



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**ANÁLISIS DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE
CÉLULAS TREG DIFERENCIADAS EN DEFICIENCIA DE
STAT6**

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

María Fernanda Correa Pérez

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Sonia Andrea León Cabrera



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hay más jugadas posibles sobre un tablero de ajedrez que átomos existentes en el universo observable, así que imagina el lío que puede llegar a ser. Y no hay una manera correcta de jugar, por cierto, si no muchas. En el ajedrez, como en la vida, la posibilidad está en la base de todo.

Cada esperanza, cada sueño, cada arrepentimiento, cada momento vivido.

- *La biblioteca de la media noche. Matt Haig.*

DEDICATORIA

A mis padres, quienes han sabido guiarme para ser mejor cada día y quienes siempre me han apoyado en mis decisiones.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Enrique Correa y Sofía Pérez, por todo el apoyo y la motivación que me brindaron durante la carrera y la realización de este trabajo. Gracias por creer en mí y por decirme que sin importar las decisiones que tome siempre van a estar orgullosos. Sepan que este logro también es suyo.

A mi hermana, Daniela, y a mis primos, Abril y Ulises, chicos, gracias por acompañarme, escucharme, darme palabras de aliento y por todo.

A mis tíos, Eloy Pérez y Lady Guzmán, quienes se han vuelto muy importantes en mi vida en estos últimos años. Gracias por motivarme siempre a lograr lo que me proponga y por sus consejos bien acertados.

A mis mejores amigos, Gaby, Dafne, Eliseo y Sergio, por haberme acompañado en todo este camino, escuchar mis quejas, darme palabras de aliento cuando lo necesite y por motivarme a lograr mis sueños. Sepan que los quiero mucho.

A mis compañeros de laboratorio, Valeria, Carlos, Aranza, Ángel, Christopher, Alejandro, y también a los que llegaron al final, Aarón y Alejandro Rebolledo. A todos ustedes gracias por permitirme conocerlos, aprender de ustedes, por darme otra percepción de las cosas, por hacer más ameno el trabajo de laboratorio y por acompañarme en este pequeño acercamiento de la vida de un científico.

A mi Directora de tesis, la Dra. Sonia Andrea León, a quien le agradezco profundamente por haberme permitido integrarme a su equipo de investigación, por haberme brindado su confianza, su dedicación, paciencia y enseñanzas. Gracias por su guía y sus consejos para terminar esta etapa con éxito.

A cada uno de mis asesores de tesis, porque sus comentarios a este trabajo lo enriquecieron enormemente e hicieron que se volviera mejor. Muchas gracias.

A todo ustedes gracias por darme lo más valioso que tienen, su tiempo...

Este trabajo fue realizado con el apoyo de CONAHCYT Proyecto A1-S-23944 y el Programa de Apoyo a proyecto de Investigación Científica y Tecnológica PAPIIT. UNAM. Proyecto IN215421.

Índice

1. Resumen	5
2. Introducción.	
2.1 Cáncer colorrectal.	
2.1.1 Epidemiología.....	6
2.1.2 Relación entre la inflamación y el cáncer de colon.....	7
2.2 Linfocitos T reguladores.....	11
2.2.1 Linfocitos nTregs.....	13
2.2.2 Linfocitos iTregs.....	14
2.2.3 Mecanismos de supresión.....	16
2.2.4 Transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT6) y FoxP3.19	
2.2.5 Participación de STAT6 en el desarrollo de los linfocitos Tregs.....	20
3. Justificación	23
4. Hipótesis	24
5. Objetivos.	
5.1 Objetivo general.....	24
5.2 Objetivos particulares.....	24
6. Materiales y métodos.	
6.1 Material biológico.....	25
6.2 Genotipificación de ratones STAT6 ^{-/-} FoxP3 ^{EGFP}	25
6.3 Diferenciación a linfocitos T reguladores.	
6.3.1 Obtención de esplenocitos.....	27
6.3.2 Obtención de linfocitos CD4 totales.....	27
6.3.3 Diferenciación de linfocitos CD4 a Tregs.....	28
6.4 Citometría de flujo.....	28
6.5 Aislamiento por Cell Sorter.....	29
6.6 Inducción del modelo de AOM/DSS.....	30

6.7	Transferencia celular adoptiva.....	30
6.8	Valoración de la colitis y progresión tumoral.	
6.8.1	Índice daño de la enfermedad.	31
6.9	Sacrificio	31
6.10	Análisis histológico.....	32
6.10.1.	Tinción de Hematoxilina-Eosina.....	32
6.10.1.1	Índice de daño histopatológico.....	33
6.10.2.	Tinción de Azul alcian con Hematoxilina-Eosina.....	34
6.11	Expresión de citocinas en el colon.....	34
6.12	Análisis estadístico.....	37
7.	Resultados.	
7.1	Genotipo de ratones STAT6 ^{-/-} FoxP3 ^{EGFP} y STAT6 ^{+/+} FoxP3 ^{EGFP}	38
7.2	Análisis de la expresión e intensidad de FoxP3 y CD25 en células Treg diferenciadas en deficiencia de STAT6.....	39
7.3	Cambios en el peso corporal de los grupos experimentales con AOM/DSS y con administración de Tregs.....	41
7.4	Análisis del índice de daño de la enfermedad.....	42
7.5	Análisis de los cambios morfométricos del intestino.....	44
7.6	La administración de Tregs STAT6 ^{-/-} disminuye el daño en el epitelio colónico.....	46
7.7	Las células caliciformes se preservan en los grupos con transferencia adoptiva.....	48
7.8	Análisis de la expresión de citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias en el colon.....	50
8.	Discusión.....	52
9.	Conclusión.....	56
10.	Literatura citada.....	57
11.	Anexo.	
11.1	Soluciones.....	67

