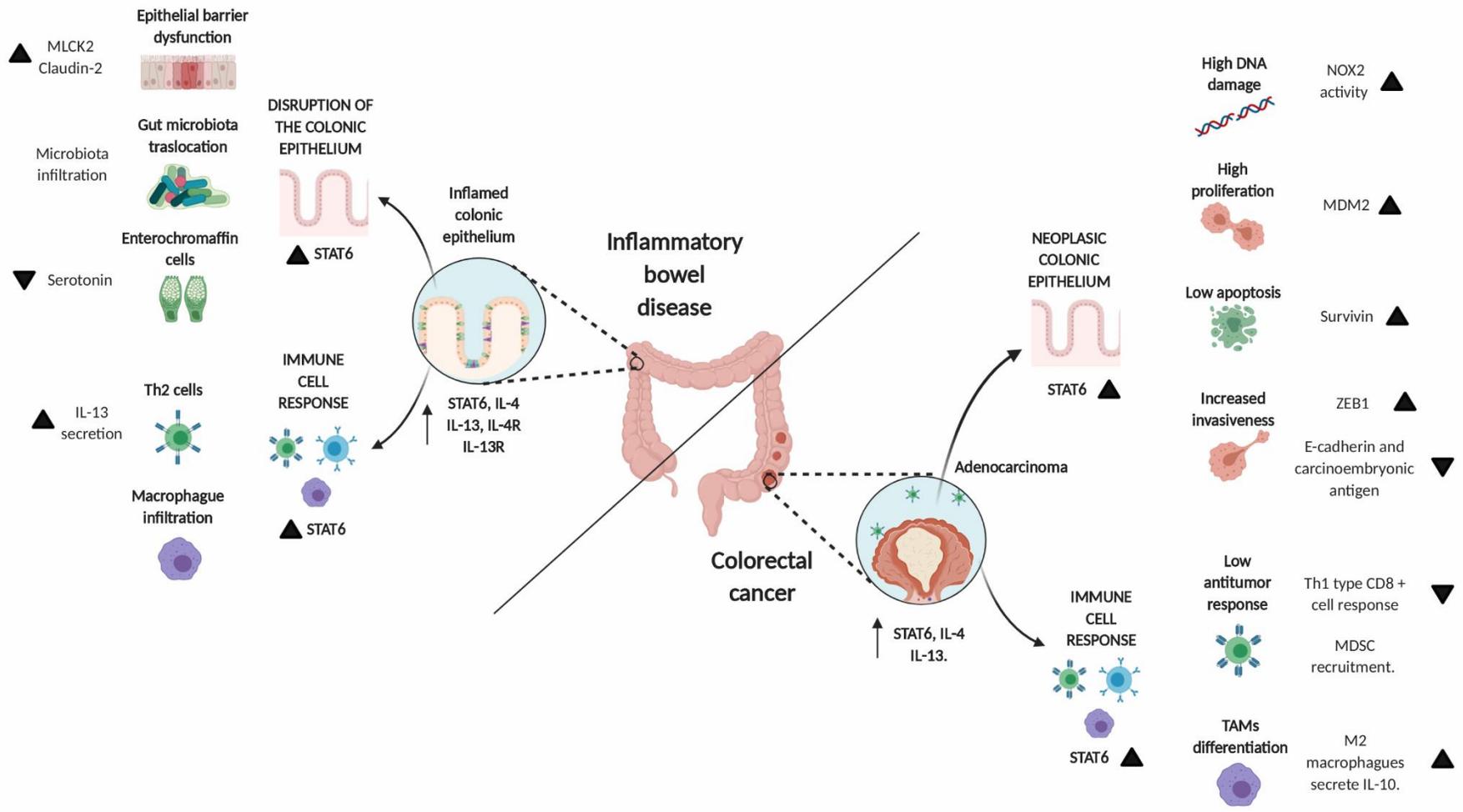


Figura 4. La activación de STAT6 en células inmunes y células no inmunes contribuye a la patología asociada con IBD y CRC.

Tomado de (96)

2. Antecedentes

2.1. Evidencias directas de la participación de STAT6 en el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis inducido por azoximetano/dextrán sulfato de sodio

STAT6 se encuentra activada de manera constitutiva en varios tipos de cáncer (97). Sin embargo, el conocimiento del rol de STAT6 en la modulación de la respuesta inmune y el desarrollo y progresión del cáncer de colon asociado a colitis es poco. Se ha reportado que, en un modelo experimental de inducción de CAC mediante inflamación, ratones deficientes de STAT6 presentan una disminución del 70% en el desarrollo tumoral, a diferencia de los animales silvestres, de los cuales el 100% desarrollan tumores. Adicionalmente, la ausencia de STAT6 se relacionó con un aumento en la apoptosis y una disminución en el infiltrado inflamatorio, en la producción de citocinas pro-inflamatorias y en la proliferación durante las etapas tempranas del CAC (98). También se observó una disminución de monocitos CD11b⁺Ly6C^{hi}CCR2⁺ y granulocitos CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺ dependiente de STAT6. Estos datos sugieren que STAT6 participa en mecanismos inmunoreguladores involucrados en la progresión del CAC. El uso del inhibidor específico de STAT6 AS1517499 fue capaz de reducir la carga tumoral colónica y el número de monocitos y granulocitos inflamatorios circulantes en un modelo de CAC *in vitro* (98). Por otro lado, la administración del inhibidor de STAT6 en etapas tempranas de desarrollo de CAC disminuyó la aparición de tumores de colon en hasta un 50% en ratones WT. Al usar AS1517499 y trimetilglicina como adyuvantes en la terapia con 5-fluorouracilo en el modelo experimental de CAC *in vivo*, se observó una reducción significativa en el número de tumores en el colon y en los marcadores de la transición epitelio mesénquima, indicando que la inhibición de STAT6 mejora la respuesta a la quimioterapia (99). Estos resultados indican que STAT6 puede actuar como un promotor de la tumorigénesis en células del epitelio colónico y promover respuestas pro-inflamatorias, durante las primeras etapas del cáncer de colon asociado a colitis.

Nuestro grupo de trabajo estableció que el decremento en la respuesta inflamatoria a nivel local y sistémico durante las etapas tempranas de la transición colitis-cáncer en animales STAT6^{-/-} se asocia de manera significativa con un aumento en el porcentaje de Tregs en etapas iniciales del CAC, lo cual podría estar asociado con la ausencia de tumores (100). Al evaluar la dinámica de esta población celular durante el CAC experimental, se demostró que en animales *wild type*, al final del tratamiento las Tregs se duplican a nivel sistémico, coincidiendo con una disminución en la actividad de las células T CD4⁺ y T CD8⁺ (75). Sin embargo, durante las etapas tempranas de la carcinogénesis, se observa una disminución significativa en el porcentaje de células CD4⁺Foxp3⁺ (75). Por el contrario, los ratones STAT6^{-/-} presentan un incremento significativo en el número de Tregs y una mayor expresión de FoxP3 durante la inflamación crónica que precede el desarrollo tumoral, lo que se asocia con poco o nulo crecimiento tumoral en el colon. Ensayos de depleción de Tregs en etapas tempranas de CAC experimental demostraron que al impedir la función de las Tregs en animales STAT6^{-/-} es posible revertir el efecto protector antes mencionado, llevando a un aumento en el número y tamaño de los tumores (100). Esto indica que STAT6 modula la actividad de esta población celular, y que las Tregs podrían ser importantes para controlar los procesos inflamatorios sostenidos en etapas tempranas del CAC que pudiesen culminar en el desarrollo de tumores

Se ha demostrado que TGF- β es fundamental en la generación *in vitro* de iTregs a partir de células T CD4⁺ naïve. Sin embargo, a diferencia de las tTregs, las iTregs pierden rápidamente tanto la expresión de FoxP3 como su actividad de supresión (48). Sin embargo, los niveles de Tregs se mantienen mediante la adición del anticuerpo anti-IL-4 o mediante la eliminación del gen STAT6 (101). Este mismo estudio encontró que en células T CD4⁺ naïve hay una región silenciadora en el promotor de FoxP3 que tiene un sitio de unión para STAT6; es la unión de STAT6 a este sitio la que reduce la activación del promotor de FoxP3 mediada por TGF- β . FoxP3 tiene un dominio de unión al ADN (dominio forkhead), y se une a este como homodímero o heterodímero junto a FoxP1 (102). En los últimos años se han descrito más de 300 proteínas que interactúan con FoxP3 y que regula su expresión, aunque gran parte de estas interacciones necesitan estudios para dilucidar su naturaleza. Otras evidencias demuestran que en modelos de alergia los ratones STAT6^{-/-} presentan un número elevado de Tregs en los pulmones y en el bazo en comparación con los animales silvestres, lo cual está asociado a una menor respuesta alérgica (103). Estas evidencias indican que existe una asociación importante entre STAT6 y la diferenciación, función y/o activación de las Tregs.

Por lo tanto, el estudio de estas características de las Tregs en ausencia de STAT6 y durante el CAC, en particular en su etapa temprana, sería importante para caracterizar mejor el rol de estas células en esta enfermedad.

Por lo tanto, este trabajo pretende responder la siguiente pregunta de investigación: ¿De qué manera la ausencia de STAT6 modula la actividad de las Tregs durante etapas tempranas del cáncer de colon asociado a colitis?

3. Hipótesis

La deficiencia de STAT6 incrementa la diferenciación y la capacidad supresora de Tregs obtenidas durante las primeras etapas del CAC.

4. Objetivos

4.1. Objetivo principal

Analizar la diferenciación y la capacidad supresora de las Tregs generadas en ausencia de STAT6 y sus implicaciones en el desarrollo del CAC.

4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar el modelo de estudio de CAC *in vitro* en ratones STAT6^{-/-}/ Foxp3^{EGFP}.
- Evaluar si la deficiencia de STAT6 incrementa la diferenciación de Tregs *in vitro*.
- Determinar si la deficiencia de STAT6 incrementa la frecuencia y el fenotipo supresor de las Tregs durante las etapas iniciales del desarrollo del CAC.
- Analizar *in vitro* la capacidad supresora de las Tregs STAT6^{-/-} obtenidas durante las etapas iniciales del CAC.

5. Estrategia experimental

5.1. Estrategia experimental para la caracterización de una cepa de ratones $STAT6^{-/-}$ / $Foxp3^{EGFP}$ *knock-in* de fondo genético BALB/c



Figura 5. Estrategia experimental para la caracterización de una cepa de ratones $STAT6^{-/-}$ / $Foxp3^{EGFP}$ *knock-in* de fondo genético BALB/c

5.2. Estrategia experimental para la determinación de la capacidad de diferenciación *in vitro* de Tregs a partir de linfocitos T CD4⁺ naïve provenientes de ratones WT y STAT6^{-/-}

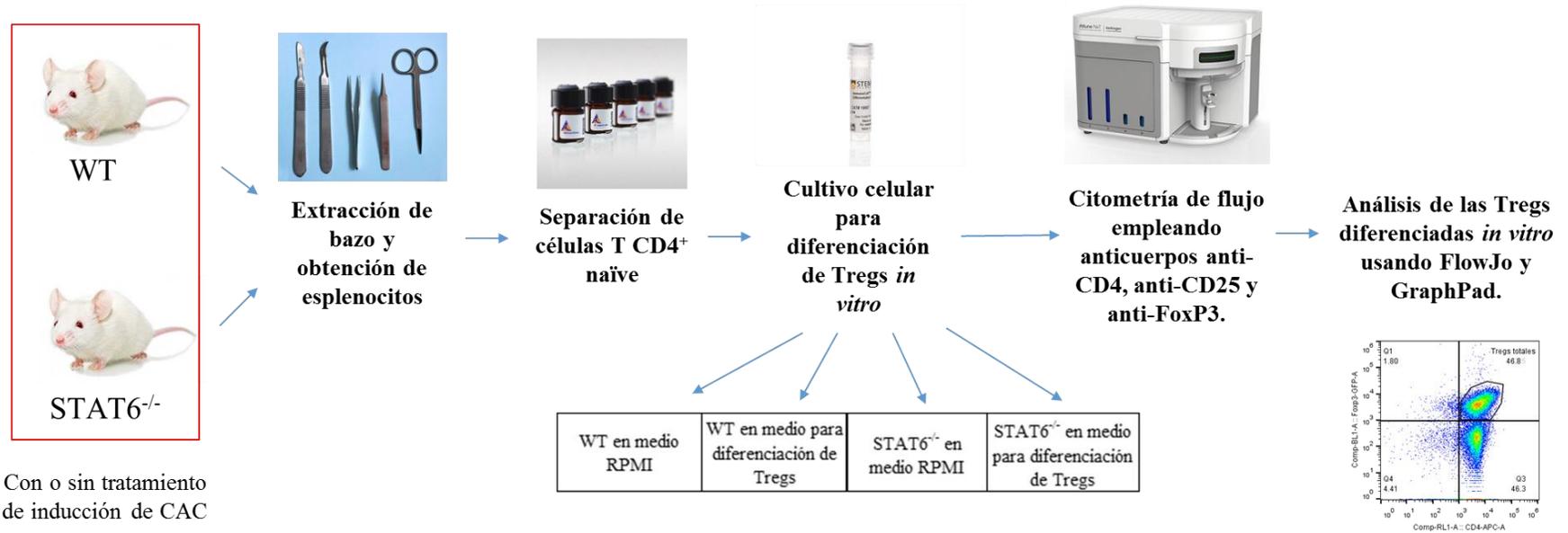


Figura 6. Estrategia experimental para la determinación de la capacidad de diferenciación *in vitro* de células T reguladoras a partir de linfocitos T CD4⁺ naïve provenientes de ratones WT y STAT6^{-/-}

5.3. Estrategia experimental para el estudio de la frecuencia y el fenotipo de Tregs durante el transcurso del CAC en ratones $\text{FoxP3}^{\text{EGFP}}$ y $\text{STAT6}^{-/-}/\text{FoxP3}^{\text{EGFP}}$

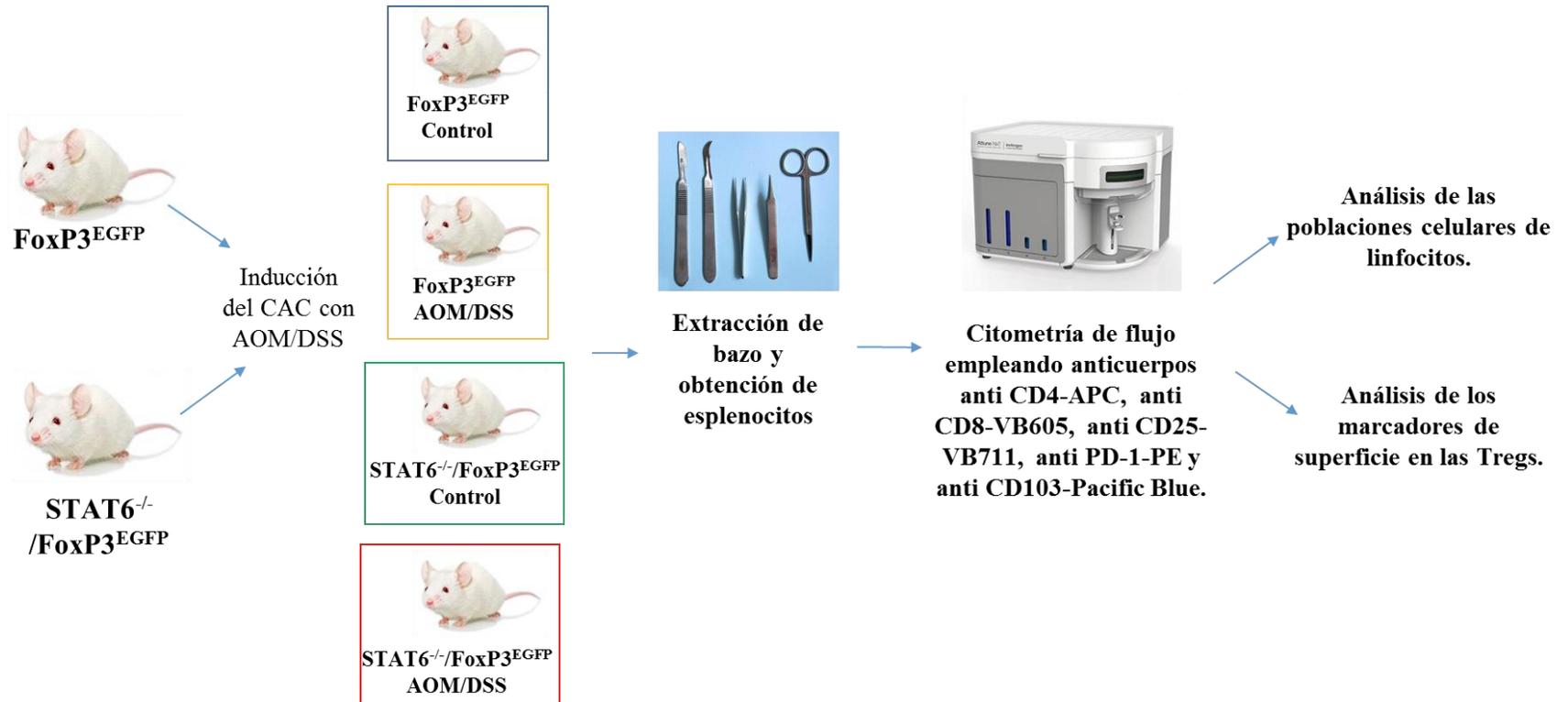


Figura 7. Estrategia experimental para el estudio de la frecuencia y el fenotipo de Tregs durante el transcurso del CAC en ratones $\text{FoxP3}^{\text{EGFP}}$ y $\text{STAT6}^{-/-}/\text{FoxP3}^{\text{EGFP}}$

5.4. Estrategia experimental para la determinación de la capacidad de supresión de Tregs provenientes de ratones WT y deficientes en STAT6

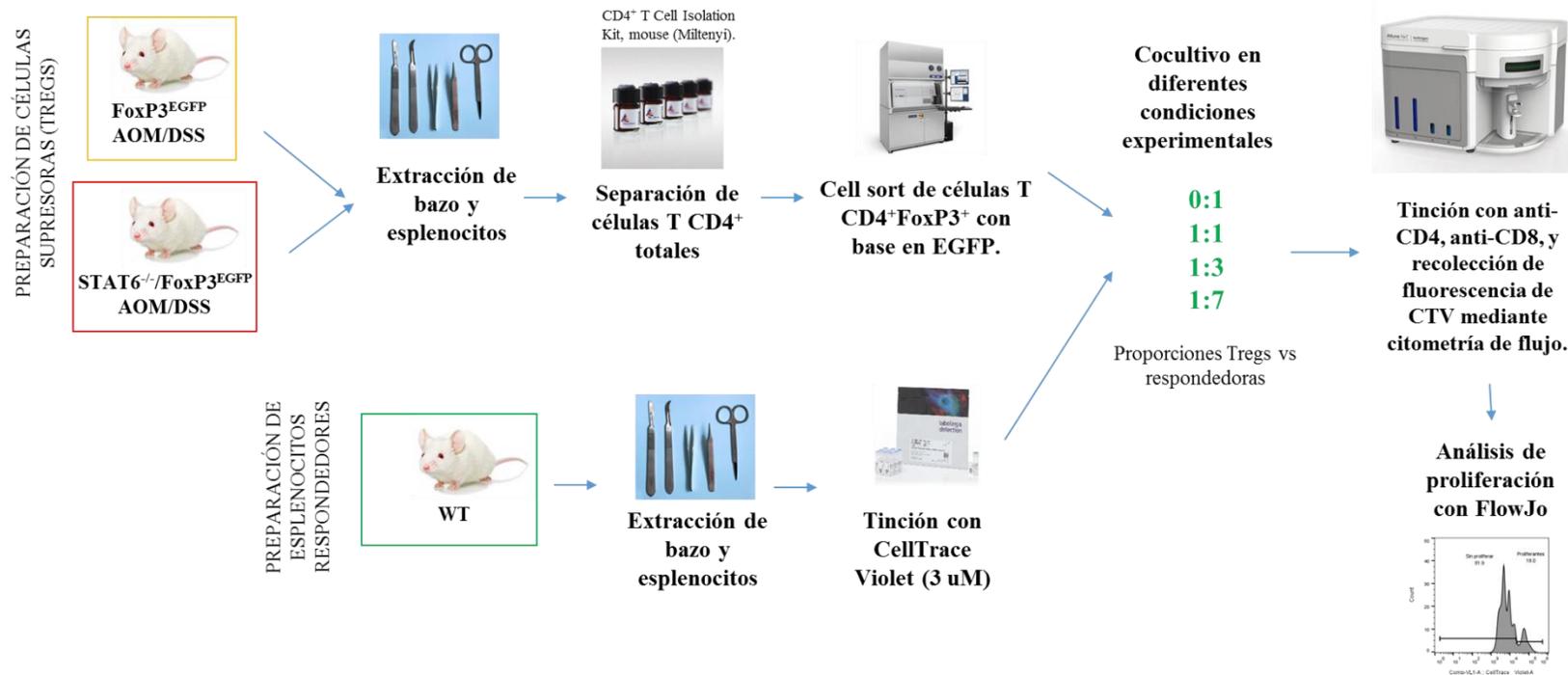


Figura 8. Estrategia experimental para la determinación de la capacidad de supresión de Tregs provenientes de ratones WT y deficientes en STAT6.

6. Metodología

6.1. Ratones

Se utilizaron ratones de las cepa BALB/c (JAX stock #000651), BALB/c STAT6^{-/-} (JAX stock #005977; (95)), y BALB/c FoxP3^{EGFP} (JAX stock #006769; (78)) (The Jackson Laboratories). Además, se utilizaron ratones de la cepa STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}, de fondo genético BALB/c (104), previamente generados por nuestro grupo de investigación. Los ratones fueron mantenidos en el Bioterio de la FES-I en un ambiente libre de patógenos, y alimentados con Purina Diet 5015 y agua *ad libitum*. Para los experimentos de diferenciación de Tregs se utilizaron ratones hembra de 4-5 semanas, con un peso de promedio de 17 g. Para los ensayos de inducción de CAC mediante AOM/DSS se utilizaron ratones hembra de 6-8 semanas, y con un peso promedio de 20 g. Todos los ensayos realizados con ratones fueron aprobados por el Comité de Ética de la FES-I- UNAM, en cumplimiento con la normatividad nacional e internacional.