Índice de figuras

Figura 1. Incidencia y mortalidad de ambos sexos para México en 2020.....	6
Figura 2. Progresión tumoral del cáncer de colon esporádico y el cáncer de colon asociado a colitis.....	9
Figura 3. Funciones de los linfocitos Tregs clásicas y en tejidos.....	11
Figura 4. Sitios de diferenciación de los linfocitos T reguladores naturales e inducidos.....	13
Figura 5. Mecanismos de supresión de las Tregs.....	19
Figura 6. Activación y regulación de la vía de señalización JAK/STAT.....	21
Figura 7. Cronograma del modelo de AOM/DSS. En él se señala el día de la inducción del AOM y el día del sacrificio de los grupos experimentales.....	30
Figura 8. Cronograma de los días de transferencia adoptiva en el modelo de AOM/DSS.....	30
Figura 9. Gel de electroforesis del gen STAT6 ^{-/-} y FoxP3.....	38
Figura 10. Citometría de flujo de Tregs diferenciadas en deficiencia de STAT6.....	40
Figura 11. Cambios en el peso corporal expresado en porcentaje.....	41
Figura 12. Índice de daño de la enfermedad.....	43
Figura 13. Cambios morfométricos del intestino.....	44
Figura 14. Daño histopatológico al día 71 del modelo.....	46
Figura 15. Tinción de Hematoxilina-Eosina a 10x y 20x en cortes de 5 µm al día 71 del modelo.....	47
Figura 16. Número de células caliciformes conservadas al día 71 del modelo.....	48
Figura 17. Tinción de Azul alcian con Hematoxilina-Eosina a 10x y 20x en cortes de 5 µm al día 71 del modelo	49

Figura 18. Análisis de la expresión de mRNA de citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias presentes en el tejido del colon.....51

Índice de tablas

Tabla 1. Distribución de los ratones en los grupos experimentales.....25

Tabla 2. Secuencia de primers utilizados para la genotipificación de la cepa doble transgénico.....26

Tabla 3. Proporciones de los reactivos para una reacción de PCR de punto final para los genes FoxP3 y STAT6.....26

Tabla 4. Condiciones de la PCR de punto final para los genes FoxP3 y STAT6.....27

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en la citometría de flujo.....29

Tabla 6. Parámetros y puntajes para la obtención del índice de daño de la enfermedad.....31

Tabla 7. Parámetros y puntajes considerados para el índice de daño histopatológico...33

Tabla 8. Proporciones para PCR de punto final para citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias.....35

Tabla 9. Primers utilizados en la PCR de punto final para distintos genes de interés....36

Tabla 10. Condiciones de la PCR en punto final.....36

1. RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer más diagnosticado y la segunda neoplasia maligna más mortal para ambos sexos en todo el mundo. La inflamación constituye un factor importante en la progresión del cáncer de colon asociado a colitis (CAC), ya que, la inflamación activa compromete la integridad de la barrera epitelial generando que ésta se vuelva más permeable, incitando así una desregulación de la respuesta inmune, de la microbiota y originando un daño en el ADN. Lo anterior conduce a la formación de displasias desarrolladas principalmente en el colon que posteriormente progresan a un carcinoma. El transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT6) se encuentra altamente activado en distintos tumores y en el CCR se ha asociado a metástasis, sin embargo, tras su inhibición en modelos murinos se ha observado que disminuye la tumorigénesis y el infiltrado inflamatorio. Esto se ha atribuido a un reclutamiento temprano de linfocitos T reguladores (Treg) en el CAC. Las Treg FoxP3⁺ son capaces de suprimir otras poblaciones inmunitarias de linfocitos y participando en la reparación tisular y en la regulación de la inflamación local. La deficiencia de STAT6 (STAT6^{-/-}) en las T reguladoras inducidas (iTreg) *in vitro* favorece su estabilidad y capacidad supresora, atribuida a la sobreexpresión de PD-1, CTLA-4 y FoxP3. En este trabajo se estudió si los iTreg deficientes en STAT6 obtenidos a partir de linfocitos T CD4⁺ totales podrían actuar como una inmunoterapia en un modelo de CAC inducido por AOM/DSS (Azoximetano/ Dextrán Sulfato de Sodio) mediante transferencia celular adoptiva. Para ello, se transfirieron iTregs WT o iTregs STAT6^{-/-} en los días 17, 27 y 41 durante la progresión tumoral. Se analizó el peso corporal, el índice de daño de la enfermedad, el número de tumores, el grado de daño histológico, la expresión de marcadores de proliferación y citocinas a nivel local. Los resultados indicaron que la transferencia adoptiva con iTregs WT o STAT6^{-/-} es capaz de disminuir los signos de la enfermedad, el infiltrado inflamatorio y el daño histológico, pero no la carga tumoral. Aunque esta terapia resulta adecuada para controlar la inflamación, su administración debe realizarse únicamente en las etapas tempranas de la enfermedad ya que la administración en etapas más avanzadas podría promover la progresión tumoral.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 CÁNCER COLORECTAL

2.1.1 Epidemiología

El cáncer de colon y recto o colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer más diagnosticado y la segunda neoplasia maligna más mortal para ambos sexos en todo el mundo. Para México, en 2020 ocupó el tercer lugar en incidencia para hombres y mujeres después del cáncer de pulmón y mama, mientras que la mortalidad se ubicó sólo por debajo del cáncer de pulmón (Figura 1). La gaceta mexicana de oncología en 2019 registró 14 900 casos nuevos para ese año, además de un incremento de 4.8 muertes por cada 100 000 habitantes para el 2015. Sin embargo, en los últimos años en países como Estados Unidos y Canadá la incidencia y mortalidad ha disminuido gradualmente debido a la detección y la mejora de las terapias oncológicas. No obstante, para México y América Latina la situación es distinta, ya que el CCR presenta un incremento en la tasa de mortalidad anual. Desafortunadamente, aunque su incidencia se encuentra en descenso para algunos países, en adultos jóvenes, menores a 50 años, existe un aumento notable (Weinberg et al., 2017; Patel y Ahnen, 2018; Torrencillas-Torres et al., 2019; GLOBOCAN, 2020; Lotfollahzadeh et al., 2022; Andrade-Meza et al., 2023).

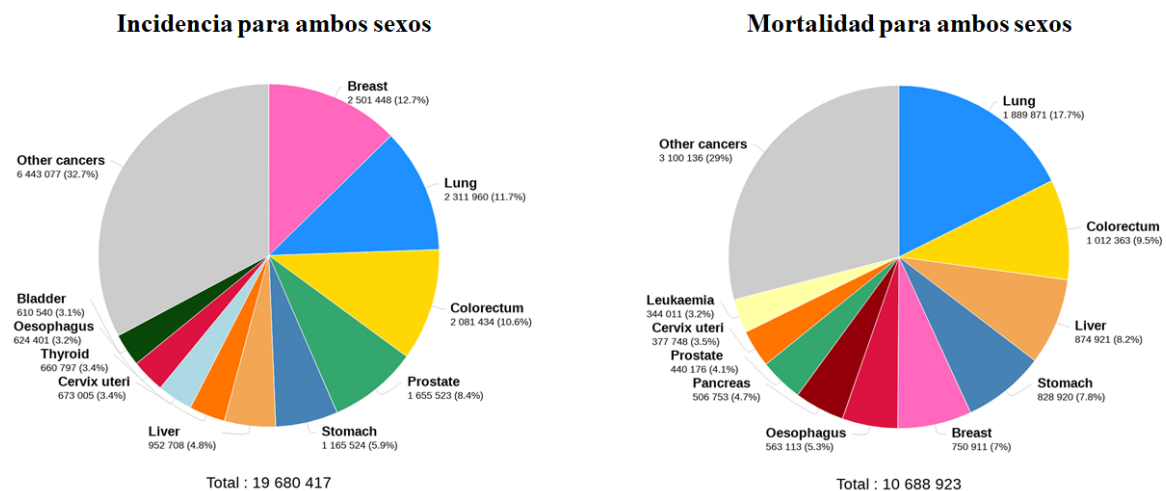


Figura 1. Incidencia y mortalidad de ambos sexos para México en 2020 (GLOBOCAN, 2020).

El cáncer colorrectal suele presentarse en un 70% como esporádico, el 20% como agrupación familiar y solo el 10% se asocia a síndromes hereditarios como la poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) (Lotfollahzadeh et al., 2022).

Actualmente se conoce que el CCR se encuentra fuertemente asociado tanto a factores ambientales como genéticos, la edad es el principal factor de riesgo, de ahí que la edad promedio de diagnóstico sea en personas mayores a 50 años, a pesar del aumento en adultos jóvenes. Existen otros factores de riesgo asociados a países desarrollados y en desarrollo como el estilo de vida occidental, donde hay un alto consumo de carnes rojas, sedentarismo, una dieta baja en fibra, consumo de tabaco, de alcohol, de bebidas azucaradas y obesidad (Center et al., 2009; Stintzing, 2014; Marley y Nan, 2016). Además, los antecedentes de cáncer colorrectal o de enfermedades intestinales inflamatorias como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn incrementan el riesgo a 3.7% y 2.5% respectivamente (Mármol et al., 2017).

2.1.2 Relación entre la inflamación y el cáncer colorrectal

Las enfermedades inflamatorias intestinales o IBD (Inflammatory Bowel Disease), incluyen a la enfermedad de Crohn (CD) y a la colitis ulcerosa (CU), ambas caracterizadas por una inflamación intestinal activa que compromete la integridad de la barrera epitelial (Zhang y Li, 2014).

La barrera epitelial se encuentra constituida por células caliciformes, secretoras de moco; células enteroendocrinas, secretoras de hormonas peptídicas involucradas en el trofismo celular, la reparación tisular, la angiogénesis, la diferenciación de los enterocitos y la polarización del eje cripta-vellosidades; y por las células de Paneth, secretoras de sustancias antimicrobianas y ubicadas en el fondo de las criptas de Lieberkuhn (Antoni et al., 2014; Salvo-Romero et al., 2015). Su función es actuar como una barrera semipermeable selectiva, ya que permite el paso de nutrientes, la absorción de agua e iones, la detección inmune, pues limita el transporte de antígenos, y evita la invasión de microorganismos lumbinales y sus

toxinas, garantizando así el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Vancamelbeke y Vermeire, 2017).