6.2. Soluciones

Buffer de FACS: PBS + SFB 0,5%; NaN₃ 15,4 mM.

- Filtrar con membranas de 0,22 µm.

Buffer fosfato salino (PBS) 1X: Agua destilada + NaCl 137 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM.

- Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1 L con agua destilada.
- Filtrar con membranas de 0.22 µm.

Buffer de Proteinasa K: Agua destilada + EDTA sal disódica pH 8.0 25 mM; NaCl 100 mM; SDS 0,5%.

Buffer de separación magnética: PBS 1X + EDTA sal disódica 2mM; BSA 0,5%.

- Ajustar el pH a 7,2.
- Filtrar con membranas de 0.22 μm .

Buffer TBE 1X: Agua destilada + Tris base 1 M; H_3BO_3 1 M; EDTA sal disódica 0,02 M.

Medio de cultivo RPMI-1640 incompleto: Agua destilada + Medio de cultivo RPMI-1640 (Gibco, R4130-1L) + NaHCO_3 0,2 % + penicilina-estreptomicina (Gibco, 11556461) 1%.

- Ajustar el pH a 7,3 y aforar a 1L usando agua destilada.
- Filtrar con membranas de 0,22 μm .
- Para preparar medio RPMI completo, suplementar medio con 10% de suero fetal bovino desactivado (SFB).

Medio de cultivo RPMI completo: Medio de cultivo RPMI-1640 incompleto + 10% SFB.

Medio de cultivo RPMI-1640 enriquecido: RPMI + SFB 10%; piruvato de sodio ((Gibco, 11360070)) 1 mM; solución de aminoácidos no esenciales (Gibco, 11140050) 1X; β -mercaptoetanol 50 mM (Gibco, 31350010).

Medio de cultivo para diferenciación de Tregs: RPMI + piruvato de sodio 1 mM; solución de aminoácidos no esenciales 1X; β -mercaptoetanol 50 mM; ImmunoCult™ Mouse Treg Differentiation Supplement (StemCell Technologies, 10957); anti-CD28 (Biolegend, 102102) 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

- El medio de cultivo para diferenciación de Tregs debe prepararse poco antes de su uso.
- El anti-CD28 se agrega el mismo día del cultivo celular para evitar su degradación.

Solución de AOM inyectable:

La solución inyectable de AOM se prepara a partir de la solución stock de AOM (Sigma, A5486), la cual tiene una concentración de 25 mg/ml. Para prepararla, se calcula el promedio del

peso de los ratones, de tal manera que se les inyecte una dosis de 12,5 mg/kg de AOM a cada uno. La solución stock de AOM se diluye en solución salina estéril.

Solución de DSS: Agua para beber + DSS 2%.

- Filtrar con membranas de 0,22 μm .
- Preparar el mismo día de su uso.

Solución hemolizante: Agua destilada + Tris- HCl 13 mM; NH_4Cl 155 mM.

- Ajustar el pH a 7,56.
- Filtrar con membranas de 0,22 μm .

6.3. Modelo murino de cáncer de colon asociado a colitis

En el día 1 de la inducción los ratones reciben una inyección intraperitoneal con azoximentano (AOM) a una concentración de 12,5 mg/kg. Cinco días después se les coloca una solución de dextrán sulfato de sodio (DSS) (Sigma, 42867), a una concentración del 2% en su agua de beber, la cual se deja por 7 días sin cambios. Los ratones después reciben agua normal por 14 días. Este ciclo se repite dos veces más, tiempo después del cual es observable el desarrollo de tumores en los ratones WT (105) (**Figura 9**). Este modelo recapitula las etapas del desarrollo de la enfermedad, desde la inflamación crónica (etapa temprana, alrededor del día 20), hasta el desarrollo visible de tumores (etapa tardía, a partir del día 68). Durante el transcurso del experimento se registra una vez por semana el peso de los animales, así como el índice de daño de la enfermedad (DAI, por sus siglas en inglés). El DAI es la puntuación combinada de la pérdida de peso en comparación con el peso inicial, la consistencia de las heces y el sangrado. Las puntuaciones se definen de la siguiente manera: pérdida de peso: 0 (sin pérdida), 1 (1-5%), 2 (5-10%), 3 (10-20%) y 4 (> 20%); consistencia de las heces: 0 (normal), 2 (heces blandas) y 4 (diarrea); y sangrado: 0 (sin sangre), 1 (sangrado visible en las heces), y 4 (sangrado macroscópico, sangre alrededor del ano) (106). Para evaluar la efectividad del tratamiento, los ratones fueron sacrificados en la etapa tardía del tratamiento, se les extrajo el colon y se evaluó el crecimiento tumoral.

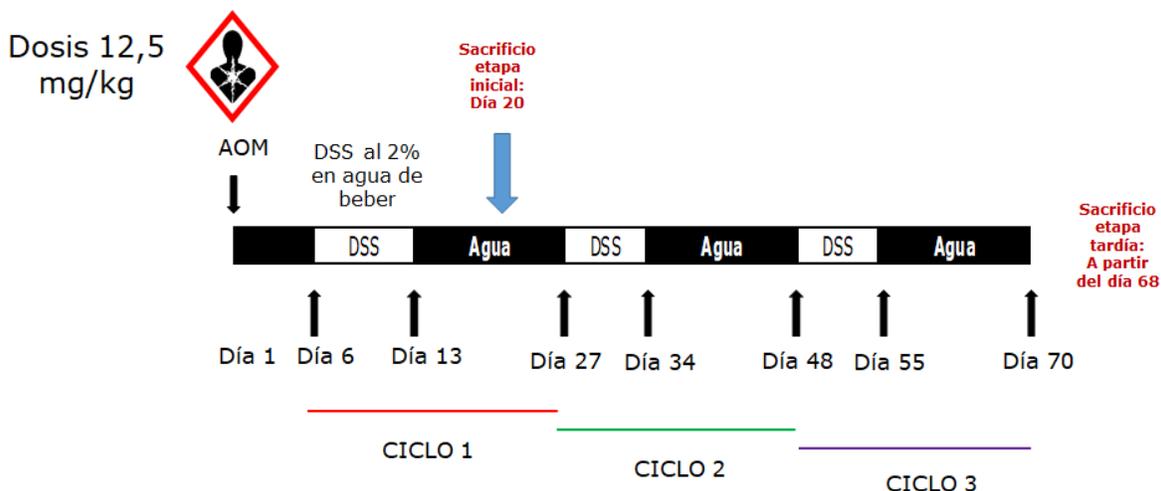


Figura 9. Modelo murino de inducción de cáncer de colon asociado a colitis mediante el tratamiento con AOM y DSS.

6.4. Extracción de ADN genómico y PCR en punto final

Para la genotipificación mediante PCR, a ratones macho y hembra doble $STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}$ y $FoxP3^{EGFP}$ se les cortó de 0,5-1 cm de la punta de la cola en condiciones de esterilidad. El tejido se incubó overnight en buffer de proteinasa K y Proteínasa K (Goldbio, P-480-100) a 56°C en tubos eppendorf. Al siguiente día, se continuó con el proceso de extracción de ADN genómico mediante la aplicación de isopropanol a 4°C para precipitar el ADN, y dos lavados del pellet con etanol a 4°C, como se describe en Z. Wang & Storm, 2006 (107). El ADN extraído se cuantificó y se evaluó su calidad con nanofotómetro NP80 (Implen). El ADN extraído se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

Para determinar el genotipo de los ratones $FoxP3^{EGFP}$ y $STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}$, se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final. Se siguieron las recomendaciones de genotipificación de The Jackson Laboratories (2013) (108) (109). Las PCR se realizaron en un termociclador Bio-Rad T100.

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados en la PCR en punto final para genotipificación.

Gen	Primer	Secuencia 5' > 3'	Tamaño del amplicón
FoxP3	F	GCG TAA GCA GGG CAA TAG AGG	FoxP3 <i>wild type</i> : 275 pb FoxP3 ^{EGFP} : 325 pb
	R	GCA TGA GGT CAA GGG TGA TG	
STAT6	Mutante	AAT CCA TCT TGT TCA ATG GCC GAT C	STAT6 <i>wild type</i> : 275 pb STAT6 ^{-/-} : 378 pb
	Común	ACT CCG GAA AGC CTC ATC TT	
	Wild type	AAG TGG GTC CCC TTC ACT CT	

Tabla 2. Mezcla utilizada para la PCR en punto final para genotipificación.

Reactivo	1X	[] inicial	[] final
Buffer PCR con detergente y sin MgCl ₂	2,5 ul	10X	1X
MgCl ₂	2 ul	25 mM	2 mM
dNTP's	0,2 ul	25 mM	200 uM
Primers	1 ul (c/u)	10 mM	400 uM
FirePol Polimerasa	0,3 ul	5 U/ul	0.06 U/ul
ADN	1 ul	1000 ng/ul	40 ng/ul
Agua	Volumen restante		
Total	25 ul	-	-

Tabla 3. Pasos del termociclador para la amplificación del gen STAT6.

Paso	Temperatura	Tiempo	Nota
1	94°C	1'	Incubación inicial
2	95°C	30''	Desnaturalización
3	58°C	30''	Anillamiento
4	72°C	30''	Amplificación
5	-	-	Repetir pasos 2-4 39 veces (39X)
6	94°C	7'	Amplificación final

Tabla 4. Pasos del termociclador para la amplificación del gen FoxP3.

Paso	Temperatura	Tiempo	Nota
1	94°C	1'	Incubación inicial
2	95°C	30''	Desnaturalización
3	60°C	30''	Anillamiento
4	72°C	30''	Amplificación
5	-	-	Repetir pasos 2-4 39 veces (39X)
6	94°C	7'	Amplificación final

6.5. Diferenciación de Tregs *in vitro*

6.5.1. Obtención de esplenocitos

De cada ratón se extrajo el bazo en condiciones de esterilidad; cada bazo fue homogeneizado empleando el émbolo de una jeringa y tela organza, en una caja de Petri con 5 ml de medio RPMI sin SFB para liberar las células. El medio RPMI con células fue recolectado, tratado con solución hemolizante, y lavado con más medio RPMI sin SFB para obtener los esplenocitos. En el último lavado, las células fueron resuspendidas en medio RPMI enriquecido para conservar su viabilidad. Posteriormente se contaron los esplenocitos de cada ratón empleando una cámara de Neubauer y azul de tripano. Las células fueron mantenidas a 4°C hasta su posterior uso.

6.5.2. Separación magnética de linfocitos T CD4⁺ naïve

Se separaron los linfocitos T CD4⁺ naïve por selección magnética negativa utilizando el “Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit, mouse” (Miltenyi, 130-104-453), las columnas MS (Miltenyi, 130-042-201) siguiendo las instrucciones del proveedor, y buffer de separación. La obtención de células naïve empleando el “Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit, mouse” se realiza mediante el marcaje de esplenocitos totales con los anticuerpos biotinilados CD8a, CD11b, CD11c, CD19, CD25, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, Anti-MHC clase II, Ter-119, TCR γ/δ y CD44, y su posterior asociación con perlas magnéticas anti-biotina (*Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit - Our Gold Standard | Biocompare.com Kit/Reagent Review*, 2019.). De esta manera, durante la selección magnética, las células no-naïve quedan asociadas a la columna, mientras que las células de interés pueden recolectarse para su posterior uso. Los linfocitos T CD4⁺ naïve se contaron mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano, se lavaron con medio de cultivo RPMI enriquecido, y se resuspendieron en este mismo medio a 4°C hasta su posterior uso.

6.5.3. Cultivo celular para diferenciación de Tregs *in vitro*

El día anterior a la obtención de las células T CD4⁺ naïve, se recubrió el fondo de un plato de cultivo de 96 pozos de fondo plano, apto para cultivo celular, con 200ng de anti-CD3 (Biolegend, 100201) diluido en PBS; el plato se incubó a 4°C overnight. Después de obtener las células T CD4⁺ naïve, estas se diluyeron a una concentración de 1x10⁶ células/ml en medio de cultivo RPMI enriquecido (el cuál será el control de diferenciación) y otras tantas se diluyeron en medio de cultivo RPMI para diferenciación de Tregs. En cada pozo se depositaron 2x10⁵ células T CD4⁺ naïve en 200 ul de medio de cultivo. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ por seis días. En el tercer y quinto día del cultivo, cada pozo fue suplementado con 50 ul de medio de cultivo fresco para reponer el medio evaporado durante el cultivo.

6.6. Ensayo de supresión de Tregs *in vitro*

6.6.1. Separación magnética de linfocitos T CD4⁺ totales

Se obtuvieron esplenocitos totales de ratones en tratamiento con CAC de la manera que se describió previamente. Se separaron los linfocitos T CD4⁺ totales por selección magnética negativa utilizando el “CD4+ T Cell Isolation Kit, mouse” (Miltenyi, 130-104-454), las columnas MS (Miltenyi, 130-042-201) siguiendo las instrucciones del proveedor, y buffer de separación. Los linfocitos T CD4⁺ se contaron mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano, se lavaron con medio de cultivo RPMI enriquecido, y se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

6.6.2. Cell sorting de Tregs

Las células obtenidas a partir de la separación magnética se mantuvieron en cultivo a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en platos de 12 pozos sin anti-CD3 *overnight*. La siguiente mañana, con las células CD4⁺ obtenidas se hizo un *cell sorting* de células CD4⁺FoxP3⁺ a partir de la expresión

de EGFP en un equipo BD Influx en el Laboratorio de Instrumentos, sección de Citometría de Flujo, del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Las células obtenidas, que corresponden a las Tregs, se mantuvieron en medio RPMI enriquecido hasta su uso.

6.6.3. Preparación de los esplenocitos respondedores

El mismo día del sacrificio de los ratones en tratamiento de CAC, se extrajeron células de bazo totales de un ratón WT. Estas células se tiñeron con el “Kit de proliferación de CellTrace™ Violet, para citometría de flujo” (Invitrogen, C34557) a una concentración de 3 μ M, la cual es suficiente para rastrear cinco generaciones celulares de acuerdo con el proveedor. Estas células se denominarán “*esplenocitos respondedores*”. Posteriormente, estos se sembraron en platos de cultivo de 96 pozos de fondo plano previamente recubiertos con anti-CD3 a una concentración de 5 μ g/ μ l. Como después se hizo un cocultivo de Tregs con estos esplenocitos respondedores se sembraron diferentes números de esplenocitos respondedores en el plato de cultivo, siendo 100000 el número máximo de células totales que se tendrá en un solo pozo. Todas las células se sembraron en 100 μ l de medio RPMI suplementado y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ por alrededor de 12 horas, mientras se realizaba el *cell sorting* para obtener las Tregs.

Se sembraron también células teñidas con CTV en pozos sin anti-CD3, y células sin CTV para preparar los controles de compensación de la citometría.

6.6.4. Cocultivo de Tregs con esplenocitos respondedores

Se realizó un cocultivo de las Tregs obtenidas mediante *cell sorting* con los esplenocitos respondedores. Las Tregs se añadieron al cultivo de los esplenocitos respondedores, de modo que en la placa quedarán cocultivos a diferentes proporciones de Tregs vs esplenocitos respondedores: 0:1, 1:1, 1:3 y 1:7. Se ajustó el volumen de medio RPMI suplementado de tal manera que después

de sembrar las células supresoras, cada pozo de cultivo quedara con 200 μ l de medio. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂ por 72 horas.

6.7. Citometría de flujo

La obtención de datos de todas las citometría de flujo se realizó en un equipo Attune NxT, adquiriendo 5000 eventos por muestra. Las características del equipo son las siguientes: 4 láseres, que son láser de excitación azul (488 nm), láser de excitación rojo (638 nm), láser de excitación violeta (405 nm); y 11 detectores (BL1, BL2, BL3, BL4, RL1, RL2, RL3, VL1, VL2, VL3, VL4). Los datos fueron analizados con el software de análisis de datos de citometría de flujo FlowJo (FlowJo; Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

6.7.1. Tinción extracelular

Las células se incubaron en 25 μ l de FACS con anticuerpo anti-CD16/32 (Biolegend, 101301) por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se añadieron 25 μ l de FACS con los anticuerpos extracelulares, y las células se incubaron por 1 hora a 4°C y en oscuridad. Los anticuerpos extracelulares usados en este proyecto fueron: anti-CD4 conjugado con APC (Biolegend, 10041); anti-CD25 conjugado con Brilliant Violet 711 (Biolegend 102049); CD8 conjugado con VB605 (Biolegend, 100743); PD-1 conjugado con PE (Biolegend, 109104) y CD103 conjugado con Pacific Blue (Biolegend, 121418). Posteriormente, las células se lavaron dos veces con FACS y se prosiguió con la tinción intracelular, o se resuspendieron en 300 μ l de FACS nuevo y se adquirieron en el citómetro. Los controles de compensación se prepararon de dos formas: empleando los “Gránulos de compensación UltraComp eBeads™ Plus” (Invitrogen™ 01-3333-41) y siguiendo las instrucciones del proveedor; o empleando sangre de un ratón WT. En cualquiera de estos casos, se tiñeron muestras individuales de los gránulos o células con cada uno de los anticuerpos usados para la citometría. Para más información acerca de las tinciones extracelulares empleadas en cada ensayo de este proyecto, ver la **Tabla 5**.

6.7.2. Tinción intracelular

Después de la tinción extracelular, las células se trataron con el True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (Biolegend, 424401) siguiendo las instrucciones del proveedor, y se tiñeron con el anticuerpo anti-FoxP3 conjugado a AlexaFluor 488 (Biolegend, 126406) durante 1 hora a 4°C en oscuridad. Después, se lavaron dos veces con FACS, se resuspendieron en 300 ul de FACS nuevo y se adquirieron en el citómetro. Los controles de compensación se prepararon: empleando los “Gránulos de compensación UltraComp eBeads™ Plus” y siguiendo las instrucciones del proveedor. Para más información acerca de las tinciones intracelulares empleadas en cada ensayo de este proyecto, ver la **Tabla 5**.

6.8. Análisis estadísticos

Los datos se analizaron mediante ANOVA con comparaciones múltiples o pruebas t de dos colas no pareadas con corrección de Welch utilizando el software GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, EE. UU.). Todas las pruebas estadísticas se realizaron considerando intervalos de confianza del 95%. Los datos se expresan como la media \pm SEM. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; **** = $p < 0,0001$.

Tabla 5. Detalles de las tinciones empleadas en cada ensayo del proyecto de tesis.

Ensayo		Diferenciación de Tregs STAT6 ^{-/-} <i>in vitro</i>	Caracterización de ratones STAT6 ^{-/-} /FoxP3 ^{EGFP}	Análisis de marcadores extracelulares de esplenocitos de ratones STAT6 ^{-/-} /FoxP3 ^{EGFP}	Ensayo de supresión de Tregs de ratones STAT6 ^{-/-} /FoxP3 ^{EGFP}
Preparación de la muestra		Después de seis días de cultivo, las células se cosecharon y se lavaron con FACS.	Se extrajeron 100 ul de sangre mediante un corte en la punta de la cola. La sangre se recolectó con 15 ul de EDTA 2%, y se trató con 3 ml de solución hemolizante.	Se obtuvieron células de bazo durante el sacrificio de ratones con tratamiento de inducción de CAC. Para cada ratón, se tiñeron un millón de células.	Después del cocultivo, las células se recuperaron y se lavaron una vez con FACS.
Anticuerpos	Tinción extracelular	CD4-APC; CD25-VB711.	CD4-APC.	CD4-APC; CD8-VB605; CD25-VB711; PD-1-PE; CD103-Pacific Blue.	CD4-APC; CD8-VB605
	Tinción intracelular	FoxP3-Alexa Flúor 488.			
Controles		Individuales de CD4-APC, CD25-VB-711 y FoxP3-Alexa Flúor 488 empleando gránulos de compensación UltraComp eBeads™ Plus. Células en cultivo de un ratón WT como blanco.	Individual de CD4-APC usando sangre de un ratón WT. Sangre de un ratón WT como blanco.	Individuales de CD4-APC, CD8-VB605, CD25-VB711, PD-1-PE y CD103-Pacific Blue usando esplenocitos de un ratón WT. Individual de FoxP3 ^{EGFP} usando esplenocitos de un ratón FoxP3 ^{EGFP} sin teñir. Esplenocitos de un ratón WT como blanco.	Individuales de CD4-APC y CD8-VB605 usando esplenocitos de un ratón WT. El individual de CellTrace Violet se preparó el día del cocultivo usando esplenocitos de un ratón WT.
Poblaciones celulares analizadas		Tregs totales (CD4 ⁺ FoxP3 ⁺) y Tregs activadas (CD4 ⁺ CD2 ^{high} FoxP3 ⁺).	Tregs totales (CD4 ⁺ FoxP3 ⁺)	Linfocitos T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ , Tregs totales (CD4 ⁺ FoxP3 ⁺) Tregs activadas (CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺); Tregs PD-1 ⁺ , Tregs CD103 ⁺ .	Linfocitos T CD4 ⁺ y T CD8 ⁺ .

7. Resultados

7.1. Caracterización de ratones $STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP}$ *knock-in* de fondo genético BALB/c.

Con el objetivo de caracterizar la nueva cepa de ratones $STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP}$ previamente generada en el laboratorio, y antes de utilizarla para ensayos funcionales con Tregs, comprobamos que los ratones de esta cepa fueran *knockout* en STAT6 y tuvieran el transgen de FoxP3^{EGFP}. Para esto realizamos PCR en punto final usando ADN genómico de estos ratones y los primers que se muestran en la **Tabla 1**, utilizando ratones WT, $STAT6^{-/-}$ y FoxP3^{EGFP} como controles. Como se observa en la **Figura 10A**, para ratones $STAT6^{-/-}$ y $STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP}$ se observa una banda muy brillante de entre 300 y 400 pares de bases (pb), correspondiente al amplicón del cassette de neomicina insertado en el genoma del ratón durante el proceso de generación de la cepa original $STAT6^{-/-}$; por otro lado, en el ratón WT se observa una banda de entre 200 y 300 pb, correspondiente al amplicón del gen de STAT6 *wild type*. En el gel se observa un amplicón inespecífico de 200 pb y dímeros de primers en los carriles de todos los ratones genotipados. También encontramos que para los ratones FoxP3^{EGFP} y $STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP}$ se observa un amplicón de entre 300 y 400 pares de bases, correspondientes al gen de FoxP3 y a una secuencia loxP insertada en el proceso de generación de la cepa; los ratones *wild type* presentan un amplicón de entre 200 y 300 pares de bases correspondientes solamente al gen de FoxP3 (**Figura 10B**). Con esta información se concluye que esta nueva cepa de ratones es *knockout* en STAT6 y tienen el transgen de FoxP3^{EGFP}.