Desafortunadamente, la presencia de ciclos recurrentes de inflamación y reparación tisular, presentes en las IBD, generan un aumento en la permeabilidad de la barrera epitelial, la inducción de la alternancia genética, la desregulación de la respuesta inmune y de la microbiota intestinal, y el daño en el ADN provocado por una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas por los infiltrados inflamatorios, conduciendo así a daños en el epitelio y contribuyendo a la generación de displasias, de alto o bajo grado, desarrolladas principalmente en el colon pero también en áreas del recto que puede llegar a transformarse en cáncer colorrectal asociado a colitis (CAC). De manera que la presencia de las IBD se considera un factor que incrementa de 2 a 3 veces más el riesgo de aparición del cáncer colorrectal (CCR) (Rogler, 2014; Chen et al., 2016; Landy et al., 2016).

El CCR y el CAC comparten similitudes en cuanto a las alteraciones genéticas, como la inestabilidad cromosómica, la inestabilidad de microsatélites y la hipermetilación de las islas CpG de diversos genes de la mucosa (Long et al., 2017; Keller et al., 2019). Sin embargo, el orden cronológico en el ocurren los eventos es distinto (**Figura 2**), por ejemplo, mientras que en el CCR ocurre primero la mutación en el gen APC, en el CAC ocurre en etapas tardías. Lo mismo sucede para los genes TP53 y KRAS (Nagao-Kitamoto et al., 2022).

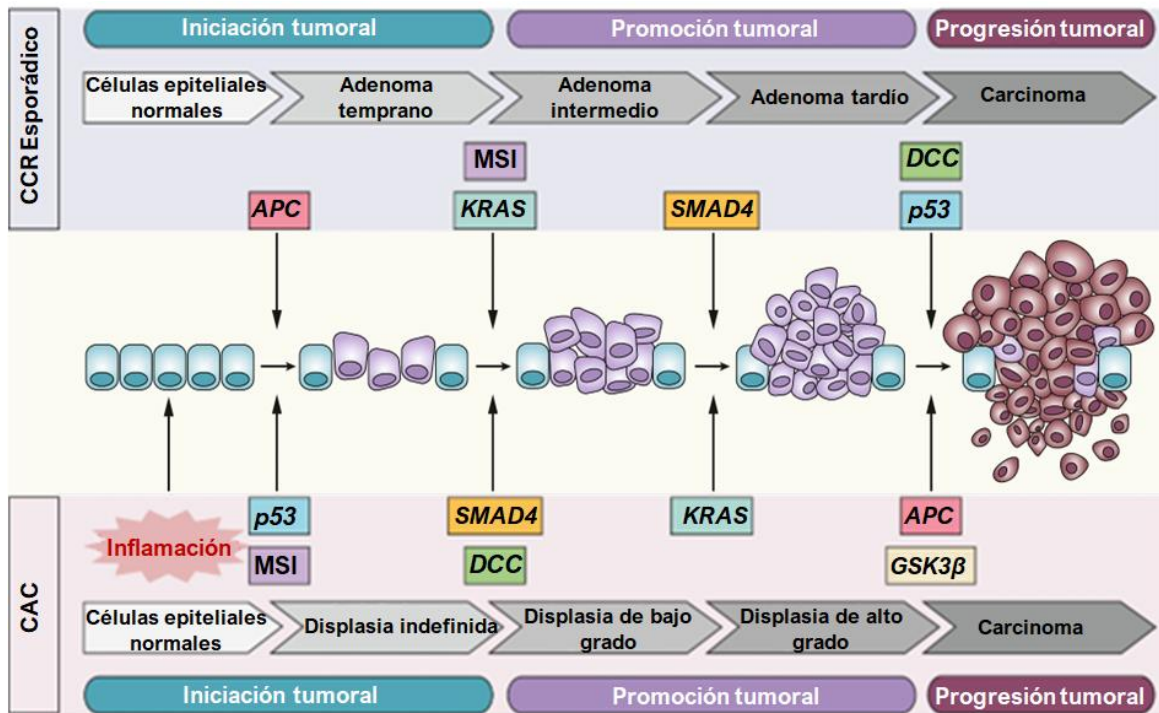


Figura 2. Progresión tumoral del cáncer de colon esporádico y el cáncer de colon asociado a colitis. **APC:** Poliposis adenomatosa coli; **DCC:** Supresor de cáncer colorrectal; **GSK3β:** Glucógeno sintasa quinasa-3β; **KRAS:** Virus del sarcoma de rata Kirsten; **MSI:** Inestabilidad de microsatélites. Tomado y modificado de Nagao-Kitamoto et al., 2022.

También, tras la pérdida de p53 se ve impulsada la activación de dos vías, la vía de STAT3 y la vía NF-κB, ambas se encuentran implicadas en los procesos inflamatorios y en el estrés oxidativo en las IBD, por lo que se encuentran activadas en más del 50% de los casos de CAC. La vía NF-κB promueve la transcripción de proteínas proinflamatorias como TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8 y COX2. Además, puede llegar a alterar la actividad de la caspasa 8 y estimular a Bcl2, Bcl-xl y cFLIP con lo que se promueve la evasión de la apoptosis. Por su parte, la vía de STAT3 aumenta la transcripción de Bcl2 y Bcl-xl, además de genes promotores de angiogénesis (VEGF) y de mitosis (Myc) (Schmitt y Greten, 2021; Peixoto et al., 2022).

Otra similitud entre ambos tipos de cáncer de colon es su origen a partir de la mucosa intestinal displásica. Si bien el CAC surge de una displasia plana, su desarrollo ocurre en una mucosa crónicamente inflamada que sigue la secuencia: displasia indefinida, displasia de bajo grado, displasia de alto grado y finalmente carcinoma. Mientras que el CCR surge de

pólipos, su desarrollo ocurre desde una displasia, que es transformada en adenoma temprano y progresa a carcinoma invasivo (Nishikawa et al., 2005; Nagao-Kitamoto et al., 2022).

2.2 LINFOCITOS T REGULADORES

Los linfocitos T reguladores o Tregs son un subgrupo de linfocitos T CD4+ especializados que desde el comienzo de su descripción a finales de la década de los 60's se les ha considerado como un posible blanco terapéutico. Estas células inmunitarias son cruciales para el mantenimiento de la autotolerancia, la inducción a la tolerancia de los aloinjertos, la reparación tisular, la regulación de la inflamación local, de la inmunidad fetoplacentaria y de la homeostasis, además, cuentan con la capacidad de activar o suprimir la función de otras células mediante la secreción de citocinas para la supresión de respuestas inmunitarias (**Figura 3**) (Serrano-Hernández, 2009; Li et al., 2015; Shevyrev y Tereshchenko, 2020).

Si bien el fenotipo de las Tregs es CD4+CD25+FoxP3+, pues expresan altas concentraciones del CD25, además de que FoxP3 es un factor de transcripción que define al linaje y por lo cual es considerado como su regulador maestro, estas no son las únicas células reguladoras pues existen otros dos subtipos CD4+, las Tr1 productoras de IL-10 y las Th3 productoras de TGF-β, no obstante, ambas carecen de la expresión de FoxP3 y sus roles fisiológicos no son tan amplios (Serrano-Hernández, 2009; Li et al., 2015; Zhao et al., 2017; Shevyrev y Tereshchenko, 2020; Zhong et al., 2021).

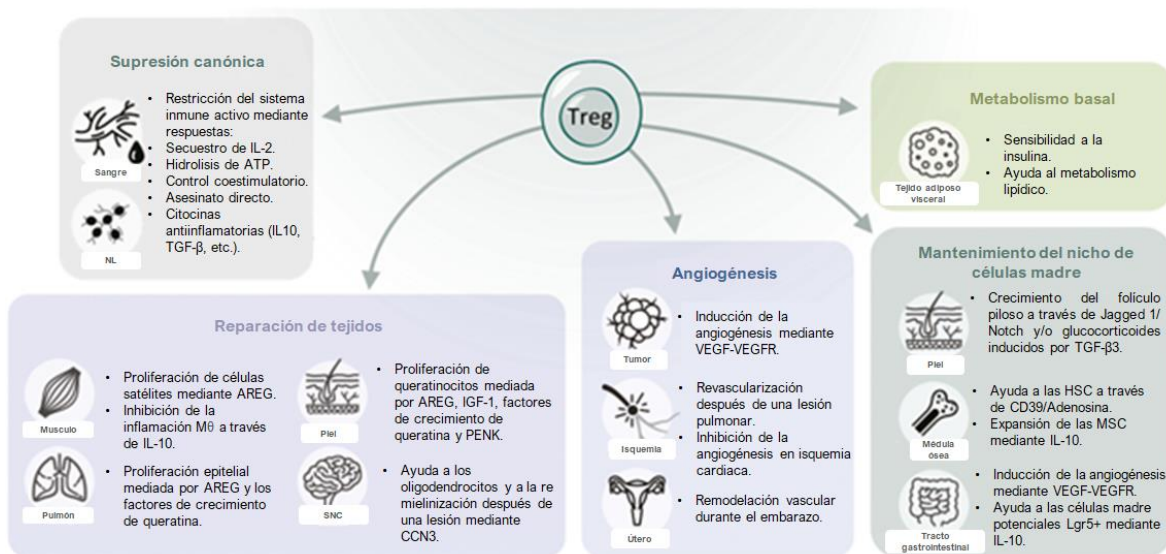


Figura 3. Funciones clásicas de los linfocitos Tregs y en tejidos. **AREG:** Anfiregulina; **PENK:** Proencefalina; **MSC:** Células mesenquimales estromales; **SNC:** Sistema Nervioso Central. Tomado y modificado de Astarita et al., 2023.