Además, con el objetivo de comprobar que los ratones $STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP}$ presentan en su organismo células CD4⁺FoxP3⁺, correspondientes a las Tregs totales, y que estas pueden discriminarse mediante citometría de flujo con base en la fluorescencia de EGFP, hicimos una tinción de leucocitos en circulación de ratones macho y hembra doble transgénicos. Se utilizaron ratones FoxP3^{EGFP} como control. Para obtener el porcentaje de Tregs se siguió la estrategia de análisis de datos que se muestra en la **Figura 11A**. Encontramos que tanto los ratones FoxP3^{EGFP} como los

STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} presentan una población de células CD4⁺FoxP3⁺ (**Figura 11B**), y que su porcentaje es de entre 6 y 7% de los linfocitos T CD4⁺ totales y (**Figura 11C**).

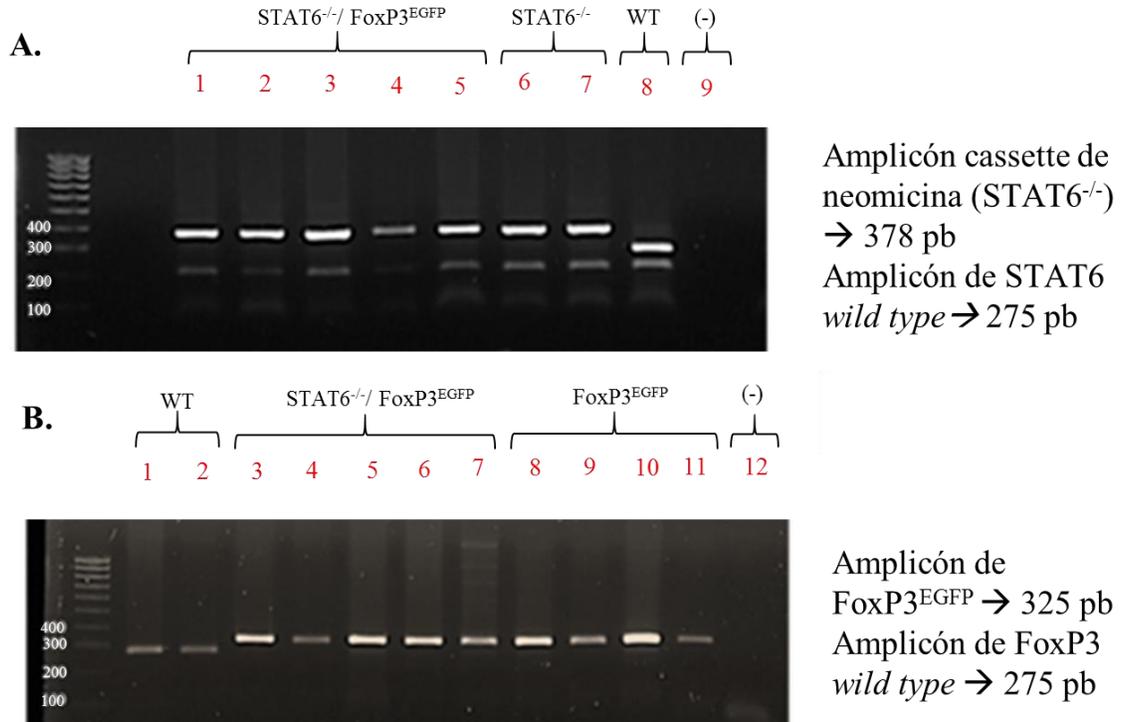


Figura 10. Genotipos de ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}.

Los ratones doble transgénicos son knockout en STAT6 y expresan la proteína verde fluorescente junto con el factor de transcripción FoxP3. (A). Genotipo de ratones doble transgénicos STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} y STAT6^{-/-} de fondo genético BALB/c. (B). Genotipo de ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} y FoxP3^{EGFP}

7.2. La ausencia de STAT6 no altera la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ naïve a Tregs *in vitro*.

Para determinar si la ausencia de STAT6 influye en la capacidad de diferenciación de Tregs *in vitro* se hizo un cultivo de linfocitos T CD4⁺ naïve provenientes de ratones WT y STAT6^{-/-} en medio de cultivo suplementado con “ImmunoCult™ Mouse Treg Differentiation Supplement”). Se hizo un cultivo en medio RPMI de las mismas células como control de diferenciación. Debido a que para este momento no se contaban con suficientes ratones hembra STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} para realizar el experimento, se utilizaron ratones hembra STAT6^{-/-}. Después de seis días de cultivo las células se

estudiaron mediante citometría de flujo para obtener el porcentaje de Tregs totales ($CD4^+FoxP3^+$) y Tregs con fenotipo activado ($CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$), siguiendo la estrategia experimental que se muestra en la **Figura 12**.

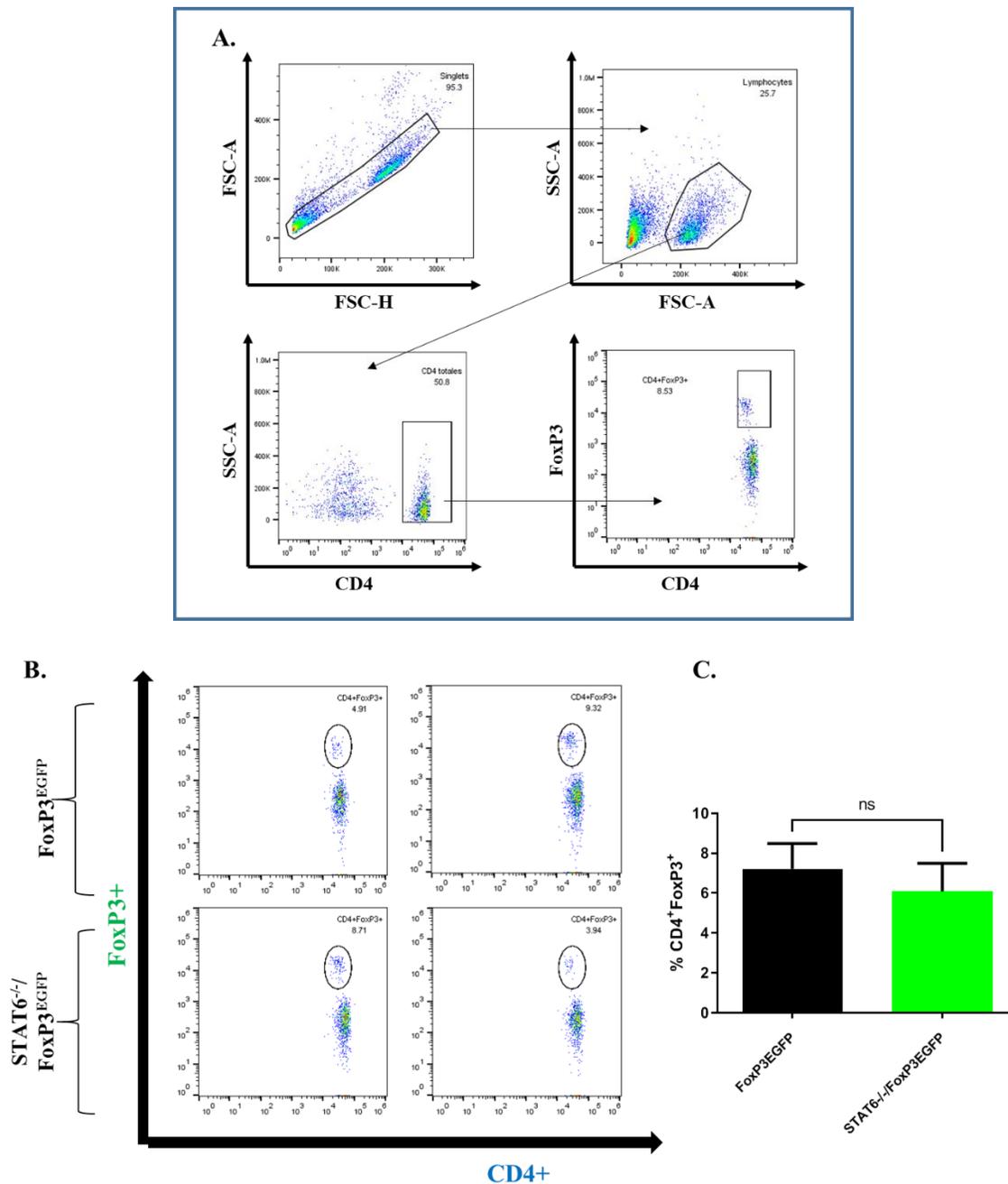


Figura 11. Identificación de Tregs a partir de sangre periférica de ratones $Foxp3^{EGFP}$ y doble transgénicos con base en la expresión de $CD4$ y $FoxP3^{EGFP}$.

(A) Estrategia para la identificación de Tregs totales a partir de leucocitos en sangre. En primer lugar, se identificaron los *singlets* en un plot de FSC-A vs FSC-H. En segundo lugar, se discriminaron los

linfocitos con base en su granularidad y tamaño. Después se hallaron las células CD4⁺ totales. Por último, se determinó la población de Tregs totales (CD4⁺FoxP3⁺). (B). Dot plots representativos y (C) frecuencias de Tregs totales obtenidas mediante citometría de flujo de sangre periférica de ratones FoxP3^{EGFP} y doble transgénicos. Los datos se expresan como la media \pm SEM. n (ratones por grupo) =3.

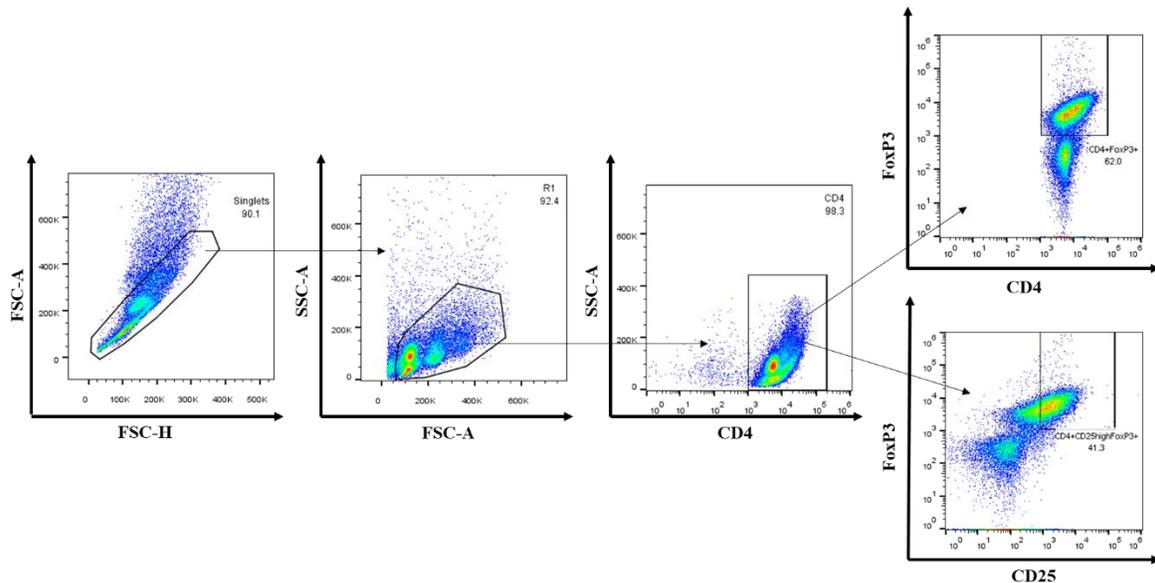


Figura 12. Estrategia para la identificación de Tregs en cultivos celulares de linfocitos T CD4⁺ naïve con base en la expresión de CD4, CD25 y FoxP3.

De izquierda a derecha, en primer lugar, se identificaron los *singlets* en un diagrama de FSC-A vs FSC-H. Después, las células vivas se identificaron en un plot de SSC-A vs FSC-A. Posteriormente, se graficaron las células CD4⁺ totales en un diagrama SSC-A vs CD4-APC. A partir de la región de linfocitos CD4 totales, se obtienen las Tregs totales CD4⁺FoxP3⁺ y Tregs CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺.

En primer lugar, se encontró que los linfocitos T naïve de ratones WT y STAT6^{-/-} que se cultivaron en medio RPMI no se diferenciaron en Tregs, o se diferenciaron en un porcentaje muy bajo (1%). Por el contrario, las células que se cultivaron en medio con el suplemento para Tregs sí se diferenciaron, encontrándose un porcentaje de células CD4⁺FoxP3⁺ de alrededor del 50% para ambos grupos experimentales. Sin embargo, no se encontró diferencia entre el porcentaje de Tregs totales diferenciadas a partir de células T naïve provenientes de ratones WT y STAT6 (Figura 13A y 13B). Asimismo, se observó que algunas de las Tregs diferenciadas *in vitro* son también CD25^{high}, lo cual sugiere que son de fenotipo activado, aunque no hay diferencia en el porcentaje de Tregs activadas provenientes de linfocitos T naïve de ratones WT o deficientes en STAT6 (Figura 13C y 13D). Estos resultados sugieren que STAT6 no es importante para la diferenciación de Tregs *in vitro*.

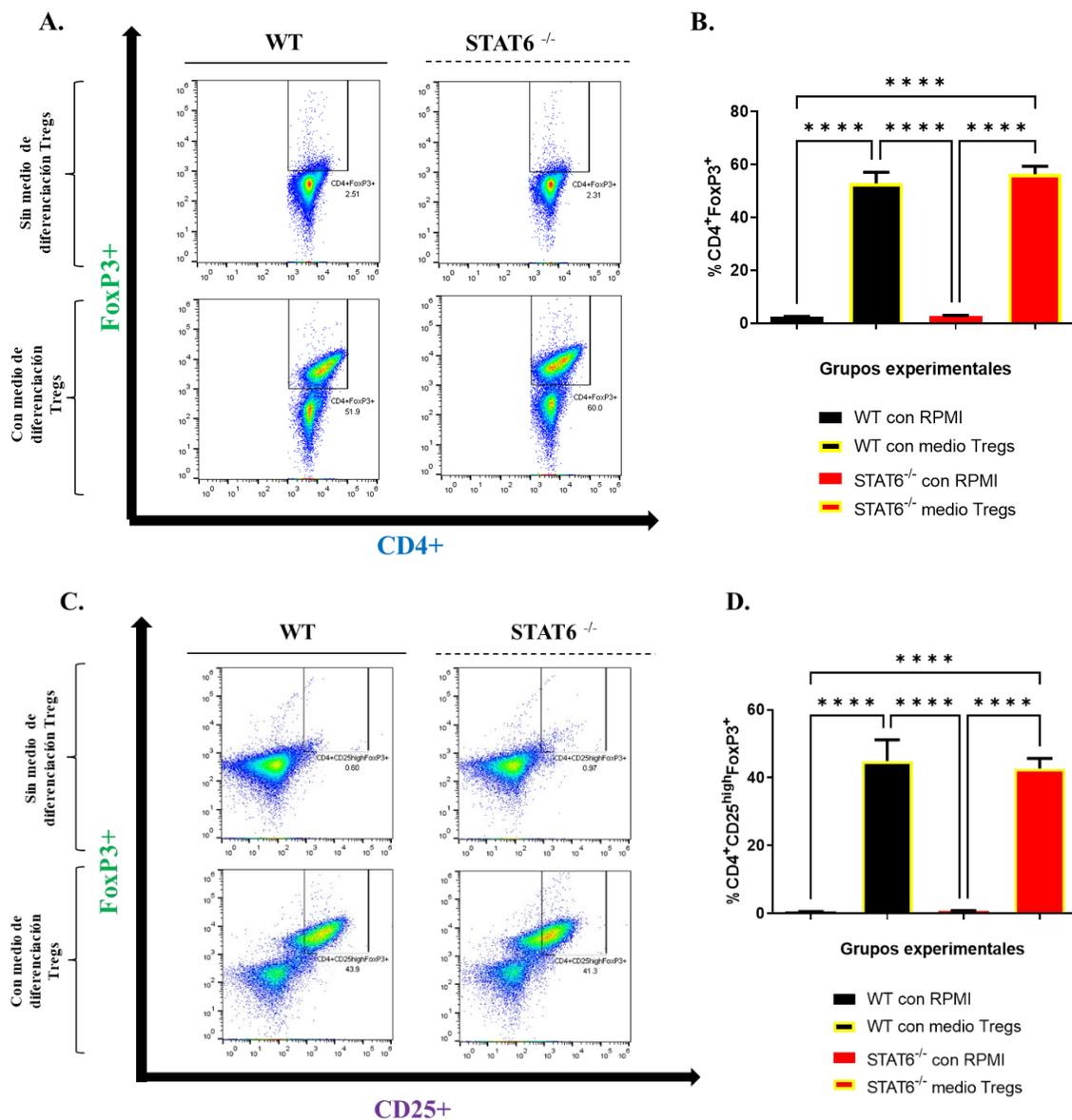


Figura 13. Capacidad de diferenciación de linfocitos T CD4⁺ naïve provenientes de ratones deficientes en STAT6 a Tregs.

(A). Dot-plots representativos del porcentaje de células CD4⁺FoxP3⁺, provenientes de ratones WT y STAT6^{-/-}, cultivadas en medio suplementado y medio normal. (B). Porcentajes de Tregs totales diferenciadas. (C). Dot-plots representativos del porcentaje de células CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺, provenientes de ratones WT y STAT6^{-/-}, cultivadas en medio suplementado y medio normal. (D) Porcentajes de linfocitos CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ en las diferentes condiciones experimentales. Los datos se expresan como la media \pm SEM. n (ratones por grupo) =3.

7.3. La ausencia de STAT6 aumenta la capacidad de diferenciación de Tregs *in vitro* a partir de células T CD4⁺ naïve provenientes de ratones con inducción de CAC

Con el objetivo de determinar si STAT6 participa en la diferenciación de Tregs *in vitro* a partir de células provenientes de ratones en etapas tempranas de CAC, se diferenciaron linfocitos T CD4⁺ naïve obtenidos de ratones WT y STAT6^{-/-} con tratamiento de AOM/DSS en medio de cultivo con Immunocult. Otras células naïve se cultivaron en medio RPMI como control de proliferación. Se siguió la misma estrategia de análisis de la **Figura 12**. De esta manera, se encontró que los linfocitos T naïve de ratones WT y STAT6^{-/-} en etapas iniciales del CAC que se cultivaron en medio RPMI no se diferenciaron en Tregs, o se diferenciaron en un porcentaje muy bajo (1%). Por el contrario, las células que se cultivaron en medio con el suplemento para Tregs sí se diferenciaron, habiendo un porcentaje mayor de Tregs diferenciadas de linfocitos T CD4⁺ naïve de ratones STAT6^{-/-} en comparación con los WT (**Figura 14A y 14B**). Asimismo, se observó que algunas de las Tregs diferenciadas *in vitro* son también CD25^{high}, lo cual sugiere que son de fenotipo activado, habiendo más células diferenciadas en ausencia de STAT6 (**Figura 14C y 14D**). Estos resultados sugieren que la ausencia de STAT6 favorece la diferenciación de Tregs *in vitro*, cuando los linfocitos T CD4⁺ naïve provienen de ratones en etapas tempranas de CAC.

7.4. El porcentaje de linfocitos T CD8⁺ disminuye en ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}- en etapas iniciales de CAC

Con el objetivo de estudiar las Tregs en el contexto del CAC primero se comprobó que el modelo murino de CAC funciona en los ratones doble transgénicos. Se realizó una inducción de CAC mediante AOM/DSS a ratones Foxp3^{EGFP} y STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP}. Se utilizaron ratones que no se expusieron al tratamiento como controles del desarrollo tumoral. Durante el transcurso del experimento se registró una vez por semana el peso de los animales, así como el índice de daño de

la enfermedad. Los ratones se sacrificaron en el día 80, se les extrajo el colon, se midió su longitud y se contó el número de tumores en el colon.

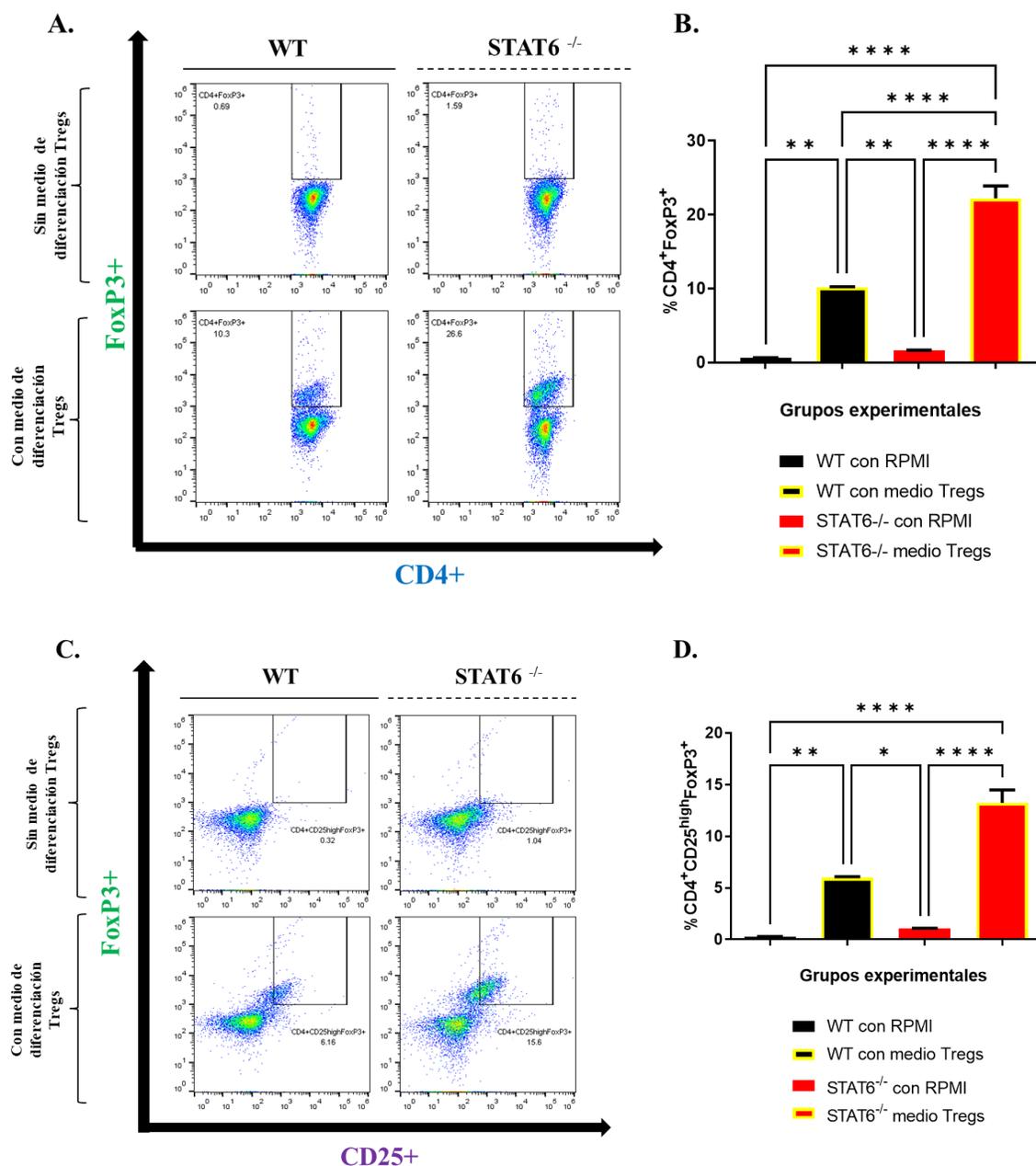


Figura 14. La deficiencia de STAT6 aumenta la capacidad de diferenciación de células T naïve provenientes de ratones con inducción de CAC, a Tregs *in vitro*.