Las Tregs que expresan Foxp3 constituyen cerca de un 10% de todas las células CD4+ y gracias a que son una población heterogénea en cuanto a su sitio de maduración pueden ser clasificadas en dos grupos. Si su desarrollo hacia células maduras ocurre dentro del timo se conocerán como Tregs naturales o nTregs (**Figura 4a**), las cuales presentan un receptor de antígenos T (TCR) con una alta afinidad por los péptidos propios, expresan de manera constitutiva FoxP3 y son abundantes en el torrente sanguíneo y los ganglios linfáticos. El otro subgrupo son las iTregs o Tregs periféricas o inducidas (**Figura 4b**), su nombre se atribuye a que pueden ser generadas fuera del timo, ya sea en órganos linfáticos secundarios o inducirse mediante cultivo celular a partir linfocitos efectores CD4+ en presencia de IL-2, TGF- β y en condiciones particulares, permitiendo que sean funcionales por la ganancia de la expresión de FoxP3. La principal diferencia entre ambos grupos es la estabilidad de FoxP3, ya que en las iTregs es transitoria y bajo estímulos inflamatorios pueden diferenciarse hacia un fenotipo Th17. Sin embargo, la presencia de ambos grupos es esencial para conservar la homeostasis inmunitaria (Shevyrev y Tereshchenko, 2020).

Además de la expresión de citocinas y moléculas supresoras, las Tregs son capaces de liberar moléculas citotóxicas y eliminar las células inmunes proinflamatorias permitiendo contrarrestar la inflamación antitumoral, promover la diferenciación de células supresoras y favorecer la angiogénesis. Su papel en el cáncer ha sido controversial pues un aumento poblacional de estas células se ha correlacionado positivamente con la progresión de la enfermedad y bajas tasas de supervivencia en pacientes con cáncer, ya que los efectos de las Treg en diferentes tumores son específicos a antígenos, causando la activación y expansión de Treg en el microambiente tumoral (Ahmadzadeh et al., 2019; Najafi et al., 2019; Schiavon et al., 2019; Sun et al., 2020).

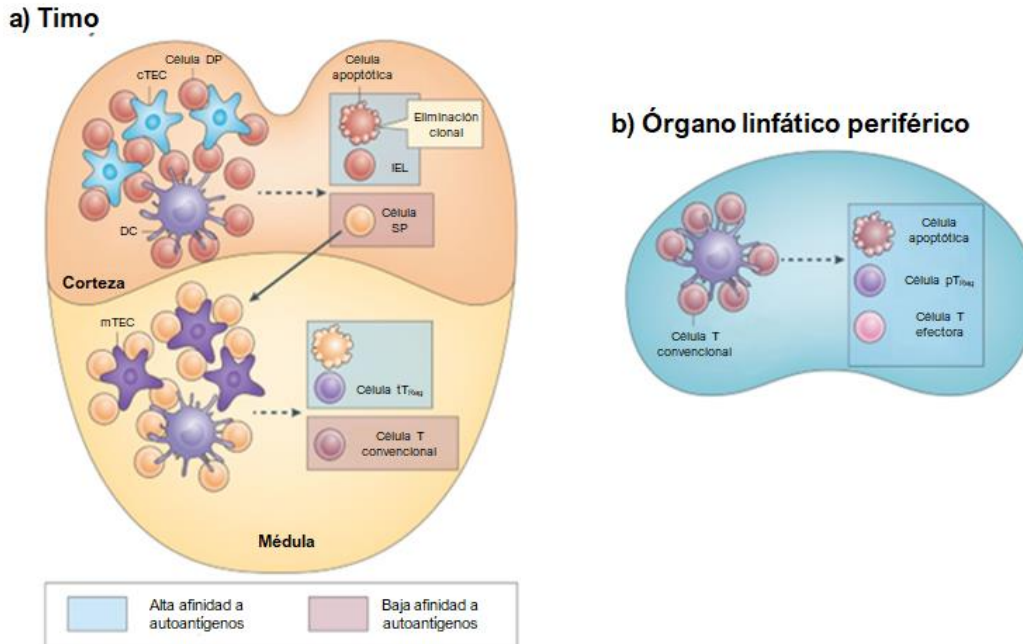


Figura 4. Sitios de diferenciación de los linfocitos T reguladores naturales e inducidos. **Célula DP:** Célula doble positiva; **Célula SP:** Célula simple positiva; **cTEC:** Células epiteliales tímicas corticales; **DC:** Células dendríticas; **IEL:** Linfocitos intraepiteliales intestinales; **mTEC:** Células epiteliales tímicas medulares. Tomado y modificado de Lin y Rudensky, 2016.

2.2.1 Linfocitos nTregs

Los linfocitos Treg naturales o tímicos fueron identificados por primera vez por Sakaguchi et al en 1995 como células doblemente positivas, CD4+CD25+. Como se mencionó anteriormente reciben ese nombre gracias a su diferenciación en el timo hacia células maduras mediante mecanismos de tolerancia central, siendo este momento donde se comprometen a este linaje. Al salir expresan el receptor CD45RA hasta que son capaces de encontrar un antígeno afín y proceden a ser activados en la periferia. Por otro lado, se ha reportado que en roedores componen cerca del 8 al 10% de los linfocitos que expresan el CD4+CD25+, mientras que en humanos algunos autores han estimado que es cercana entre 1 al 2% (Schmetterer et al., 2012; Himmel et al., 2013; Göschl et al., 2019).

Las nTregs cuentan con un receptor de antígenos T (TCR) $\alpha\beta$ diverso que es restringido a autoantígenos, su fenotipo es CD4+ CD25^{high}. Se conoce que constituyen un linaje estable

en un entorno dinámico, pues mantienen la expresión de FoxP3 y conservan su actividad supresora en ausencia de TGF- β , sin embargo, cuando se encuentran en presencia de condiciones inflamatorias esto cambia y se ha observado que en existencia de IL-6 su fenotipo se modifica hacia Th17 (Schiavon et al., 2019).

Cuando se encuentran en un estado de reposo expresan altos niveles de CD25, una baja expresión del CD127 y expresan FoxP3, con el TSDR (Región desmetilada específica de Tregs) desmetilado, el cual es una región rica en islas CpG del locus de FoxP3 que le brinda su estabilidad; además de que no son capaces de sintetizar IL-2 por lo que son anérgicos (Lin et al., 2013; Schiavon et al., 2019).

Dentro de los marcadores que nos permite distinguir esta población de las iTregs se encuentra una mayor expresión del CD25, PD-1 (Proteína de muerte celular programada 1), la expresión de Nrp1 (Neuropilina 1), del factor de transcripción Helios y del CD73. No obstante cuando una iTreg se encuentra en presencia de condiciones proinflamatorias pueden llegar a expresar Helios y Nrp1 (Lin et al., 2013; Schmitt y Williams, 2013; Li et al., 2015).

Además, se han correlacionado negativamente con las nTregs de memoria pues se ha observado que en un humano recién nacido el número de nTregs naïve componen una frecuencia cercana a un 75%, que posteriormente desciende en adultos a 32% y en ancianos puede llegar hasta el 18%, esto es contrario a lo que sucede con las nTregs de memoria pues en ancianos pueden llegar a tener una frecuencia del 81%, mientras que en recién nacidos componen cerca del 24% (Schiavon et al., 2019).

2.2.2 Linfocitos iTregs

Los linfocitos T reguladores inducidos o periféricos (iTregs) son linfocitos naïve o vírgenes que son diferenciados bajo la presencia de antígenos y el estímulo de IL-2 y TGF- β ya sea en tejidos linfoides periféricos, tanto en humanos como en ratones, o *in vitro*, mediante el aislamiento de linfocitos CD4+ de órganos linfoides o sangre periférica en los que se simulan las condiciones descritas anteriormente. Generalmente reconocen antígenos no patógenos, como aquellos que se encuentran en los alérgenos transmitidos por los alimentos o la microbiota comensal, aunque también participan en la supresión de las respuestas

inflamatorias localizadas, trasplantes de órganos, infecciones patógenas y en tumores (Himmel et al., 2013).

El proceso de transición de los linfocitos T naïve hacia iTregs requieren de una fuerte señalización en el TCR, una coestimulación subóptima, mediante el incremento de CTLA-4 y la disminución del CD28, la presencia de la IL-2 y TGF- β ; ambas citocinas cumplen con una función crucial en este proceso, pues inhiben la diferenciación hacia otros linajes como Th1, Th2 y Th17. Si bien adquieren atributos de las nTregs como la supresión inmunitaria, la presencia de una hipermetilación en el TSDR hace que pierdan rápidamente la expresión de FoxP3 y sean desdiferenciadas hacia células T efectoras, de manera que se han descrito como poseedoras de un fenotipo poco estable (Josefowicz et al., 2012; Sawant et al., 2014; Lin y Rudensky, 2016).

Los marcadores clásicos de estos linfocitos son la expresión de GITR (Receptor de TNF inducido por glucocorticoides), CTLA-4, FoxP3, una baja expresión de CD25, del Nrp 1 y Helios⁺, siendo estos últimos una de las diferencias sustanciales con las nTregs, aunque en condiciones homeostáticas normales, además de los cambios en el patrón de las marcas epigenéticas que le confieren su estabilidad. Asimismo, en 2012 Ohkura y colaboradores descubrieron que en las iTregs y Tcov los patrones de desmetilación de FoxP3, GITR, CTLA-4 y IKZF-4 eran distintos a los observados las nTregs (Lin et al., 2013; Sawant y Vignali, 2014).

Las iTregs presentan un gran atractivo como inmunoterapia gracias a que pueden generarse en grandes cantidades *ex vivo* y son funcionales *in vitro*, por lo que han sido consideradas como un posible tratamiento mediante transferencia adoptiva para trastornos autoinmunes como la artritis reumatoide, las IBD, diabetes, encefalitis autoinmune experimental, la tolerancia a los aloinjertos, entre muchos otros. Sin embargo, uno de los retos actuales es conservar su estabilidad *in vivo* por más tiempo (Schmitt y Williams, 2013; Inomata et al., 2016).

2.2.3. Mecanismos de supresión

Los mecanismos de supresión de los linfocitos Treg no son exclusivos de ellos, pero si colectivamente. Como se mencionó anteriormente son capaces de suprimir a un amplio número de células del sistema inmune, entre ellos se encuentran los linfocitos B, NK, NKT, CD4+, CD8+, monocitos y dendríticas, por mencionar algunos. Su descripción ha requerido de experimentos tanto *in vitro* como *ex vivo*, a través de los cuales se han clasificado en dependientes de contacto o humorales, específicos de antígeno o no específicos (**Figura. 5**) (Scmidht et al., 2012; Sheryrev y Tereshchenko, 2020).

- Uno de los mecanismos mejor estudiados de las Treg es la secreción de las citocinas inmunorreguladoras IL-10, TGF- β e IL-35.