(A). Dot-plots representativos del porcentaje de células CD4⁺FoxP3⁺, provenientes de ratones WT y STAT6^{-/-} en tratamiento con AOM/DSS, cultivadas en medio suplementado y medio normal. (B). Porcentajes de linfocitos CD4⁺ que expresan FoxP3 en las diferentes condiciones experimentales. (C). Dot-plots representativos del porcentaje de células CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺, provenientes de ratones WT y STAT6^{-/-} en

tratamiento con AOM/DSS, cultivadas en medio suplementado y medio normal. (D). Los datos se expresan como la media \pm SEM. n (ratones por grupo) =3.

Como se observa en la **Figura 15A**, los ratones $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ y $\text{STAT6}^{-/-}/\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ que no pasaron por un tratamiento de inducción de CAC no desarrollaron tumores. Por el contrario, los ratones $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ y $\text{STAT6}^{-/-}/\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ en tratamiento de CAC desarrollaron tumores en la parte distal del colon, señalados con las flechas negras, y presentaron un acortamiento de la longitud del colon en comparación con los colon de ratones control. En particular, los ratones $\text{STAT6}^{-/-}/\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ AOM/DSS presentaron menos tumores (**Figura 15B**) y una mayor longitud del colon (**Figura 15C**) que los ratones $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ AOM/DSS. Como se observa en la **Figura 15D** y **Figura 15E**, los ratones sin tratamiento de AOM/DSS subieron de peso a lo largo del experimento, y presentaron un DAI de 0. Por el contrario, los ratones en tratamiento de CAC bajaron de peso y presentaron un DAI considerable, en particular en los días de aplicación del DSS en su agua de beber. Pese a que los ratones $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ AOM/DSS y $\text{STAT6}^{-/-}/\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ AOM/DSS bajaron de peso de manera similar, los ratones $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ AOM/DSS presentaron un mayor índice de daño a lo largo del tratamiento y terminaron con un peso relativo menor que los ratones $\text{STAT6}^{-/-}/\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$.

Después de comprobar que el modelo murino de CAC funciona en ratones doble transgénicos, se realizó otra inducción de CAC mediante AOM/DSS a ratones $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ y $\text{STAT6}^{-/-}/\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$. Se utilizaron ratones $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ y $\text{STAT6}^{-/-}/\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ que no se expusieron al tratamiento como controles del desarrollo tumoral. Con el objetivo de analizar el fenotipo de las Tregs en las etapas tempranas del CAC, los ratones fueron sacrificados en el día 20 del tratamiento, se extrajeron los esplenocitos totales y se realizó una tinción de marcadores extracelulares de linfocitos. Se determinaron las poblaciones celulares de linfocitos y se analizó el fenotipo de las Tregs siguiendo la estrategia de análisis que se muestra en la **Figura 16**.

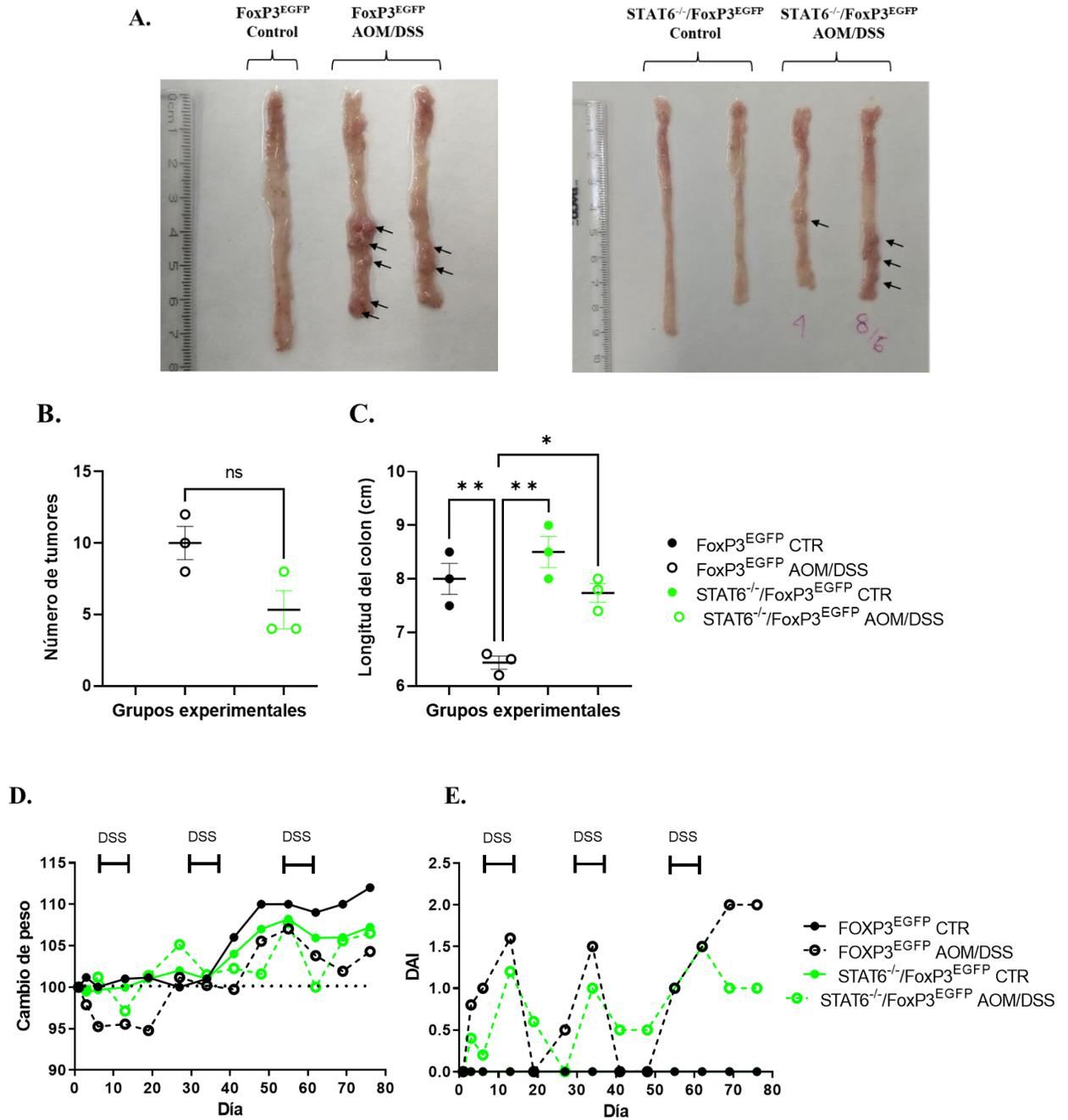


Figura 15. Desarrollo tumoral en ratones STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} con tratamiento de AOM/DSS.

(A). Fotografías representativas de los colon y tumores de ratones de los diferentes grupos experimentales. Las flechas señalan los lugares donde se observan tumores. (B). Cambio porcentual de peso a lo largo del tratamiento. El cambio de peso se expresa con relación al peso inicial (en la gráfica, el peso inicial se sitúa en el valor 100 del eje Y). (C). Índice de daño (DAI) a lo largo del tratamiento. Un valor de cero corresponde a la ausencia de cualquier señal de enfermedad. (D) Número de tumores y (E) longitud del colon de ratones de los diferentes grupos experimentales. Los datos se expresan como la media \pm SEM. n (ratones por grupo) =3.

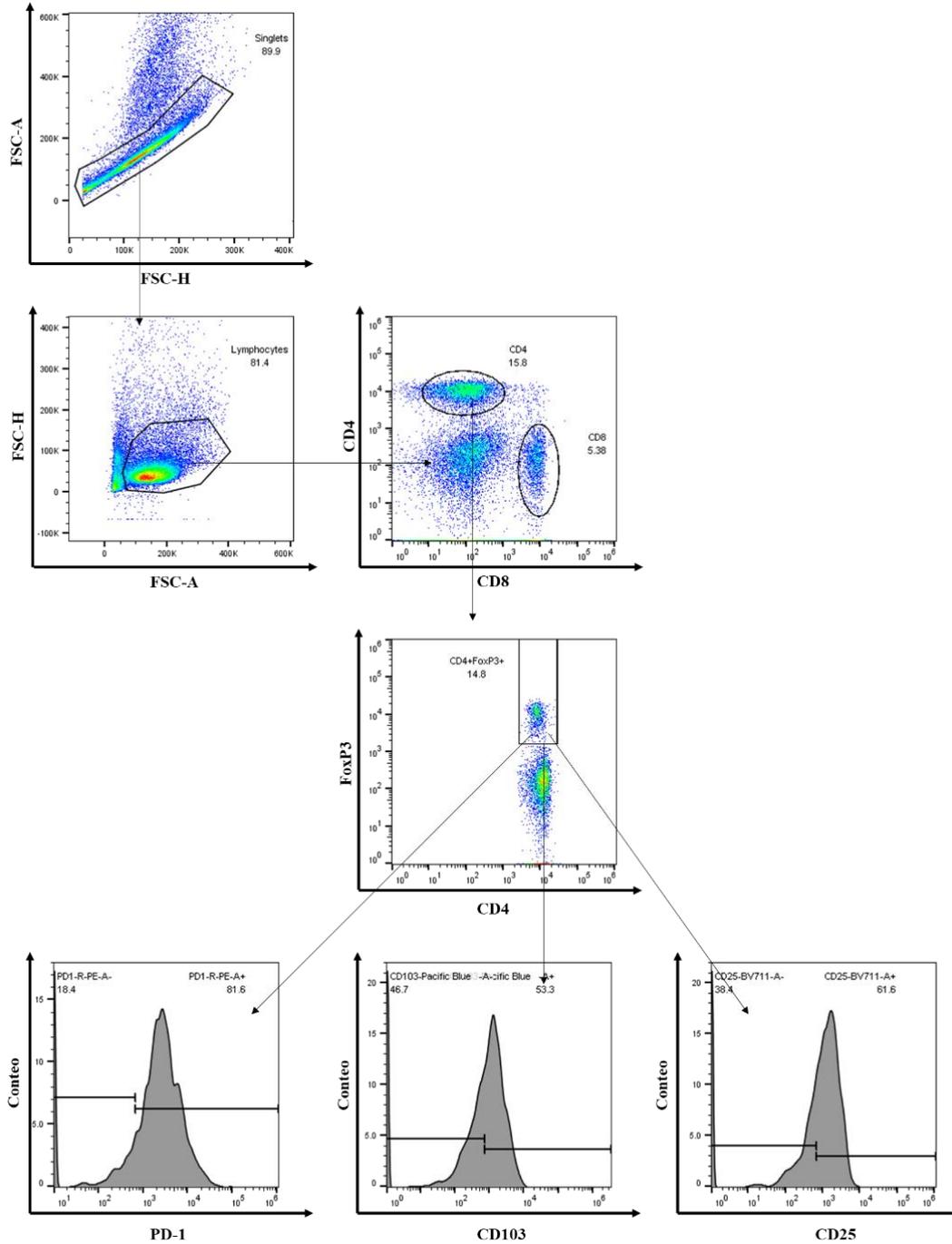


Figura 16. Estrategia para la identificación y caracterización de Tregs a partir de esplenocitos de ratones doble transgénicos y reporteros en tratamiento con AOM/DSS.

(De izquierda a derecha, y de arriba a abajo), primero se identificaron los *singlets* a partir de células totales; luego se seleccionaron de linfocitos a partir de *singlets*; después se identificaron los linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$. A partir del *gate* de los linfocitos $CD4^+$ se obtienen las células $CD4^+FoxP3^+$, que corresponden a las Tregs totales. Por último, a partir del *gate* de Tregs totales se obtiene el porcentaje de células $CD25^{high}$, $PD-1^{high}$, y $CD103^{high}$. De esta población también se obtienen los índices de fluorescencia media geométrica (IFM) para PD-1, CD25, CD103 y FoxP3.

Como se observa en la **Figura 17A**, el porcentaje basal de linfocitos T CD8⁺, que corresponde a los animales Foxp3^{EGFP} control estuvo cerca al 6%. Este porcentaje fue igual en los animales Foxp3^{EGFP} con tratamiento de AOM/DSS. Además, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ en los ratones doble transgénicos también fue menor en los ratones con tratamiento de CAC. Asimismo, se observa en la **Figura 17B** que la población de linfocitos T CD8⁺ en ratones STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} en tratamiento de CAC disminuyó a la mitad en comparación con los ratones STAT6^{-/-} en tratamiento de CAC. Por otro lado, no se observó una diferencia en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺, siendo su porcentaje similar en todos los grupos experimentales (**Figura 17C y 17D**). Finalmente, se observó un aumento en el porcentaje de Tregs totales en los ratones Foxp3^{EGFP} AOM/DSS en comparación con los Foxp3^{EGFP} control, sin embargo, la diferencia es contraria en los ratones STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} (**Figura 17E**). Como se observa en la **Figura 17F**, no es posible identificar una diferencia en los linfocitos T CD4⁺Foxp3⁺ atribuible a la ausencia de STAT6 o al tratamiento de inducción de CAC. Por esta razón, en futuros experimentos es importante aumentar la n de muestras. En conclusión, estos resultados indican que los linfocitos T CD8⁺ aumentan en ratones STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} en etapas tempranas de CAC experimental.

Por otro lado, se observó que el porcentaje de Tregs CD25^{high}, es decir, que cuentan con un fenotipo activado, no es diferente entre los ratones Foxp3^{EGFP} control y Foxp3^{EGFP} AOM/DSS, pero en los ratones STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} AOM/DSS el porcentaje de células CD4⁺Foxp3⁺CD25^{high} aumentó en comparación con el control, aunque este aumento no fue estadísticamente significativo (**Figura 18A**). Sin embargo, en la **Figura 18B** no se aprecia una diferencia significativa entre la población de Tregs activadas provenientes de ratones Foxp3^{EGFP} AOM/DSS y STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} AOM/DSS, aunque se puede apreciar un ligero aumento en la intensidad de fluorescencia de CD25 en las Tregs de ratones doble transgénicos. Por otro lado, no se observa una diferencia estadísticamente significativa en las poblaciones de Tregs PD-1^{high} y CD103^{high}. En primer lugar, las Tregs PD-1^{high} y Tregs CD103^{high} aumentaron su porcentaje en ratones Foxp3^{EGFP} AOM/DSS en comparación con los ratones Foxp3^{EGFP} control. Además, el porcentaje de estas células también aumentó en los ratones STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} AOM/DSS en comparación con los STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} control. Por último, el fenotipo PD-1^{high} y CD103^{high} fue mayor en los ratones *knockout* de STAT6 en tratamiento de inducción de CAC, en comparación con los ratones STAT6^{+/+} (**Figura 18C y 18E**). Sin embargo, debido a la alta desviación estándar de estos datos, y al hecho de que solo hubiera una n de 3, es necesario

augmentar los datos del fenotipo de Tregs en próximos experimentos para poder determinar si hay una diferencia. En efecto, las **Figuras 18D** y **18F** no muestran una diferencia muy grande en el fenotipo de las Tregs. Por lo tanto, se puede sugerir una tendencia a que las Tregs de ratones $STAT6^{-}/Foxp3^{EGFP}$ AOM/DSS son de un fenotipo más activado y supresor, pero se deben repetir estos ensayos.

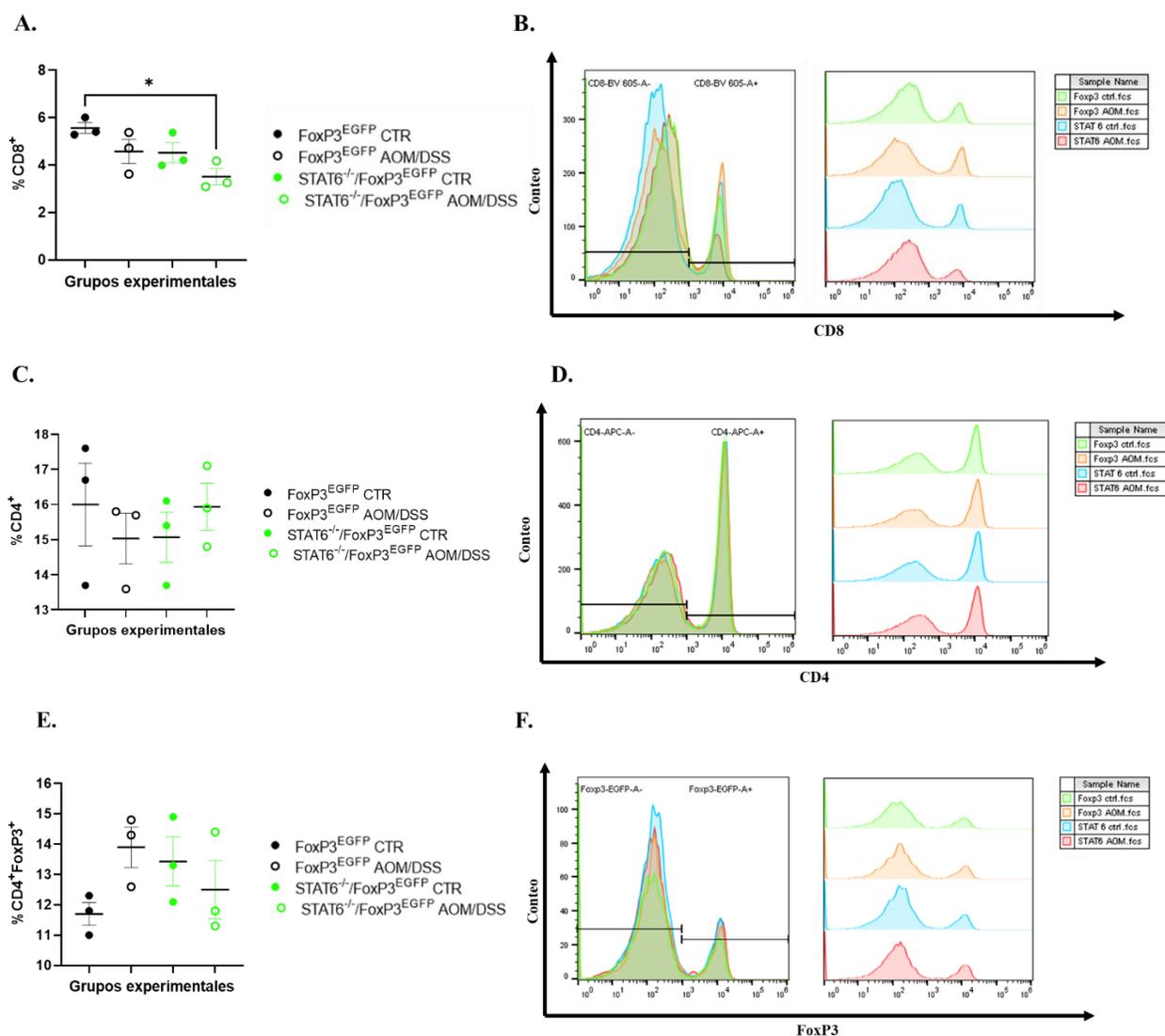


Figura 17. Poblaciones celulares en ratones $Foxp3^{EGFP}$ y $STAT6^{-}/Foxp3^{EGFP}$ en etapas tempranas de desarrollo de CAC.

(A) Porcentaje de linfocitos CD8⁺; (B) y representativos de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ totales; (C) Porcentaje de linfocitos CD4⁺; (D) y representativos de las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ totales; (E) Tregs totales (CD4⁺FoxP3⁺); y (F) representativos de las poblaciones de Tregs totales presentes en el bazo de ratones $Foxp3^{EGFP}$ y $STAT6^{-}/Foxp3^{EGFP}$ con y sin tratamiento de CAC. Los datos se expresan como la media \pm SEM. n (ratones por grupo) =5.

Finalmente, con el objetivo de analizar el nivel de expresión de las moléculas de superficie CD25, PD-1 y CD103 en las Tregs provenientes de ratones Foxp3^{EGFP} y STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP}, se analizó la intensidad media de fluorescencia (IMF) geométrica siguiendo la estrategia experimental que se muestra en la **Figura 16**. También se analizó la IMF de FoxP3 en las Tregs. En primer lugar, se observó que la IMF geométrica de FoxP3 aumentó en ratones FoxP3^{EGFP} AOM/DSS en comparación con los ratones FoxP3^{EGFP} control. Además, la IMF también aumentó en los ratones STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} AOM/DSS en comparación con los STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} control, y se encontró que la mayor IMF de FoxP3 correspondía a las Tregs de ratones STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} AOM/DSS. Sin embargo, estos aumentos no fueron significativos (**Figura 19A**). Asimismo, la mayor IMF de CD25 se presentó en las Tregs de ratones STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} AOM/DSS, aunque tampoco fue significativa (**Figura 19B**). Además, se observó que la IMF de PD-1 fue similar en las Tregs de los ratones FoxP3^{EGFP} control, FoxP3^{EGFP} AOM/DSS y STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} control, y aumentó en las Tregs de ratones STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} AOM/DSS. Sin embargo, este aumento no fue significativo, y las desviaciones estándar de estos datos es muy alta, por lo que es necesario aumentar la n realizado más experimentos (**Figura 19C**). Finalmente, la IMF de CD103 siguió la misma tendencia que la IMF de FoxP3, aunque la desviación estándar de estos datos también es muy alta. En conclusión, se observa un aumento no significativo en la IMF de CD25 en ratones STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} AOM/DSS lo cual indica que hay más células activadas en ratones *knockout* de STAT6 en etapas tempranas de CAC, y es necesario realizar más ensayos para determinar si hay una diferencia en la IMF de FoxP3, PD-1 y CD103 para determinar si además estas tienen un fenotipo más o menos supresor.

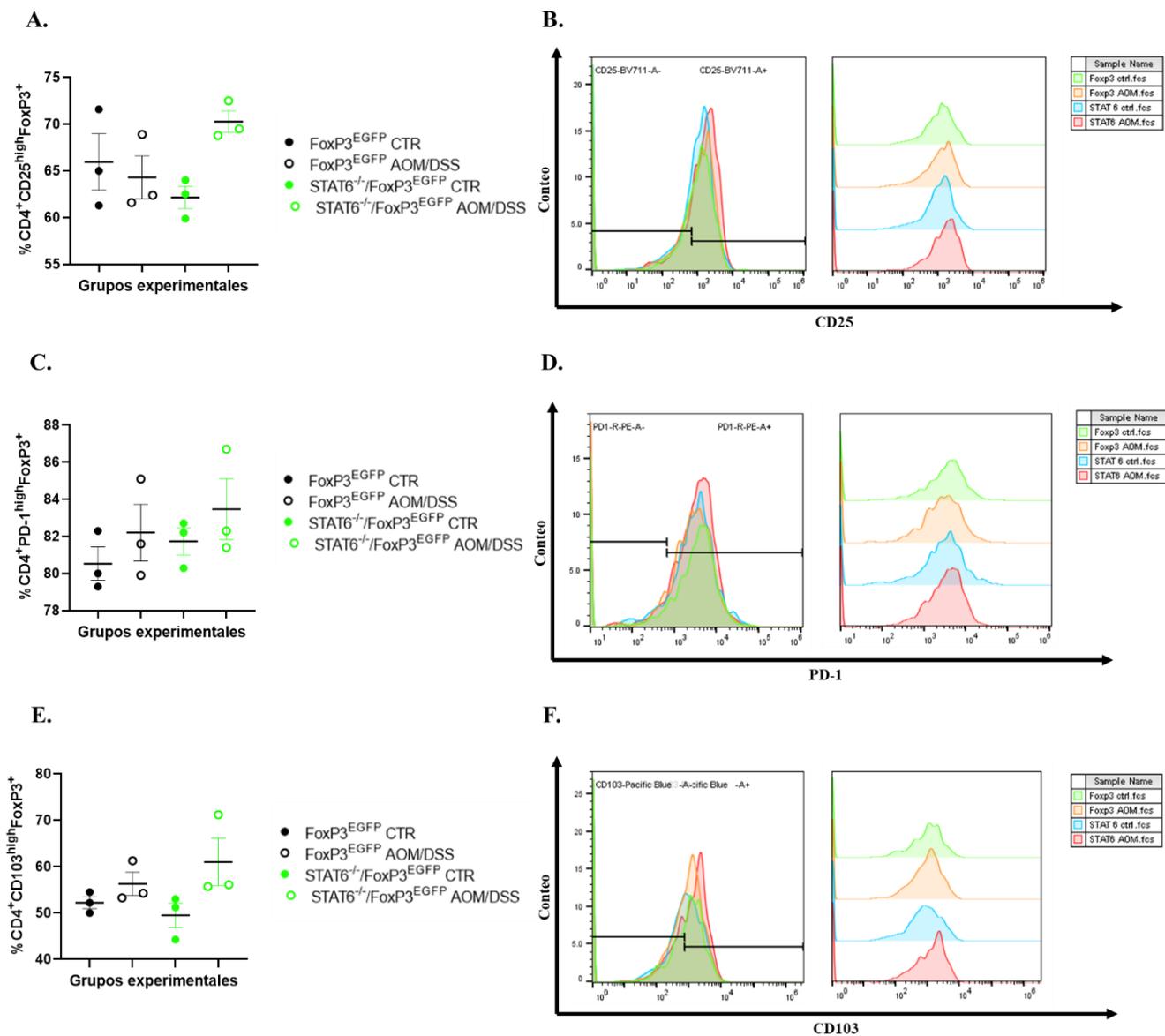


Figura 18. Caracterización de Tregs de ratones FoxP3^{EGFP} y STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} en etapas tempranas de desarrollo de CAC.

(A) Porcentaje de células CD4⁺FoxP3⁺CD25^{high}; (B) y representativos de las poblaciones de células CD4⁺FoxP3⁺CD25^{high}; (C) Porcentaje de células CD4⁺FoxP3⁺PD-1^{high}; (D) y representativos de las células CD4⁺FoxP3⁺PD-1^{high}; (E) Porcentaje de células CD4⁺FoxP3⁺CD103^{high}; y (F) representativos de las células CD4⁺FoxP3⁺CD103^{high} presentes en el bazo de ratones FoxP3^{EGFP} y STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} con y sin tratamiento de CAC. Los datos se expresan como la media \pm SEM. n (ratones por grupo) = 3.

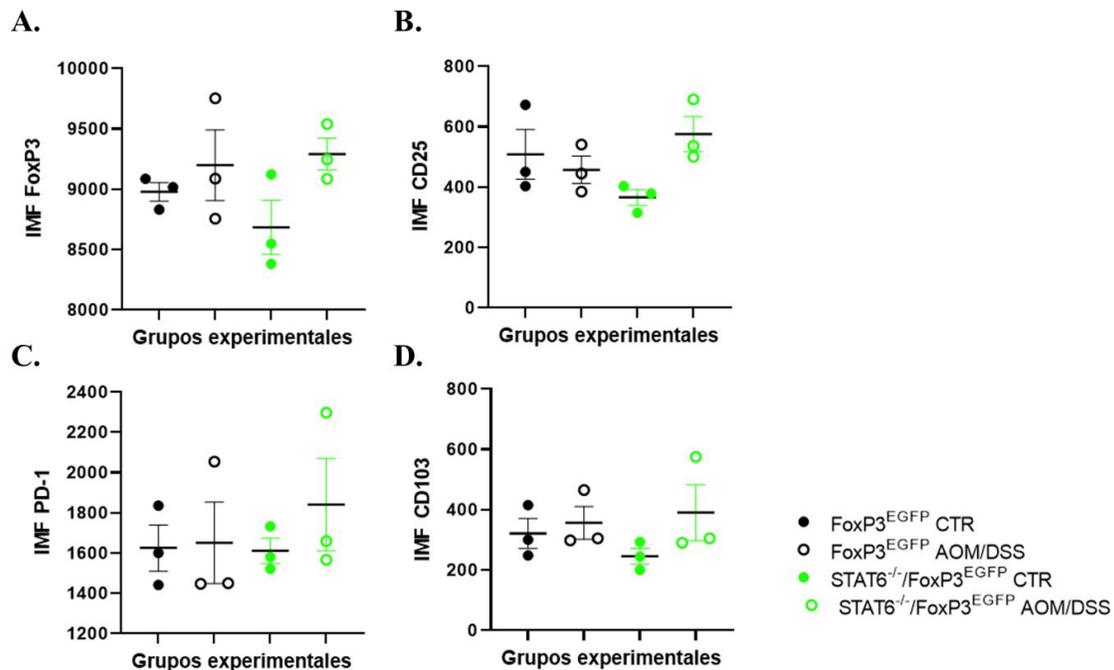


Figura 19. IMF de moléculas de superficie de Tregs en ratones FoxP3^{EGFP} y STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} en etapas tempranas de desarrollo de CAC

(A) IMF de FoxP3 en Tregs; (B) IMF de CD25 en Tregs; (C) IMF de PD-1 en Tregs; (D) IMF de CD103 en Tregs. Los datos se expresan como la media \pm SEM. n (ratones por grupo) =3.

7.5. Las Tregs provenientes de ratones STAT6^{-/-} en tratamiento de CAC tienen mayor capacidad supresora sobre linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺

Para determinar si las Tregs provenientes de ratones deficientes en STAT6 tienen una actividad que pueda estar modulando el ambiente inflamatorio que se requiere para el desarrollo del CAC, se realizó un ensayo *in vitro* de evaluación de su capacidad supresora. Se utilizaron ratones FoxP3^{EGFP} y STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} en etapas tempranas del desarrollo del CAC, de los que se obtuvieron primero los linfocitos T CD4⁺ totales por separación magnética, y después las Tregs mediante *cell sorting* con base en su expresión de EGFP. Como se observa en la **Figura 20**, la pureza de la separación magnética es bastante alta; más del 95% de las células obtenidas mediante el “CD4⁺ T Cell Isolation Kit, mouse” marcaron con anticuerpos anti-CD4 (**Figura 20A**). El rendimiento del *cell sorter* BD Influx también fue bastante alto; como se observa en la **Figura 20B**, el porcentaje de

células seleccionadas que expresaron la proteína verde fluorescente fue de casi el 100%. 72 horas después del cocultivo de las Tregs con esplenocitos totales marcados con CellTrace Violet, se adquirieron las muestras en el citómetro de flujo y se analizaron los datos. Utilizando una muestra de esplenocitos que no estuvieron en cultivo con Tregs, y en ausencia de anti-CD3, se halló la población de células que no se dividieron en las 72 horas de cultivo. En primer lugar, se obtuvieron las *singlets* a partir de células totales; después se seleccionaron de linfocitos a partir de *singlets*; posteriormente, se seleccionaron las células marcadas con CTV; se identificaron linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺; por último, a partir del *gate* de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, individualmente, se obtuvo el histograma de fluorescencia del CTV. Debido a que estos esplenocitos se cultivaron sin anti-CD3, el pico mayor del histograma corresponde a las células no proliferantes (**Figura 21A**). Para la identificación de la proliferación basal se utilizó una muestra de esplenocitos cultivados con anti-CD3 (**Figura 21B**). La identificación de estas poblaciones en esta muestra fue la utilizada para analizar las muestras del ensayo de proliferación.

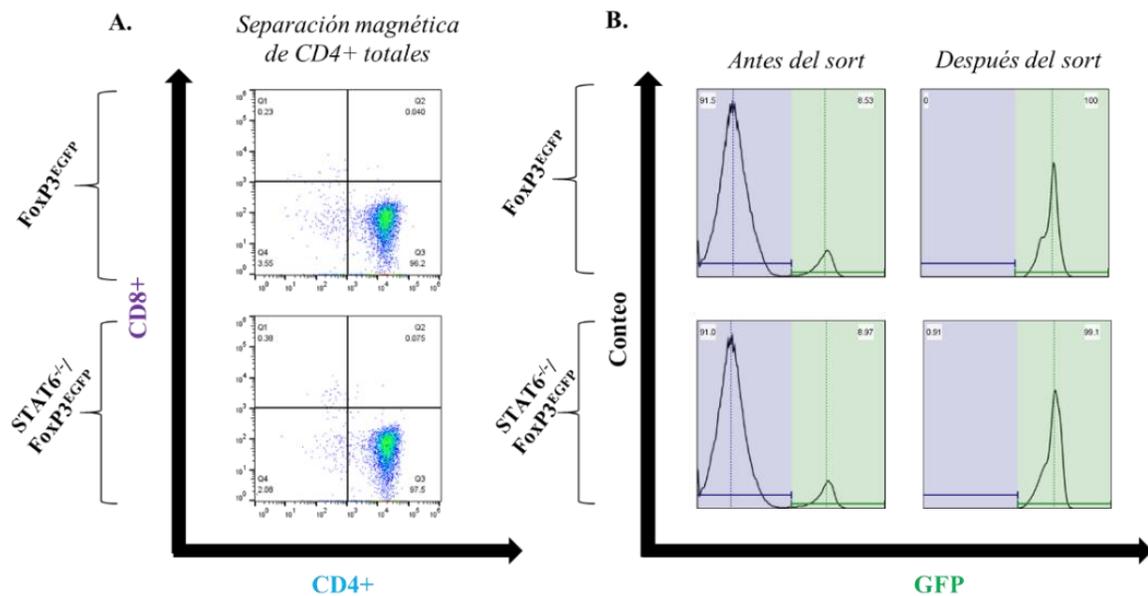


Figura 20. Pureza de las muestras obtenidas mediante separación magnética y cell sorting.

(A). Dot plots representativos de células obtenidas mediante separación magnética utilizando el "CD4⁺ T Cell Isolation Kit, mouse". El Q3 corresponde a la fracción de linfocitos positivos para CD4⁺ y negativos para CD8⁺.

(B). Pureza del *cell sorting*. Se observa que antes del *sorting* la población celular positiva para EGFP es cercana al 9%, mientras que después del *sorting* este porcentaje sube al 100%.

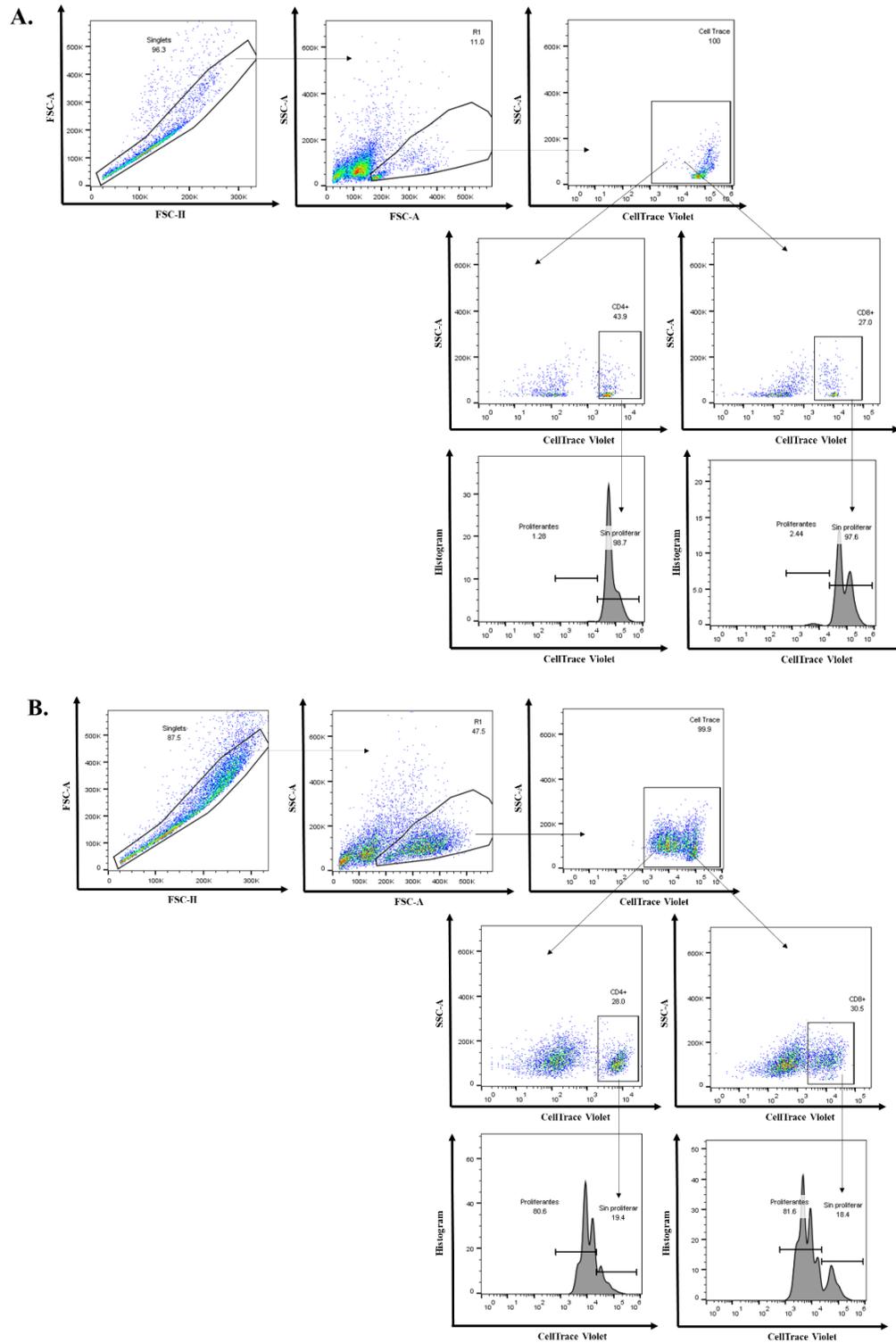


Figura 21. Estrategia para el análisis de la supresión inducida por Tregs de ratones $FoxP3^{EGFP}$ y $STAT6^{-/-}$ / $FoxP3^{EGFP}$ en tratamiento de inducción CAC, sobre la proliferación de células totales de bazo.

(A). Identificación de células no proliferantes a partir de esplenocitos marcados con CTV y sembrados en pozos sin anti-CD3. (B). Identificación de células proliferantes y no proliferantes en cultivo.

Se encontró que cuando los esplenocitos marcados con CTV se cultivan sin anti-CD3⁺ se observa un pico a la derecha del histograma; este pico concentra a los linfocitos T CD4⁺ que no se dividieron y que por lo tanto tienen una mayor fluorescencia de CTV. Por el contrario, cuando los esplenocitos se cultivan con anti-CD3 y sin Tregs, hay una proliferación de las CD4⁺ del 80%, valor que se toma como la proliferación basal. En el histograma, estos CD4⁺ proliferantes se pueden ver como picos; el pico a la izquierda de la G0 correspondería a la G1, y el de su izquierda, a la G2, etcétera (**Figura 22A**). Cuando se grafican los porcentajes de CD4⁺ proliferantes en el cocultivo, el cocultivo con Tregs provenientes de ratones FoxP3^{EGFP} con tratamiento de AOM/DSS tuvo una supresión en la proliferación de CD4⁺ en la proporción 1:1, supresión que desaparece en las demás proporciones. Cuando las Tregs provienen de ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}, la supresión de la proliferación aumenta al doble en la proporción 1:1, restableciéndose parcialmente en las demás diluciones, pero sin alcanzar el porcentaje de proliferación basal (**Figura 22B**). La supresión de la proliferación de los CD4⁺ se puede observar en el tamaño de los picos de las generaciones y en el número de generaciones celulares. De esta manera, se observa que en la dilución 0:1 el pico de la G0 es pequeño y contiene al 20% de CD4⁺ positivos para CTV. Además, los picos de la G1 y G2 son grandes, siendo el mayor el de la G2, lo cual indica que la mayoría de los CD4⁺ se encuentran en esta generación celular. Sin embargo, cuando la proporción del cocultivo es 1:1 y se emplean Tregs de ratones FoxP3^{EGFP}, se observa que el pico de la G0 abarca ahora al 32% de CD4⁺ positivos para CTV; además, los picos de la G1 y G2 disminuyen su tamaño. Esta supresión va disminuyendo en las demás proporciones; además, se empieza a ver un pico de G3 (**Figura 22C**). Ahora bien, cuando las Tregs provienen de ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}, se observa que cuando la proporción es 1:1, el pico de la G0 abarca ahora al 37% de CD4⁺ positivos para CTV; además, los picos de la G1 y G2 también disminuyen su tamaño. En las demás diluciones se observa un aumento del porcentaje de CD4⁺ proliferantes, pero sin llegar a la proliferación basal. En conjunto, estos resultados indican que hay una disminución en la capacidad de proliferación de CD4⁺ sobre todo en la proporción 1:1, y que esta supresión de la proliferación es mayor para las Tregs provenientes de ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}.

Por otro lado, se encontró que cuando los esplenocitos marcados con CTV se cultivan sin anti-CD3⁺ se observa un pico a la derecha del histograma; este pico concentra a los linfocitos T CD8⁺ que no se dividieron. Por el contrario, cuando los esplenocitos se cultivan con anti-CD3 y sin Tregs, hay una proliferación de las CD8⁺ del 98%, valor que se toma como la proliferación basal. En el histograma, estos CD8⁺ proliferantes se pueden ver como picos; el pico a la izquierda de la G0 correspondería a la G1, y el de

su izquierda, a la G2, etcétera. Se observan 4 picos en total (**Figura 23A**). Cuando se grafican los porcentajes de CD8⁺ proliferantes en el cocultivo, el cocultivo con Tregs provenientes de ratones FoxP3^{EGFP} con tratamiento de AOM/DSS no tuvo una supresión de la proliferación de CD8⁺ en la proporción 1:1 muy grande, aumentando inclusive su proliferación en las otras proporciones. En cambio, cuando las Tregs son de ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}, existe una supresión de la proliferación de CD8⁺ en la proporción 1:1, la cual se restablece parcialmente en las demás diluciones, pero sin alcanzar el porcentaje de proliferación basal (**Figura 23B**). Así como con los CD4⁺, la supresión de la proliferación de los CD8⁺ se puede observar en el tamaño de los picos de las generaciones y en el número de generaciones celulares. De esta manera, se observa que en la dilución 0:1 el pico de la G0 es mediano y contiene al 28% de CD8⁺ positivos para CTV. Además, los picos de la G2 y G3 son grandes, siendo el mayor el de la G2, lo cual indica que la mayoría de los CD8⁺ se encuentran en esta generación celular. Cuando la proporción del cocultivo es 1:1 y se emplean Tregs de ratones FoxP3^{EGFP}, se observa que el pico de la G0 es más grande y abarca ahora al 29% de CD8⁺ positivos para CTV; los picos de la G2 y G3 no disminuyen su tamaño, pero disminuye la G4. En las demás proporciones se ve un aumento de la proliferación de CD8⁺, con un tamaño de G2 y G3 grande, pero sin G4. Por otro lado, cuando las Tregs provienen de ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}, se observa que cuando la proporción es 1:1, el pico de la G0 abarca al 32% de CD8⁺ positivos para CTV; además, el pico de la G3 disminuye de tamaño y desaparece la G4. En las demás diluciones se observa un aumento del porcentaje de CD8⁺ proliferantes, pero sin llegar a la proliferación basal (**Figura 23C**). En conjunto, estos resultados indican que hay una disminución en la capacidad de proliferación de CD8⁺ cuando las Tregs provienen de ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}. Sin embargo, esta supresión de la proliferación es baja.

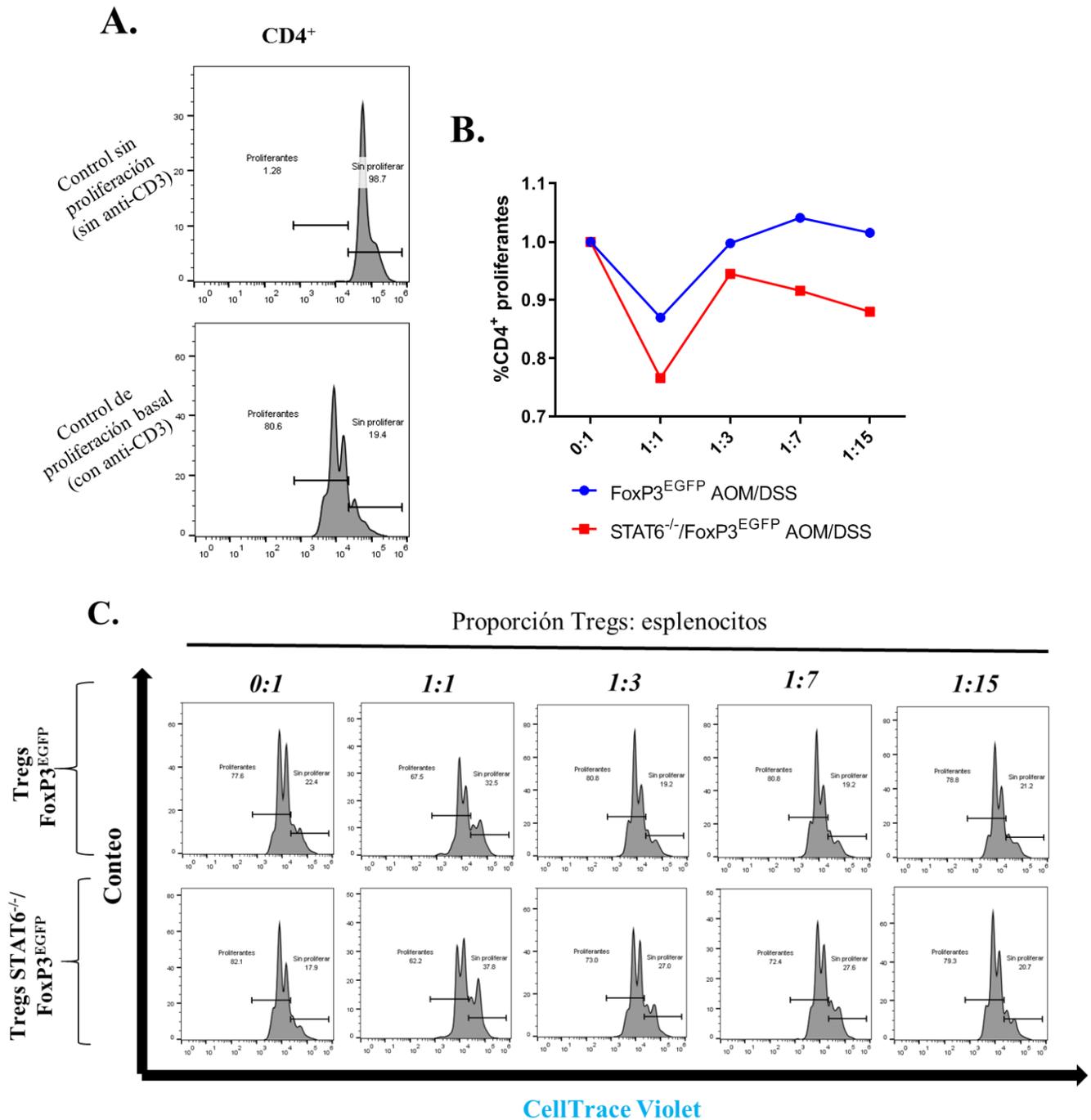


Figura 22. Supresión de la proliferación celular de linfocitos T CD4⁺ por parte de Tregs de ratones en tratamiento de inducción de cáncer de colon asociado a colitis.

(A). Controles de proliferación de linfocitos T CD4⁺. (B) Supresión de la proliferación de Tregs provenientes de ratones FoxP3^{EGFP} y STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} en tratamiento de CAC sobre linfocitos T CD4⁺. Los porcentajes de células proliferantes se normalizaron en las diferentes diluciones con el valor de proliferación de CD4⁺ en la dilución 0:1. (B) Histogramas representativos de la proliferación de CD4⁺ en cultivos con Tregs de ratones FoxP3^{EGFP} y STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} en tratamiento de CAC. n = 2 réplicas técnicas por dilución.

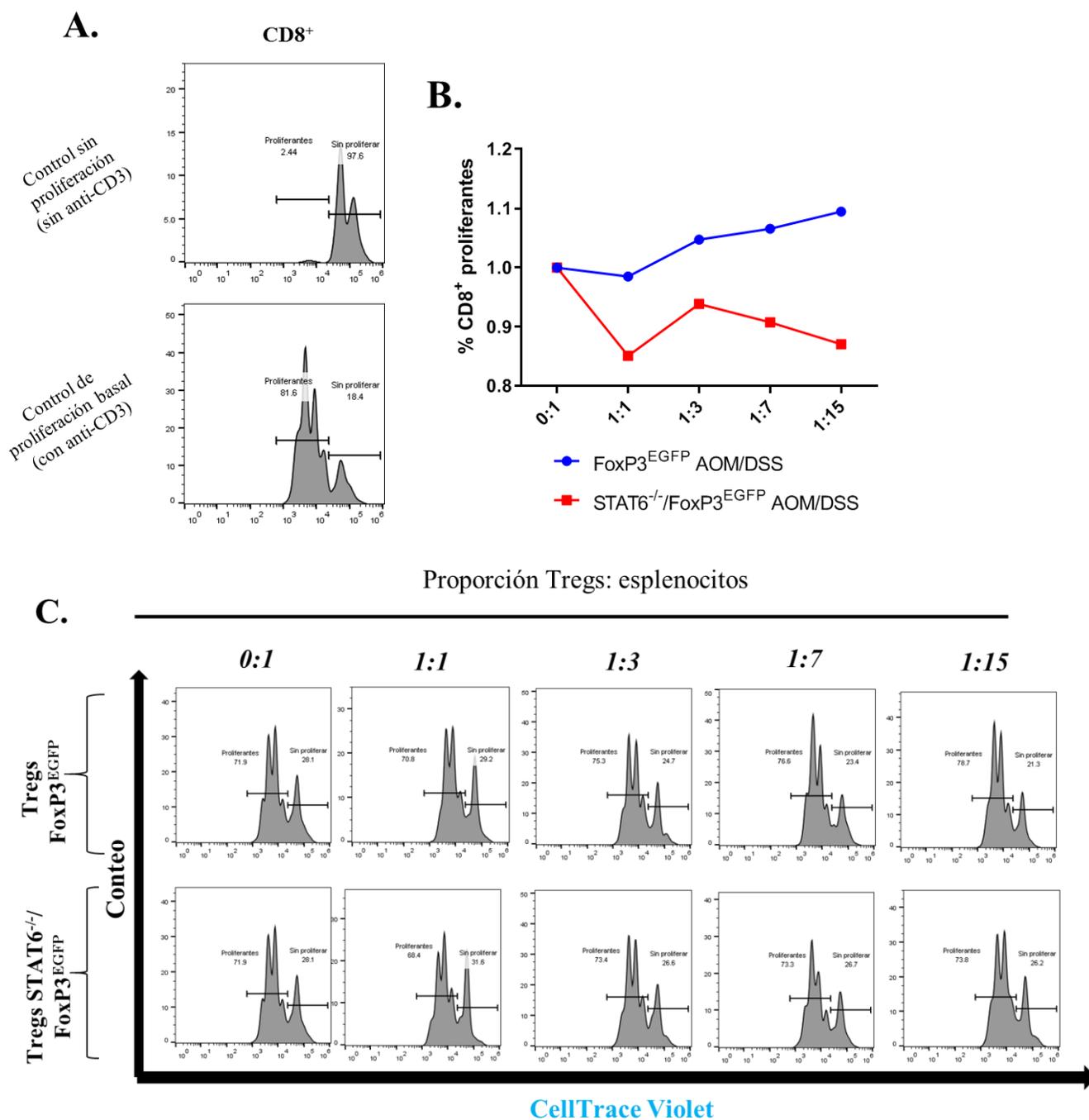


Figura 23. Supresión de la proliferación celular de linfocitos T CD8⁺ por parte de Tregs de ratones en tratamiento de inducción de cáncer de colon asociado a colitis.

(A). Controles de proliferación de linfocitos T CD8⁺. (B) Supresión de la proliferación de Tregs provenientes de ratones FoxP3^{EGFP} y STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} en tratamiento de CAC sobre linfocitos T CD8⁺. Los porcentajes de células proliferantes se normalizaron en las diferentes diluciones con el valor de células proliferantes CD8⁺ en la dilución 0:1. (B) Histogramas representativos de la proliferación de CD8⁺ en cocultivos con Tregs de ratones FoxP3^{EGFP} y STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} en tratamiento de CAC. n = 2 réplicas técnicas por dilución.

8. Discusión

El estudio del ambiente inflamatorio en el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis es importante para entender las causas de este padecimiento. Entre las poblaciones celulares más relevantes para modular la respuesta inmune en el CAC se encuentran las Tregs. Se ha visto que el aumento del porcentaje de Tregs en ratones *knockout* de STAT6 durante las etapas tempranas disminuye el desarrollo de la enfermedad. Por esta razón se estudió de qué manera STAT6 influye en la diferenciación, función y/o activación de Tregs durante el CAC experimental. Sin embargo, el estudio de las Tregs en el laboratorio está condicionado a varios aspectos. Uno de ellos es que FoxP3 es una proteína intracelular que, para su estudio mediante citometría de flujo, requiere permeabilización celular, después de la cual las células que expresan este factor de transcripción ya no sirven para realizar ensayos funcionales. Con el objetivo de analizar a las Tregs en el proceso de la carcinogénesis del CAC se caracterizó a la cepa de ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}. Como se observó en este estudio, los ratones de la cepa STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} son, en efecto, *knockout* en STAT6 y expresan EGFP junto a FoxP3, lo cual hace posible su estudio funcional mediante la posibilidad de aislar las Tregs mediante *cell sorting* utilizando la fluorescencia de la EGFP.

Se han desarrollado diferentes cepas de ratones para el estudio *in vivo* de las Tregs mediante el rastreo de FoxP3^{EGFP} con fluorocromos. Esto incluye el direccionamiento de genes *knock-in*, diseñados para expresar un fluorocromo ya sea como una proteína de fusión con FoxP3 o desde un sitio interno de entrada de ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés) río abajo de la región codificante de FoxP3. Otra estrategia es la transgénesis de FoxP3 empleando cromosomas artificiales bacterianos (BAC, por sus siglas en inglés) que contienen un gen codificante de fluorocromo insertado (110). En los dos primeros casos, se garantiza la detección precisa de FoxP3 con base en los fluorocromos, a diferencia de la estrategia que utiliza el transgén FoxP3-BAC^{GFP}, pues en este último caso el factor de transcripción FoxP3 y la proteína fluorescente no se encuentran ligados físicamente (111). La cepa FoxP3^{EGFP} usada para generar a los ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} fue generada mediante la inserción de un cassette de ADN compuesto por una secuencia de entrada ribosomal interna (IRES) unida a secuencias EGFP inmediatamente corriente abajo del codón de

terminación de la traducción FoxP3 (78). Las células provenientes de esta cepa con expresión EGFP⁺ correspondientes a poblaciones CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}, es decir a las Tregs.

Como se ha mencionado previamente, además de inhibir la apoptosis, y promover la proliferación y migración de células epiteliales durante el desarrollo del cáncer, STAT6 es importante para regular la función de las células del sistema inmune. Para estudiar el rol de STAT6 sobre las Tregs en el desarrollo del CAC se usa la cepa transgénica STAT6^{-/-}. Los ratones STAT6^{-/-} cuentan con un cassette de selección de neomicina insertado en el gen de STAT6, lo cual impide la expresión de este factor de transcripción (95). Sin embargo, hay que tener en cuenta que una limitación del modelo murino *knockout* es que en el ratón STAT6^{-/-} todas las células son deficientes en esta molécula, por lo que se hace difícil estudiar *in vivo* solamente el papel de las Tregs en el CAC en ausencia de STAT6 usando este modelo. Por esta razón se recurrió a varios experimentos *in vitro* para estudiar el papel de STAT6 en las Tregs, y su posible rol en el desarrollo del CAC.

Los resultados de la diferenciación *in vitro* de linfocitos T CD4⁺ naïve provenientes de ratones STAT6^{-/-} a Tregs sugieren no hubo cambios en la capacidad de diferenciación (entendida como el porcentaje de células CD4⁺ FoxP3⁺) y en el porcentaje de Tregs activadas, en cultivos de linfocitos T CD4⁺ naïve provenientes de ratones STAT6^{-/-} expuestos a IL-2, TGF-β y ácido holo-transretinoico, en comparación con los cultivos de células provenientes de ratones WT. Estudios *in vitro* han demostrado que la expresión de FoxP3 en iTregs derivadas de células T CD4⁺ naïve WT puede ser obstaculizada por la unión de STAT6 a su sitio promotor, lo cual genera un fenotipo de Tregs que pierde la expresión de FoxP3 en presencia de IL-4 e IL-13 (101). Estos datos de la literatura nos hicieron pensar en un principio que, en células T CD4⁺ naïve provenientes de ratones STAT6^{-/-} en donde STAT6 no se pudiera unir al promotor de FoxP3, debería haber una mayor expresión de FoxP3 y por lo tanto mayor diferenciación a Tregs. Sin embargo, nuestros datos no coinciden con esta suposición. Una explicación es que en nuestro montaje experimental no se incluyó IL-4 e IL-13, que son las citocinas encargadas de activar a STAT6. Se han reportado niveles altos de IL-4 en pacientes con diferentes tipos de cáncer; IL-4 es producida por las células T de tipo 2 (Th2), basófilos, mastocitos y eosinófilos activados, y muchas de estas células se encuentran en el microambiente tumoral (112). Por lo tanto, es posible que sea p-STAT6 la molécula que se una al sitio regulador en

el promotor de FoxP3, promoviendo la pérdida de la expresión de FoxP3 en las iTregs. De esta manera, debido a que tanto en el cultivo de linfocitos T CD4⁺ naïve WT y el cultivo de linfocitos T CD4⁺ naïve STAT6^{-/-} p-STAT6 estaba ausente, el porcentaje de diferenciación a Tregs fue el mismo, pues no hubo pérdida de la expresión de FoxP3. Estos resultados sugieren, entonces, que la ausencia de STAT6 no es suficiente para observar diferencias en la capacidad de diferenciación de las iTregs.

Por otro lado, en la diferenciación *in vitro* de linfocitos T CD4⁺ naïve provenientes de ratones STAT6^{-/-} en etapas tempranas de CAC se encontró que en los cultivos de linfocitos T CD4⁺ naïve provenientes de ratones deficientes en STAT6 hubo el triple del porcentaje de Tregs totales y Tregs activadas que en los cultivos de células provenientes de ratones WT con tratamiento de AOM/DSS. En el montaje experimental de este ensayo tampoco se incluyeron IL-4 o IL-13, por lo que la diferencia en el porcentaje de Tregs diferenciadas no se debe a p-STAT6. Una posible explicación para esta diferencia es que las células T CD4⁺ naïve aisladas de ratones STAT6^{-/-} en etapas tempranas de CAC, es decir, en un momento de inflamación crónica, tienen diferentes modificaciones epigenéticas que las células provenientes de ratones WT AOM/DSS. Las modificaciones epigenéticas son importantes para la diferenciación de las Tregs (113). Por ejemplo, la delección de la HMT (histona metiltransferasa, por sus siglas en inglés) MLL4 en ratones da como resultado una disminución de la inducción de FoxP3 en células T CD4⁺ naïve durante su desarrollo, con un aumento de células CD4⁺CD25⁺FoxP3^{-/-}, lo que demuestra la importancia de esta molécula de regulación epigenética para el establecimiento de la estructura de cromatina de FoxP3 en precursores de Tregs (114). Por otro lado se ha reportado que durante la inflamación las Tregs pueden perder la expresión de FoxP3 y polarizarse a células Th17 (115), y que en la capacidad de las Tregs para polarizarse en respuesta a las señales inflamatorias del microambiente son importantes las alteraciones epigenéticas subyacentes (116). Por ejemplo, las citocinas inflamatorias como la IL-6 pueden promover la actividad de DNMT (metiltransferasas de ADN, por sus siglas en inglés) e HDAC (histona deacetilasas) para provocar la pérdida de la expresión del gen FoxP3, y modular los complejos PRC (complejos de represión polycomb) para deprimir los loci que codifican los genes inflamatorios (117) (118). Debido a que la expresión de FoxP3 depende de las modificaciones epigenéticas, y que durante la inflamación puede haber modificaciones en moléculas de regulación epigenética, sería interesante estudiar en un contexto epigenético la relación entre la expresión de FoxP3 y la ausencia de STAT6, particularmente en condiciones inflamatorias.

La expresión de FoxP3 está relacionada con el establecimiento de un patrón de hipometilación CpG específico de las Tregs y que inicia con la estimulación del TCR (119). La hipometilación de CpG propia de las Tregs comienza en el timo y continúa en la periferia aún antes de que empiece la expresión de FoxP3, y es necesaria para que las Tregs adquieran una expresión génica de FoxP3 estable, estabilidad en el linaje y una actividad supresora total (119). Unas de las regiones del genoma modificadas epigenéticamente, y que contribuyen a la adquisición del fenotipo Tregs, se conocen como TSDR (región desmetilada específica de Tregs, por sus siglas en inglés). Se ha observado que la desmetilación de TSDR de FoxP3 está relacionada a una mayor expresión del gen en células T CD4⁺ naïve (119). En los TSDR se pueden encontrar secuencias de unión a diferentes factores de transcripción, como Ets1 y Creb1, los cuales se unen a sus sitios objetivo de manera dependiente de la desmetilación activando sus genes objetivo a través de la unión directa a los TSDR desmetilados (120). En la región reguladora de FoxP3, en donde se unifica el sitio de unión de STAT6, se encuentra el TSDR/CNS2, que en linfocitos T CD4⁺ naïve se encuentra hipometilado. La desmetilación de TSDR/CNS2 de FoxP3 es un requisito para la diferenciación de Tregs y puede ser empleada para la estabilización de la expresión de FoxP3 en Tregs cultivadas *in vitro* (121). Por lo tanto, en próximos experimentos sería interesante estudiar los niveles de desmetilación de TSDR/CNS2 del gen de FoxP3 en linfocitos T CD4⁺ naïve provenientes de ratones STAT6^{-/-} Y WT.

Durante la carcinogénesis, las pTregs y no las tTregs son la población más abundante en el microambiente tumoral, y juegan diversos roles, desde proteger al tumor de la respuesta antitumoral, hasta proteger al organismo de una respuesta inflamatoria exacerbada (122). Por ende, los estudios *in vitro* con iTregs son una buena forma de tener un primer vistazo de la forma en la que STAT6 modula las propiedades de las Tregs. Sin embargo, este planteamiento experimental puede ser lejano de la realidad que ocurre con las Tregs en el microambiente tumoral durante el CAC. Por esto, se recalca la importancia de analizar las Tregs en un contexto *in vivo* utilizando el modelo murino de inducción de CAC con AOM/DSS.

Como se observó en el presente estudio, los ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} en tratamiento con AOM/DSS desarrollan menos tumores que los ratones FoxP3^{EGFP}, y presentan una menor pérdida de

peso e índice de daño que los ratones FoxP3^{EGFP}, lo cual concuerda con las observaciones previas del grupo de investigación (100). Estos ratones presentan además un porcentaje de linfocitos T CD8⁺ significativamente menor y un porcentaje de Tregs CD25^{high} en el bazo más elevado, así como una mayor IMF de CD25 en las Tregs, en comparación con los ratones FoxP3^{EGFP} AOM/DSS y los grupos experimentales sin tratamiento de CAC, aunque estos últimos resultados no fueron estadísticamente significativos. De manera interesante, no se reportó un aumento en el porcentaje de células CD4⁺FoxP3⁺ en ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} AOM/DSS y FoxP3^{EGFP} AOM/DSS, que sí se había reportado previamente, en el cual las Tregs en ratones STAT6^{-/-} en etapas tempranas de CAC se duplicaban en comparación con ratones WT (100). Esto puede deberse a problemas en el modelo murino reportero FoxP3^{EGFP}. Se ha observado que, en ratones reporteros generados mediante una proteína de fusión con FoxP3 puede haber aberraciones en la inducción de tTregs y de iTregs mediada por TGF- β *in vitro* (123). Esta aberración puede deberse a una transcripción deficiente realizada por la proteína de fusión FoxP3-GFP, probablemente debido a alteraciones en las interacciones moleculares de este factor de transcripción con cofactores transcripcionales específicos (123). En los ensayos de diferenciación realizados para esta tesis se utilizaron ratones STAT6^{-/-} que no eran FoxP3^{EGFP}, y nosotros sí encontramos una diferencia en la capacidad de diferenciación de células T CD4⁺ naïve STAT6^{-/-} en tratamiento de CAC, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (123). Por otro lado, las interacciones entre FoxP3 y proteínas involucradas en la modificación epigenética (como acetilasas y ubiquitinasas) contribuyen en la estabilidad de las Tregs. La pérdida de la modificación epigenética impulsada por Foxp3^{GFP} puede conducir a la inestabilidad de Tregs en modelos de enfermedad autoinmune (124). Sin embargo, debido a que en nuestro modelo de CAC sí se observó un aumento en las Tregs activadas en ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}, es necesario ahondar en las razones por las cuales no se observó el mismo aumento de Tregs totales que en experimentos previos realizados con ratones STAT6^{-/-}. Una posible explicación es una diferencia en el fondo genético entre ratones STAT6^{-/-} y STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}, pues los ratones doble transgénicos fueron generados mediante cruza selectivas en el laboratorio. Se ha reportado que el fenotipo de un transgén determinado en ratones está modulado por los antecedentes genéticos de la cepa endogámica en la que se mantiene el transgén (125). Este efecto es atribuible a los llamados genes modificadores, que actúan en combinación con el gen causante, y puede ser una limitante en el momento de analizar resultados de experimentos *in vivo*.

Debido a que las Tregs tienen capacidad inmunosupresora, pueden actuar sobre diferentes tipos celulares. En el caso de la respuesta inmune mediada por Tregs durante el CAC, se identifican dos poblaciones celulares importantes para el desarrollo de la enfermedad. La primera es la respuesta inflamatoria desencadenante de la inflamación crónica en el colon, determinante para el desarrollo tumoral. La segunda es la inmunidad antitumoral, encargada de las respuestas citotóxicas dirigidas a las células cancerosas; en esta son importantes células como los linfocitos T CD8⁺, las células NK, y cascadas de señalización como PD-1/PD-L1 (126). Las Tregs se infiltran abundantemente en los tejidos tumorales, lo que a menudo se asocia con un mal pronóstico en pacientes con cáncer (127). En el presente trabajo de investigación se maneja la hipótesis que un buen o mal pronóstico depende de la etapa del CAC donde se presenta el aumento de Tregs. Previamente, en el grupo de investigación se observó que, en ratones STAT6^{-/-}, la depleción de la población de Tregs en etapas tempranas del CAC mediante la aplicación del anticuerpo PC61 resulta en la eliminación del efecto protector de estos ratones al desarrollo tumoral (100). Por lo tanto, el mayor porcentaje de Tregs en etapas tardías del CAC se relaciona a un mal pronóstico, pues inhibe las respuestas inmunes antitumorales; en cambio, en etapas tempranas podría favorecer el control de la inflamación crónica que promueve el CAC.

En nuestros experimentos se encontró un aumento en el porcentaje de Tregs CD25^{high} provenientes de ratones STAT6^{-/-}FoxP3^{EGFP} en etapas tempranas del CAC, en comparación con los demás grupos experimentales. Las Tregs que expresan CD25^{high} se conocen como Tregs activadas. CD25 es una molécula muy importante para la función reguladora de las Tregs, pues acapara la citocina IL-2, la cual es necesaria para la activación y proliferación de los linfocitos. Las Tregs que expresan mucho CD25 responden a dosis bajas de IL-2, lo que limita la inflamación (66). Desde mucho tiempo se ha identificado que las Tregs con alta expresión de CD25 pueden proteger a los ratones inmunodeficientes de la colitis crónica luego de la transferencia adoptiva Tregs CD25⁺ (128) (129). Por otro lado, se observó un ligero aumento no significativo en el porcentaje de Tregs PD-1^{high} y CD103^{high}, el cual deberá ser comprobado en futuros experimentos para aumentar el número de datos. Sin embargo, estos resultados preliminares podrían sugerir un aumento en la expresión de moléculas de supresión en Tregs. CD103 es un marcador bien establecido para Tregs murinas efectoras/similares a células de memoria, que han sido activadas *in vivo* por antígeno (130). CD103 es importante para localizar las células en el epitelio intestinal, además, se ha demostrado que una

transferencia de Tregs CD103⁺ es capaz de mejorar la inflamación en un modelo murino de injerto de piel (130). En este mismo modelo las Tregs CD103⁺ suprimieron fuertemente la proliferación de células T CD4⁺, indujeron la apoptosis de las células T CD4⁺ y B activadas *in vivo* y redujeron significativamente las células T y B patógenas. Sin embargo, la información relacionada a las Tregs CD103⁺ en el contexto de enfermedades inflamatorias intestinales es poca, pues esta molécula se ha estudiado principalmente en cuanto al rol de las DC 103⁺ en la inducción de pTregs en presencia de TGF-β. Por último, se ha relacionado a las Tregs con alta expresión de PD-1 a la contribución de la progresión de tumores malignos (131). En etapas avanzadas del cáncer, el bloqueo de PD-1 en las Tregs da como resultado su expansión y mejora su actividad inmunosupresora, promoviendo el crecimiento tumoral (131). Sin embargo, en enfermedades inflamatorias intestinales, la unión de PD-L1 a PD-1 durante la generación de pTregs a partir de células T convencionales es fundamental para el mantenimiento de la expresión de FoxP3 a largo plazo y la regulación *in vivo* de las respuestas inmunitarias contra la colitis murina e injertos (132). Además, la unión de PD-L1 a PD-1 en las Tregs lleva a su proliferación (131). Finalmente, los datos preliminares de IMF de FoxP3 sugieren una alta expresión de FoxP3 en Tregs provenientes de ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} en etapas tempranas del tratamiento de CAC, sin embargo se debe aumentar la n de estos datos. La transcripción de FoxP3 altamente sostenida a lo largo del tiempo induce la diferenciación de eTregs (Tregs efectoras) (45), por lo que un aumento en la IMF de FoxP3 podría relacionarse a un aumento en la expresión CD25, PD-1 y CD103 en ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}. Sin embargo, sólo se podrá concluir esto hasta cuando se tengan más datos.

Por último, el ensayo de supresión *in vitro* consistió en la evaluación funcional de la capacidad supresora de Tregs provenientes de ratones en etapas tempranas del CAC. Los resultados de la caracterización del fenotipo de Tregs durante el tratamiento de inducción de CAC sugieren un aumento de la población de Tregs con fenotipo activado (CD25^{high}) en ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} AOM/DSS, en comparación con los ratones FoxP3^{EGFP} AOM/DSS. Una hipótesis que tenemos es que estas células podrían proteger de la inflamación en etapas tempranas del CAC. Una forma de protección podría involucrar una supresión en la actividad de los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺. Con el planteamiento experimental del ensayo de supresión se observó una disminución en la proliferación de linfocitos T CD4⁺ como T CD8⁺ de las Tregs provenientes de ratones STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}, observable

principalmente en las proporciones 1:1 de Tregs vs esplenocitos. Sin embargo, hay que resaltar varios aspectos del ensayo que pueden hacer difícil el análisis de los datos de supresión. Varios investigadores han resaltado la problemática que surge de emplear anti-CD3 en los ensayos de supresión. En el planteamiento de nuestro ensayo, en anti-CD3 se acopló a la placa de cultivo y su fin fue promover la proliferación de los esplenocitos. Sin embargo, la estimulación de células T por anticuerpos acoplados a superficies sólidas puede dar como resultado una señal cualitativamente distinta de la estimulación inducida por el antígeno presentado por las APC *in vivo*, o incluso por la estimulación *in vitro* con anti-CD3 soluble en presencia de APC (133). En ensayos de supresión de Tregs *in vitro* se ha encontrado muy difícil suprimir la estimulación de las células T inducida por anti-CD3 asociado a superficies (133). Estas observaciones, sumadas a que en nuestro ensayo los esplenocitos se cultivaron con anti-CD3 unido a la placa de cultivo por 12 horas antes de que fueran agregadas las Tregs (por cuestiones de logística con el *cell sorter*) permiten deducir que su proliferación basal, inducida por la estimulación al TCR, era muy fuerte y por lo tanto, difícil de suprimir. Otro aspecto del planteamiento del ensayo de supresión que se debe tener en cuenta en el momento de interpretar los datos es que las células que se emplearon como la porción “respondedora”, es decir, las células que serían suprimidas por las Tregs, fueron esplenocitos totales. Varios protocolos de ensayos de supresión con Tregs emplean células T convencionales (T conv) como la porción respondedora, haciendo más fidedignos los resultados del ensayo (134). Una de las razones por las que se usan T conv es que de esta manera se pueden guardar las proporciones planteadas en el montaje del experimento; es seguro que, por ejemplo, en una proporción 1:1 haya 1 Treg por cada T conv. En nuestro caso, debido a que se usaron esplenocitos totales como células respondedoras, no es posible decir exactamente cuántas T conv haya por cada Treg en las diferentes condiciones experimentales. Otra razón para considerar es que hay muchos tipos celulares que son suprimidos por las Tregs: células T CD4⁺, CD8⁺, células dendríticas, células B, macrófagos, osteoblastos, mastocitos, células NK, células T NK, adipocitos, células endoteliales, fibroblastos, músculo, y células madre del folículo piloso (135). Muchos de estos tipos celulares se encuentran en el bazo, por lo que representan un porcentaje de los esplenocitos usados como células respondedoras, haciendo más difícil la supresión de T conv, sin mencionar de todas las citocinas que pueden secretar y que pueden interferir en la función de las Tregs. Finalmente, entre los esplenocitos que se utilizaron como fracción respondedora pueden encontrarse poblaciones celulares supresoras, como las MDSC, las cuales se acumulan durante la inflamación en órganos linfoides periféricos y en el bazo, y que son capaces de suprimir a diversas poblaciones de células

inmunes (136). Por estas razones, es necesario que en los próximos experimentos se utilicen T conv como fracción respondedora. Por todas estas consideraciones metodológicas, la tendencia a una supresión mejorada por parte de Tregs deficientes en STAT6 sobre la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ debe ser comprobada mediante otros ensayos de supresión.

En conclusión, el presente trabajo de investigación permitió caracterizar las Tregs en el desarrollo del CAC, en ausencia de STAT6, demostrando que las Tregs provenientes de ratones STAT6^{-/-} en tratamiento de CAC tienen una mejor capacidad de diferenciación, y pueden ser de un fenotipo más activado. Hay también indicios que estas células tienen una mejor capacidad de supresión, pero esto queda por demostrar. Este acercamiento es valioso pues sugiere que STAT6 es una molécula importante para la diferenciación, fenotipo y función de las Tregs en etapas tempranas del CAC, que es donde se presenta una inflamación crónica. Además, estos resultados sugieren que se podría usar a STAT6 como blanco terapéutico para generar Tregs más potentes capaces de disminuir la inflamación crónica.

9. Conclusiones

- STAT6 no influye en la diferenciación de Tregs *in vitro*. Sin embargo, la ausencia de STAT6 aumenta la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ naïve provenientes de un ambiente inflamatorio en etapas tempranas del CAC.
- Los ratones de la cepa STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP} son *knockout* de STAT6 y expresan EGFP junto a FoxP3, por lo que se pueden usar para estudios de Tregs en el contexto del CAC.
- En ausencia de STAT6, hay mayor porcentaje de Tregs activadas en etapas tempranas del CAC.
- Los datos preliminares de supresión sugieren que las Tregs deficientes en STAT6 provenientes de un ambiente inflamatorio tienen una capacidad supresora aumentada sobre la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8, pero es necesario repetir estos ensayos.

10. Perspectivas

- ✓ Evaluar la capacidad de diferenciación de Tregs STAT6^{-/-} *in vitro* en un sistema enriquecido en citocinas Th2 o en presencia de IL-4.
- ✓ Estudiar los niveles de desmetilación de TSDR/CNS2 del gen de FoxP3 en linfocitos T CD4⁺ naïve provenientes de ratones STAT6^{-/-} Y WT con y sin tratamiento de inducción de CAC mediante una secuenciación por bisulfito del gen de FoxP3 y sus regiones reguladoras.
- ✓ Evaluar CTLA-4 en las Tregs provenientes de ratones FoxP3^{EGFP}/STAT6^{-/-} con tratamiento de inducción de CAC mediante una tinción intracelular y posterior citometría de flujo.
- ✓ Analizar las citocinas inhibitorias producidas por Tregs STAT6^{-/-}, como IL-10 y TGF-β, las cuales son su principal mecanismo para generar supresión inmunológica, mediante citometría de flujo o ELISA.
- ✓ Estandarizar un ensayo de supresión previamente reportado y validado para analizar la función de las Tregs y repetir el ensayo de supresión.
- ✓ Realizar un trasplante de Tregs STAT6^{-/-} a ratones WT en inducción de CAC, aprovechando la facilidad de sorting de los linfocitos T CD4⁺FoxP3⁺, y evaluar el progreso de la enfermedad.

11. Referencias bibliográficas

- (1) Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *68*(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- (2) Musetti, C., Garau, M., Alonso, R., Piñeros, M., Soerjomataram, I., & Barrios, E. (2021). Colorectal Cancer in Young and Older Adults in Uruguay: Changes in Recent Incidence and Mortality Trends. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(15), 8232. <https://doi.org/10.3390/ijerph18158232>
- (3) Magalhães, B., Peleteiro, B., & Lunet, N. (2012). Dietary patterns and colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer Prevention*, *21*(1), 15-23. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e3283472241>
- (4) Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, *144*(8), 1941-1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- (5) White, A., Ironmonger, L., Steele, R. J. C., Ormiston-Smith, N., Crawford, C., & Seims, A. (2018). A review of sex-related differences in colorectal cancer incidence, screening uptake, routes to diagnosis, cancer stage and survival in the UK. *BMC Cancer*, *18*(1), 906. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4786-7>
- (6) Schoen, R. E., Razzak, A., Yu, K. J., Berndt, S. I., Firl, K., Riley, T. L., & Pinsky, P. F. (2015). Incidence and Mortality of Colorectal Cancer in Individuals with a Family History of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, *149*(6), 1438-1445.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.055>

- (7) Valle, L., Vilar, E., Tavtigian, S. V., & Stoffel, E. M. (2019). Genetic predisposition to colorectal cancer: Syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *The Journal of Pathology*, 247(5), 574-588. <https://doi.org/10.1002/path.5229>
- (8) Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., & Burt, R. W. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044-2058. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.054>
- (9) Czene, K., Lichtenstein, P., & Hemminki, K. (2002). Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database. *International Journal of Cancer*, 99(2), 260-266. <https://doi.org/10.1002/ijc.10332>
- (10) Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., & Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer—Analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *The New England Journal of Medicine*, 343(2), 78-85. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007133430201>
- (11) Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M., & Wallace, M. B. (2019). Colorectal cancer. *The Lancet*, 394(10207), 1467-1480. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)
- (12) Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 36(11), 1461-1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>
- (13) Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- (14) 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>

- (15) Ungaro, R., Mehandru, S., Allen, P. B., Peyrin-Biroulet, L., & Colombel, J.-F. (2017). Ulcerative colitis. *Lancet (London, England)*, 389(10080), 1756-1770.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32126-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32126-2)
- (16) Kameyama, H., Nagahashi, M., Shimada, Y., Tajima, Y., Ichikawa, H., Nakano, M., Sakata, J., Kobayashi, T., Narayanan, S., Takabe, K., & Wakai, T. (2018). Genomic characterization of colitis-associated colorectal cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 16, 121. <https://doi.org/10.1186/s12957-018-1428-0>
- (17) Kalla, R., Ventham, N. T., Satsangi, J., & Arnott, I. D. R. (2014). Crohn's disease. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 349, g6670. <https://doi.org/10.1136/bmj.g6670>
- (18) Sato, T., van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., van den Born, M., Barker, N., Shroyer, N. F., van de Wetering, M., & Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, 469(7330), 415-418.
<https://doi.org/10.1038/nature09637>
- (19) Lasry, A., Zinger, A., & Ben-Neriah, Y. (2016). Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nature Immunology*, 17(3), 230-240. <https://doi.org/10.1038/ni.3384>
- (20) Triantafyllidis, J. K., Nasioulas, G., & Kosmidis, P. A. (2009). Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: Epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer Research*, 29(7), 2727-2737.
- (21) Grivennikov, S. I., & Cominelli, F. (2016). Colitis-Associated and Sporadic Colon Cancers: Different Diseases, Different Mutations? *Gastroenterology*, 150(4), 808-810.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.062>

- (22) Aust, D. E., Terdiman, J. P., Willenbacher, R. F., Chang, C. G., Molinaro-Clark, A., Baretton, G. B., Loehrs, U., & Waldman, F. M. (2002). The APC/beta-catenin pathway in ulcerative colitis-related colorectal carcinomas: A mutational analysis. *Cancer*, *94*(5), 1421-1427. <https://doi.org/10.1002/cncr.10334>
- (23) Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.-Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., & Karin, M. (2009). IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell*, *15*(2), 103-113. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.001>
- (24) Bressenot, A., Cahn, V., Danese, S., & Peyrin-Biroulet, L. (2014). Microscopic features of colorectal neoplasia in inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(12), 3164-3172. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i12.3164>
- (25) Oguma, K., Oshima, H., Aoki, M., Uchio, R., Naka, K., Nakamura, S., Hirao, A., Saya, H., Taketo, M. M., & Oshima, M. (2008). Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells. *The EMBO Journal*, *27*(12), 1671-1681. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.105>
- (26) Grivennikov, S. I. (2013). Inflammation and colorectal cancer: Colitis-associated neoplasia. *Seminars in Immunopathology*, *35*(2), 229-244. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0352-6>
- (27) Shaked, H., Hofseth, L. J., Chumanevich, A., Chumanevich, A. A., Wang, J., Wang, Y., Taniguchi, K., Guma, M., Shenouda, S., Clevers, H., Harris, C. C., & Karin, M. (2012). Chronic epithelial NF- κ B activation accelerates APC loss and intestinal tumor initiation through iNOS up-regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(35), 14007-14012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211509109>
- (28) Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z.-W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F.,

- & Karin, M. (2004). IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, *118*(3), 285-296.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.013>
- (29) Bollrath, J., Phesse, T. J., Burstin, V. A. von, Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, Ö., Schwitalla, S., Matthews, V., Schmid, R. M., Kirchner, T., Arkan, M. C., Ernst, M., & Greten, F. R. (2009). Gp130-Mediated Stat3 Activation in Enterocytes Regulates Cell Survival and Cell-Cycle Progression during Colitis-Associated Tumorigenesis. *Cancer Cell*, *15*(2), 91-102.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.01.002>
- (30) Medina-Andrade, Itzel., Olguín, J. E., Rodríguez, T., Terrazas LI., (2020). The inflammation during colorectal cancer: A friend or a foe? In Morales-Montor, J. & Segovia-Mendoza, M (Eds.), *Immunotherapy in Resistant Cancer: from the lab bench work to its clinical perspectives* (pp. 103-129). London: Elsevier.
- (31) Meira, L. B., Bugni, J. M., Green, S. L., Lee, C.-W., Pang, B., Borenshtein, D., Rickman, B. H., Rogers, A. B., Moroski-Erkul, C. A., McFaline, J. L., Schauer, D. B., Dedon, P. C., Fox, J. G., & Samson, L. D. (2008). DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(7), 2516-2525.
<https://doi.org/10.1172/JCI35073>
- (32) Degasperi, G. R. (2019). Mucosal Immunology in the Inflammatory Bowel Diseases. En *Biological Therapy for Inflammatory Bowel Disease*. IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.90037>
- (33) Wang, M., Zhou, B., Cong, W., Zhang, M., Li, Z., Li, Y., Liang, S., Chen, K., Yang, D., & Wu, Z. (2021). Amelioration of AOM/DSS-Induced Murine Colitis-Associated Cancer by Evodiamine Intervention is Primarily Associated with Gut Microbiota-Metabolism-Inflammatory Signaling Axis. *Frontiers in Pharmacology*, *12*.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2021.797605>

- (34) Parang, B., Barrett, C. W., & Williams, C. S. (2016). AOM/DSS Model of Colitis-Associated Cancer. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1422, 297-307. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3603-8_26
- (35) Kuraishy, A., Karin, M., & Grivennikov, S. I. (2011). Tumor promotion via injury- and death-induced inflammation. *Immunity*, 35(4), 467-477. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.006>
- (36) Wang, M., Zhou, B., Cong, W., Zhang, M., Li, Z., Li, Y., Liang, S., Chen, K., Yang, D., & Wu, Z. (2021). Amelioration of AOM/DSS-Induced Murine Colitis-Associated Cancer by Evodiamine Intervention is Primarily Associated with Gut Microbiota-Metabolism-Inflammatory Signaling Axis. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2021.797605>
- (37) Ono, M. (2020). Control of regulatory T-cell differentiation and function by T-cell receptor signalling and Foxp3 transcription factor complexes. *Immunology*, 160(1), 24-37. <https://doi.org/10.1111/imm.13178>
- (38) Sakaguchi, S. (2004). Naturally Arising CD4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 531-562. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141122>
- (39) Greene, A. C., Shehabeldin, M., Gao, J., Balmert, S. C., Ratay, M., Sfeir, C., & Little, S. R. (2022). Local induction of regulatory T cells prevents inflammatory bone loss in ligature-induced experimental periodontitis in mice. *Scientific Reports*, 12(1), 5032. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09150-8>
- (40) Yang, S., Zhu, L., Xiao, L., Shen, Y., Wang, L., Peng, B., & Haapasalo, M. (2014). Imbalance of interleukin-17+ T-cell and Foxp3+ regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. *Journal of Endodontics*, 40(1), 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.09.033>

- (41) Kim, M.-C., Borchering, N., Ahmed, K. K., Voigt, A. P., Vishwakarma, A., Kolb, R., Kluz, P. N., Pandey, G., De, U., Drashansky, T., Helm, E. Y., Zhang, X., Gibson-Corley, K. N., Klesney-Tait, J., Zhu, Y., Lu, J., Lu, J., Huang, X., Xiang, H., ... Zhang, W. (2021). CD177 modulates the function and homeostasis of tumor-infiltrating regulatory T cells. *Nature Communications*, 12(1), 5764. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26091-4>
- (42) Hsu, T.-S., Lin, Y.-L., Wang, Y.-A., Mo, S.-T., Chi, P.-Y., Lai, A. C.-Y., Pan, H.-Y., Chang, Y.-J., & Lai, M.-Z. (2020). HIF-2 α is indispensable for regulatory T cell function. *Nature Communications*, 11(1), 5005. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18731-y>
- (43) Shevach, E. M., & Thornton, A. M. (2014). tTregs, pTregs, and iTregs: Similarities and differences. *Immunological Reviews*, 259(1), 88-102. <https://doi.org/10.1111/imr.12160>
- (44) 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>
- (45) Georgiev, P., Charbonnier, L.-M., & Chatila, T. A. (2019). Regulatory T Cells: The Many Faces of Foxp3. *Journal of Clinical Immunology*, 39(7), 623-640. <https://doi.org/10.1007/s10875-019-00684-7>
- (46) Horwitz, D. A., Zheng, S. G., & Gray, J. D. (2008). Natural and TGF- β -induced Foxp3+CD4+ CD25+ regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends in Immunology*, 29(9), 429-435. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.06.005>
- (47) Zheng, S. G., Wang, J. H., Stohl, W., Kim, K. S., Gray, J. D., & Horwitz, D. A. (2006). TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(6), 3321-3329. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.6.3321>
- (48) Kong, N., Lan, Q., Chen, M., Wang, J., Shi, W., Horwitz, D. A., Quesniaux, V., Ryffel, B.,

- Liu, Z., Brand, D., Zou, H., & Zheng, S. G. (2012). Antigen-specific TGF- β -induced regulatory T cells but not natural Tregs ameliorate autoimmune arthritis by shifting the balance of Th17 toward Treg cells. *Arthritis and rheumatism*, *64*(8), 2548-2558. <https://doi.org/10.1002/art.34513>
- (49) Selvaraj, R. K., & Geiger, T. L. (2007). A Kinetic and Dynamic Analysis of Foxp3 Induced in T Cells by TGF- β . *The Journal of Immunology*, *178*(12), 7667-7677. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7667>
- (50) Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., & Powrie, F. (1999). An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, *190*(7), 995-1004.
- (51) Kearley, J., Barker, J. E., Robinson, D. S., & Lloyd, C. M. (2005). Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *The Journal of Experimental Medicine*, *202*(11), 1539-1547. <https://doi.org/10.1084/jem.20051166>
- (52) Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2007). 'Yin-Yang' functions of TGF- β and Tregs in immune regulation. *Immunological reviews*, *220*, 199-213. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00565.x>
- (53) 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>
- (54) Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ (December 2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells". *Nature Immunology*. **8** (12): 1353-62. doi:10.1038/ni1536
- (55) Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. (August 2007). "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of

extracellular ATP and immune suppression". *Blood*. 110 (4): 1225–32.
doi:10.1182/blood-2006-12-064527

(56) Klein, M., & Bopp, T. (2016). Cyclic AMP Represents a Crucial Component of Treg Cell-Mediated Immune Regulation. *Frontiers in Immunology*, 7.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2016.00315>

(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) Bending, D., Paduraru, A., Ducker, C. B., Prieto Martín, P., Crompton, T., & Ono, M. (2018). A temporally dynamic Foxp3 autoregulatory transcriptional circuit controls the effector Treg programme. *The EMBO Journal*, 37(16), e99013.
<https://doi.org/10.15252/embj.201899013>

(59) Tai, X., Van Laethem, F., Pobezinsky, L., Guinter, T., Sharrow, S. O., Adams, A., Granger, L., Kruhlak, M., Lindsten, T., Thompson, C. B., Feigenbaum, L., & Singer, A. (2012). Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4+ T cells. *Blood*, 119(22), 5155-5163. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-388918>

(60) Osinska, I., Stelmaszczyk-Emmel, A., Polubiec-Kownacka, M., Dziedzic, D., & Domagala-Kulawik, J. (2015). CTLA-4 on regulatory T cells—Regulation of local immune response in lung cancer. *European Respiratory Journal*, 46(suppl 59).
<https://doi.org/10.1183/13993003.congress-2015.PA532>

(61) Ovcinnikovs, V., Ross, E. M., Petersone, L., Edner, N. M., Heuts, F., Ntavli, E., Kogimtzis, A., Kennedy, A., Wang, C. J., Bennett, C. L., Sansom, D. M., & Walker, L. S. K. (2019). CTLA-4 mediated transendocytosis of co-stimulatory molecules primarily targets migratory dendritic cells. *Science immunology*, 4(35), eaaw0902.
<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaw0902>

- (62)Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., & Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function. *Science*, 322(5899), 271-275. <https://doi.org/10.1126/science.1160062>
- (63)Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubat, T., Yagita, H., & Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International Immunology*, 8(5), 765-772. <https://doi.org/10.1093/intimm/8.5.765>
- (64)Bardhan, K., Anagnostou, T., & Boussiotis, V. A. (2016). The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Frontiers in Immunology*, 7, 550. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00550>
- (65)Giancchetti, E., & Fierabracci, A. (2018). Inhibitory Receptors and Pathways of Lymphocytes: The Role of PD-1 in Treg Development and Their Involvement in Autoimmunity Onset and Cancer Progression. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02374>
- (66)Jacobse, J., Li, J., Rings, E. H. H. M., Samsom, J. N., & Goettel, J. A. (2021). Intestinal Regulatory T Cells as Specialized Tissue-Restricted Immune Cells in Intestinal Immune Homeostasis and Disease. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2021.716499>
- (67)Sharma, M., Shinde, R., McGaha, T., Huang, L., Holmgaard, R., Wolchok, J., Mautino, M., Celis, E., Sharpe, A., Francisco, L., Powell, J., Yagita, H., Mellor, A., Blazar, B., & Munn, D. (2015). The PTEN pathway in Tregs functions as a critical driver of the immunosuppressive tumor microenvironment and tolerance to apoptotic cells. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 3(Suppl 2), O19. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-3-S2-O19>
- (68)Wolf, Y., Anderson, A. C., & Kuchroo, V. K. (2020). TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nature Reviews Immunology*, 20(3), 173-185. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0224-6>

- (69) Anderson, A. C. (2014). Tim-3: An Emerging Target in the Cancer Immunotherapy Landscape. *Cancer Immunology Research*, 2(5), 393-398. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0039>
- (70) Li, C., Jiang, P., Wei, S., Xu, X., & Wang, J. (2020). Regulatory T cells in tumor microenvironment: New mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Molecular Cancer*, 19(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01234-1>
- (71) Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., & Cheroutre, H. (2007). Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5835), 256-260. <https://doi.org/10.1126/science.1145697>
- (72) Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddle, L. B., & Coffman, R. L. (1993). Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *International Immunology*, 5(11), 1461-1471. <https://doi.org/10.1093/intimm/5.11.1461>
- (73) Sinicrope, F. A., & Sargent, D. J. (2009). Clinical implications of microsatellite instability in sporadic colon cancers. *Current opinion in oncology*, 21(4), 369-373. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32832c94bd>
- (74) Sakuishi, K., Ngiow, S. F., Sullivan, J. M., Teng, M. W. L., Kuchroo, V. K., Smyth, M. J., & Anderson, A. C. (2013). TIM3+FOXP3+ regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology*, 2(4), e23849. <https://doi.org/10.4161/onci.23849>
- (75) 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+Foxp3+ Regulatory T Cells during Colitis-Associated

Colon Cancer Induces CD4+ and CD8+ T Cell Activation Inhibiting Tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 9(2), 239-249. <https://doi.org/10.7150/jca.21336>

- (76) 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>
- (77) Simonetta, F., Chiali, A., Cordier, C., Urrutia, A., Girault, I., Bloquet, S., Tanchot, C., & Bourgeois, C. (2010). Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells. *European Journal of Immunology*, 40(9), 2528-2538. <https://doi.org/10.1002/eji.201040531>
- (78) Haribhai, D., Lin, W., Relland, L. M., Truong, N., Williams, C. B., & Chatila, T. A. (2007). Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(5), 2961-2972. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2961>
- (79) Quintás-Cardama, A., & Verstovsek, S. (2013). MOLECULAR PATHWAYS: JAK/STAT PATHWAY: MUTATIONS, INHIBITORS, AND RESISTANCE. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(8), 1933-1940. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0284>
- (80) Rawlings, J. S., Rosler, K. M., & Harrison, D. A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 117(8), 1281-1283. <https://doi.org/10.1242/jcs.00963>
- (81) Sansone, P., & Bromberg, J. (2012). Targeting the Interleukin-6/Jak/Stat Pathway in Human Malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, 30(9), 1005-1014. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.31.8907>
- (82) Shuai, K., & Liu, B. (2003). Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system.

Nature Reviews Immunology, 3(11), 900-911. <https://doi.org/10.1038/nri1226>

- (83) Paul, W. E., & Zhu, J. (2010). How are TH2-type immune responses initiated and amplified? *Nature reviews. Immunology*, 10(4), 225-235. <https://doi.org/10.1038/nri2735>
- (84) Wang, C.-G., Ye, Y.-J., Yuan, J., Liu, F.-F., Zhang, H., & Wang, S. (2010). EZH2 and STAT6 expression profiles are correlated with colorectal cancer stage and prognosis. *World Journal of Gastroenterology*, 16(19), 2421-2427. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i19.2421>
- (85) Rosen, M. J., Chaturvedi, R., Washington, M. K., Kuhnhein, L. A., Moore, P. D., Coggeshall, S. S., McDonough, E. M., Weitkamp, J. H., Singh, A. B., Coburn, L. A., Williams, C. S., Yan, F., Van Kaer, L., Peebles, R. S., Jr, & Wilson, K. T. (2013). STAT6 deficiency ameliorates severity of oxazolone colitis by decreasing expression of claudin-2 and Th2-inducing cytokines. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(4), 1849–1858. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201373>
- (86) Shajib, M. S., Wang, H., Kim, J. J., Sunjic, I., Ghia, J. E., Denou, E., Collins, M., Denburg, J. A., & Khan, W. I. (2013). Interleukin 13 and serotonin: linking the immune and endocrine systems in murine models of intestinal inflammation. *PLoS one*, 8(8), e72774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072774>
- (87) Chávez-Galán, L., Olleros, M. L., Vesin, D., & Garcia, I. (2015). Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Frontiers in Immunology*, 6. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00263>
- (88) Zhang, Y., Zhao, Y., Li, Q., & Wang, Y. (2021). Macrophages, as a Promising Strategy to Targeted Treatment for Colorectal Cancer Metastasis in Tumor Immune Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2021.685978>

- (89)Liu, H., Antony, S., Roy, K., Juhasz, A., Wu, Y., Lu, J., Meitzler, J. L., Jiang, G., Polley, E., & Doroshow, J. H. (2017). Interleukin-4 and interleukin-13 increase NADPH oxidase 1-related proliferation of human colon cancer cells. *Oncotarget*, *8*(24), 38113-38135. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17494>
- (90)Li, B. H., Xu, S. B., Li, F., Zou, X. G., Saimaiti, A., Simayi, D., Wang, Y. H., Zhang, Y., Yuan, J., & Zhang, W. J. (2012). Stat6 activity-related Th2 cytokine profile and tumor growth advantage of human colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Cellular Signalling*, *24*(3), 718-725. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.11.005>
- (91)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>
- (92)Cao, H., Zhang, J., Liu, H., Wan, L., Zhang, H., Huang, Q., Xu, E., & Lai, M. (2016). IL-13/STAT6 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *Oncotarget*, *7*(38), 61183-61198. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11282>
- (93)Jayakumar, A. and A.L.M. Bothwell. (2017). Stat6 Promotes Intestinal Tumorigenesis in a Mouse Model of Adenomatous Polyposis by Expansion of MDSCs and Inhibition of Cytotoxic CD8 Response. *Neoplasia*,*19*(8): 595-605.
- (94)Lee, H. L., Jang, J. W., Lee, S. W., Yoo, S. H., Kwon, J. H., Nam, S. W., Bae, S. H., Choi, J. Y., Han, N. I., & Yoon, S. K. (2019). Inflammatory cytokines and change of Th1/Th2 balance as prognostic indicators for hepatocellular carcinoma in patients treated with transarterial chemoembolization. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40078-8>
- (95)Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., & Grusby, M. J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, *4*(3), 313-319. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80439-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80439-2)

- (96) Rivera-Rugeles, AC., Delgado-Ramírez Y., Terrazas LI., León-Cabrera, S. (2020). *Targeting the STAT6 signaling pathway as a therapy against colon cancer*. In Morales-Montor, J. & Segovia-Mendoza, M (Eds.), *Immunotherapy in Resistant Cancer: from the lab bench work to its clinical perspectives* (pp. 149-172). London: Elsevier.
- (97) Yan, D., Wang, H.-W., Bowman, R. L., & Joyce, J. A. (2016). STAT3 and STAT6 Signaling Pathways Synergize to Promote Cathepsin Secretion from Macrophages via IRE1 α Activation. *Cell Reports*, 16(11), 2914-2927. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.035>
- (98) 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. (2017b). 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>
- (99) Mendoza-Rodríguez, M. G., Sánchez-Barrera, C. Á., Callejas, B. E., García-Castillo, V., Beristain-Terrazas, D. L., Delgado-Buenrostro, N. L., Chirino, Y. I., León-Cabrera, S. A., Rodríguez-Sosa, M., Gutierrez-Cirlos, E. B., Pérez-Plasencia, C., Vaca-Paniagua, F., Meraz-Ríos, M. A., & Terrazas, L. I. (2020). Use of STAT6 Phosphorylation Inhibitor and Trimethylglycine as New Adjuvant Therapies for 5-Fluorouracil in Colitis-Associated Tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), E2130. <https://doi.org/10.3390/ijms21062130>
- (100) Delgado-Ramirez, Y., Ocaña-Soriano, A., Ledesma-Soto, Y., Olguín, J. E., Hernandez-Ruiz, J., Terrazas, L. I., & Leon-Cabrera, S. (2021a). 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>

- (101) Takaki, H., Ichiyama, K., Koga, K., Chinen, T., Takaesu, G., Sugiyama, Y., Kato, S., Yoshimura, A., & Kobayashi, T. (2008). STAT6 Inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(22), 14955-14962. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801123200>
- (102) Song, X., Li, B., Xiao, Y., Chen, C., Wang, Q., Liu, Y., Berezov, A., Xu, C., Gao, Y., Wu, S.-L., Zhang, H., Karger, B. L., Hancock, W. W., Wells, A. D., Zhou, Z., & Greene, M. I. (2012). Structural and biological features of FOXP3 dimerization relevant to regulatory T cell function. *Cell Reports*, 1(6), 665-675. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.04.012>
- (103) Dorsey, N. J., Chapoval, S. P., Smith, E. P., Skupsky, J., Scott, D. W., & Keegan, A. D. (2013). STAT6 controls the number of regulatory T cells in vivo thereby regulating allergic lung inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(4), 1517-1528. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300486>
- (104) Nava-Lira, E. (2021) *Obtención de una cepa de ratón doble transgénico (STAT6^{-/-}/FoxP3^{EGFP}) para el estudio de las células T reguladoras durante el cancer de colon asociado a colitis*. [Tesis de licenciatura inedita]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- (105) 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>
- (106) Kim, J. J., Shajib, Md. S., Manocha, M. M., & Khan, W. I. (2012). Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 60, 3678. <https://doi.org/10.3791/3678>

- (107) Wang, Z., & Storm, D. R. (2006). Extraction of DNA from mouse tails. *BioTechniques*, 41(4), 410-412. <https://doi.org/10.2144/000112255>
- (108) The Jackson Laboratory (2022). Standard PCR; Allele Symbol Stat6<tm1Gru>. The Jackson Laboratory. <https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=005977&protocolID=28614>. Consultado el 07/02/2022.
- (109) The Jackson Laboratory (2022). Standard PCR; Allele Symbol Tg(Foxp3-GFP)90Pkraj. *The Jackson Laboratory*, <https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=023800&protocolID=24683>. Consultado el 07/02/2022.
- (110) Schallenberg, S., Petzold, C., Tsai, P.-Y., Sparwasser, T., & Kretschmer, K. (2012). Vagaries of Fluorochrome Reporter Gene Expression in Foxp3+ Regulatory T Cells. *PLOS ONE*, 7(8), e41971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041971>
- (111) Beil, J., & Buch, T. (2014). Generation of Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Transgenic Mice. En S. R. Singh & V. Coppola (Eds.), *Mouse Genetics: Methods and Protocols* (pp. 157-169). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1215-5_8
- (112) Li, Z., Chen, L., & Qin, Z. (2009). Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, 6(6), 415-422. <https://doi.org/10.1038/cmi.2009.53>
- (113) Ohkura, N., Hamaguchi, M., Morikawa, H., Sugimura, K., Tanaka, A., Ito, Y., Osaki, M., Tanaka, Y., Yamashita, R., Nakano, N., Huehn, J., Fehling, H. J., Sparwasser, T., Nakai, K., & Sakaguchi, S. (2012). T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity*, 37(5), 785-799. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.09.010>

- (114) Placek, K., Hu, G., Cui, K., Zhang, D., Ding, Y., Lee, J.-E., Jang, Y., Wang, C., Konkeli, J. E., Song, J., Liu, C., Ge, K., Chen, W., & Zhao, K. (2017). MLL4 prepares the enhancer landscape for Foxp3 induction via chromatin looping. *Nature Immunology*, *18*(9), 1035-1045. <https://doi.org/10.1038/ni.3812>
- (115) Colamatteo, A., Carbone, F., Bruzzaniti, S., Galgani, M., Fusco, C., Maniscalco, G. T., Di Rella, F., de Candia, P., & De Rosa, V. (2020). Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to Post-translational Regulation. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.03136>
- (116) Joudi, A. M., Reyes Flores, C. P., & Singer, B. D. (2022). Epigenetic Control of Regulatory T Cell Stability and Function: Implications for Translation. *Frontiers in Immunology*, *13*. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2022.861607>
- (117) Li, Y., Deuring, J., Peppelenbosch, M. P., Kuipers, E. J., de Haar, C., & van der Woude, C. J. (2012). IL-6-induced DNMT1 activity mediates SOCS3 promoter hypermethylation in ulcerative colitis-related colorectal cancer. *Carcinogenesis*, *33*(10), 1889-1896. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs214>
- (118) Samanta, A., Li, B., Song, X., Bembas, K., Zhang, G., Katsumata, M., Saouaf, S. J., Wang, Q., Hancock, W. W., Shen, Y., & Greene, M. I. (2008). TGF-beta and IL-6 signals modulate chromatin binding and promoter occupancy by acetylated FOXP3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(37), 14023-14027. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806726105>
- (119) Morikawa, H., Ohkura, N., Vandenbon, A., Itoh, M., Nagao-Sato, S., Kawaji, H., Lassmann, T., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Forrest, A. R. R., Standley, D. M., Date, H., Sakaguchi, S., the FANTOM Consortium, Forrest, A. R. R., Kawaji, H., Rehli, M., Baillie, J. K., de Hoon, M. J. L., ... Hayashizaki, Y. (2014). Differential roles of epigenetic changes and Foxp3 expression in regulatory T cell-specific transcriptional regulation.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(14), 5289-5294.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1312717110>

- (120) Polansky, J. K., Schreiber, L., Thelemann, C., Ludwig, L., Krüger, M., Baumgrass, R., Cording, S., Floess, S., Hamann, A., & Huehn, J. (2010). Methylation matters: Binding of Ets-1 to the demethylated Foxp3 gene contributes to the stabilization of Foxp3 expression in regulatory T cells. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 88(10), 1029-1040. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0642-1>
- (121) Kressler, C., Gasparoni, G., Nordström, K., Hamo, D., Salhab, A., Dimitropoulos, C., Tierling, S., Reinke, P., Volk, H.-D., Walter, J., Hamann, A., & Polansky, J. K. (2021). Targeted De-Methylation of the FOXP3-TSDR Is Sufficient to Induce Physiological FOXP3 Expression but Not a Functional Treg Phenotype. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.609891>
- (122) Strauss, L., Bergmann, C., Szczepanski, M., Gooding, W., Johnson, J. T., & Whiteside, T. L. (2007). A Unique Subset of CD4+CD25highFoxp3+ T Cells Secreting Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- β 1 Mediates Suppression in the Tumor Microenvironment. *Clinical Cancer Research*, 13(15), 4345-4354. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0472>
- (123) Bettini, M. L., Pan, F., Bettini, M., Finkelstein, D., Rehg, J. E., Floess, S., Bell, B. D., Ziegler, S. F., Huehn, J., Pardoll, D. M., & Vignali, D. A. A. (2012). Loss of epigenetic modification driven by the Foxp3 transcription factor leads to regulatory T cell insufficiency. *Immunity*, 36(5), 717-730. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.020>
- (124) Darce, J., Rudra, D., Li, L., Nishio, J., Cipolletta, D., Rudensky, A. Y., Mathis, D., & Benoist, C. (2012). An N-terminal mutation of the Foxp3 transcription factor alleviates arthritis but exacerbates diabetes. *Immunity*, 36(5), 731-741. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.04.007>

- (125) Montagutelli, X. (2000). Effect of the Genetic Background on the Phenotype of Mouse Mutations. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(suppl 2), S101-S105. https://doi.org/10.1681/ASN.V11suppl_2s101
- (126) Munhoz, R. R., & Postow, M. A. (2016). Recent advances in understanding antitumor immunity. *F1000Research*, 5, 2545. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9356.1>
- (127) Tanaka, A., & Sakaguchi, S. (2019). Targeting Treg cells in cancer immunotherapy. *European Journal of Immunology*, 49(8), 1140-1146. <https://doi.org/10.1002/eji.201847659>
- (128) Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 155(3), 1151-1164.
- (129) Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddle, L. B., & Coffman, R. L. (1993). Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *International Immunology*, 5(11), 1461-1471. <https://doi.org/10.1093/intimm/5.11.1461>
- (130) Zhao, D., Zhang, C., Yi, T., Lin, C.-L., Todorov, I., Kandeel, F., Forman, S., & Zeng, D. (2008). In vivo-activated CD103+CD4+ regulatory T cells ameliorate ongoing chronic graft-versus-host disease. *Blood*, 112(5), 2129-2138. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-140277>
- (131) Qin, W., Hu, L., Zhang, X., Jiang, S., Li, J., Zhang, Z., & Wang, X. (2019). The Diverse Function of PD-1/PD-L Pathway Beyond Cancer. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.02298>
- (132) Kamada, T., Togashi, Y., Tay, C., Ha, D., Sasaki, A., Nakamura, Y., Sato, E., Fukuoka,

S., Tada, Y., Tanaka, A., Morikawa, H., Kawazoe, A., Kinoshita, T., Shitara, K., Sakaguchi, S., & Nishikawa, H. (2019). PD-1+ regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(20), 9999-10008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1822001116>

(133) Shevach, E. M. (2018). Foxp3+ T Regulatory Cells: Still Many Unanswered Questions—A Perspective After 20 Years of Study. *Frontiers in Immunology*, *9*, 1048. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01048>

(134) Collison, L. W., & Vignali, D. A. A. (2011). In Vitro Treg Suppression Assays. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *707*, 21-37. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-979-6_2

(135) Thornton, A. M., & Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of Experimental Medicine*, *188*(2), 287-296. <https://doi.org/10.1084/jem.188.2.287>

(136) Tavukcuoglu, E., Horzum, U., Yanik, H., Uner, A., Yoyen-Ermis, D., Nural, S. K., Aydin, B., Sokmensuer, C., Karakoc, D., Yilmaz, K. B., Hamaloglu, E., & Esendagli, G. (2020). Human splenic polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells (PMN-MDSC) are strategically located immune regulatory cells in cancer. *European Journal of Immunology*, *50*(12), 2067-2074. <https://doi.org/10.1002/eji.202048666>