La **IL-10** tiene como función la inhibición de los fagocitos, de la presentación de antígenos, de la expresión de moléculas coestimuladoras, de la proliferación de las células T, de la producción de citocinas inflamatorias como IL-12 e IFN γ y con ello la disminución de la diferenciación a linfocitos Th1. En cuanto a **TGF- β** , está es una citocina multifuncional que puede ser expresada tanto en la membrana celular como secretada por las Tregs. Dentro de sus funciones se encuentra la supresión de linfocitos T efectores, la inhibición de la diferenciación de linfocitos B y T, y de la actividad de los macrófagos, DC (Células dendríticas) y NK; la promoción del compromiso de las T naïve hacia Tregs o TH17, la maduración y diferenciación de DC y la inducción de IDO para la obtención de DC tolerogénicas. Además, tiene participación en la proliferación celular mediante el control de la expresión de factores reguladores del ciclo celular, p15, p21 y p27, y de los promotores de ciclo celular, cMYC, ciclina D2, CDK2 y ciclina E. Finalmente, la **IL-35** es una citocina que forma parte de la familia de la IL-12, se encuentra conformada por dos subunidades, p35 y EBI3 (Gen 3 del virus de Epstein-Barr), y es producida por las Treg. Cuenta con dos funciones importante, la supresión de la proliferación de células T CD4 y la promoción de la conversión de las T naïve hacia Tregs altamente supresoras (Cao et al., 2007; Guzmán-Flores y Portales-Pérez, 2013; Arce-Sillas et al., 2016; Sheryrev y Tereshchenko, 2020).

- La **IL-2** es la citocina principal para la proliferación de linfocitos T. Las Treg expresan un receptor de alta afinidad, el CD25 (IL-2R α), permitiendo así una competencia con otras células T en proliferación. Cuando se impide que esta citocina esté disponible en el microambiente para las células T efectoras, se afecta negativamente la respuesta proliferativa por lo que se conduce a una interrupción metabólica y finalmente a una muerte celular (Arce-Sillas et al, 2016; Sheryrev y Tereshchenko, 2020).
- La **citólisis de perforina-granzima** es un mecanismo de contacto donde se le confiere a la Treg el funcionamiento de una célula T citotóxica clásica. Esto se debe a que durante la interacción Treg-Célula efectora ocurre una endocitosis de los gránulos de las Tregs hacia el espacio extracelular. Estos gránulos se componen de perforinas y granzimas. La perforina tiene como función la formación de poros en la membrana de la célula diana a través de los cuales ingresará la granzima B. Una vez dentro, la granzima B induce la apoptosis mediante mecanismo dependientes o independientes de caspasas. No obstante, no todos los linfocitos Treg expresan el mismo tipo de granzima, ya que las nTreg actúan con la granzima A, mientras que las iTregs lo hacen con la granzima B (Arce-Sillas et al., 2016; Li et al., 2020; Sheryrev y Tereshchenko, 2020)
- La **degradación de ATP en adenosina** mediada por CD39 (ENTPD1) /CD73 (NT5E) es un mecanismo no específico de antígeno de las Treg donde el CD39 va a degradar al ATP en AMP, cuando esté sale de la célula es degradado rápidamente por el CD73 y convertido en adenosina. Cuando la adenosina se une a su receptor principal el A2AR, presente en linfocitos T, B, NK, macrófagos, DC y granulocitos; su estimulación genera una acumulación de AMP intracelular. El AMP puede activar a CREB y regular de forma indirecta la transcripción de genes inflamatorios, lo que le permite suprimir la expresión de citocinas inflamatorias; también puede llegar a activar a EPAC1, ERK o a JNK y alterar la expresión de genes proinflamatorios. Por otro lado, el incremento de adenosina en el microambiente conduce a la inhibición de la presentación de antígenos de las DC y la supresión de la proliferación de

linfocitos T activados. Además, las Treg pueden usarla de forma autocrina para optimizar la producción de citocinas antiinflamatorias y para la inhibición de la activación de células efectoras y de la expresión de moléculas coestimuladoras (Arce-Sillas et al., 2016; Sheryrev y Tereshchenko, 2020).

- La proteína de membrana **CTLA-4** (Antígeno-4 asociado al Linfocito T citotóxico) es una molécula coinhibidora que se expresa en la superficie de las Tregs tras su activación. CTLA-4 tiene una gran afinidad por los ligandos CD80/86 de las DC y tras esta interacción ocurre un fenómeno llamado transendocitosis, el cual consiste en que CTLA-4 captura a CD80/86, lo internaliza por medio de endocitosis mediada por células T y lo degrada en los lisosomas, con la finalidad de limitar la disponibilidad de ligandos para el CD28, inhibiendo así la activación de linfocitos T.

Además, esta interacción implica la producción de IFN- γ y de **IDO** (Inductor de la indoleamino 2,3-dioxigenasa), este último degrada al triptófano que en su deficiencia conduce a una detención del ciclo celular en la fase G1 y, por lo tanto, un estado de anergia para las células T efectoras. Por otra parte, los metabolitos resultantes de su degradación inducen apoptosis en linfocitos Th1 y pueden generar un agotamiento del glutatión promoviendo un desequilibrio en la producción de ROS y la capacidad antioxidante, favoreciendo así el estrés oxidativo y con ello un colapso de la función mitocondrial, dirigiendo a la célula a apoptosis tras una deficiencia en la producción energética (Siachoque et al., 2011; Guzmán-Flores y Portales-Pérez, 2013; Arce-Sillas et al., 2016; Kennedy et al., 2022).

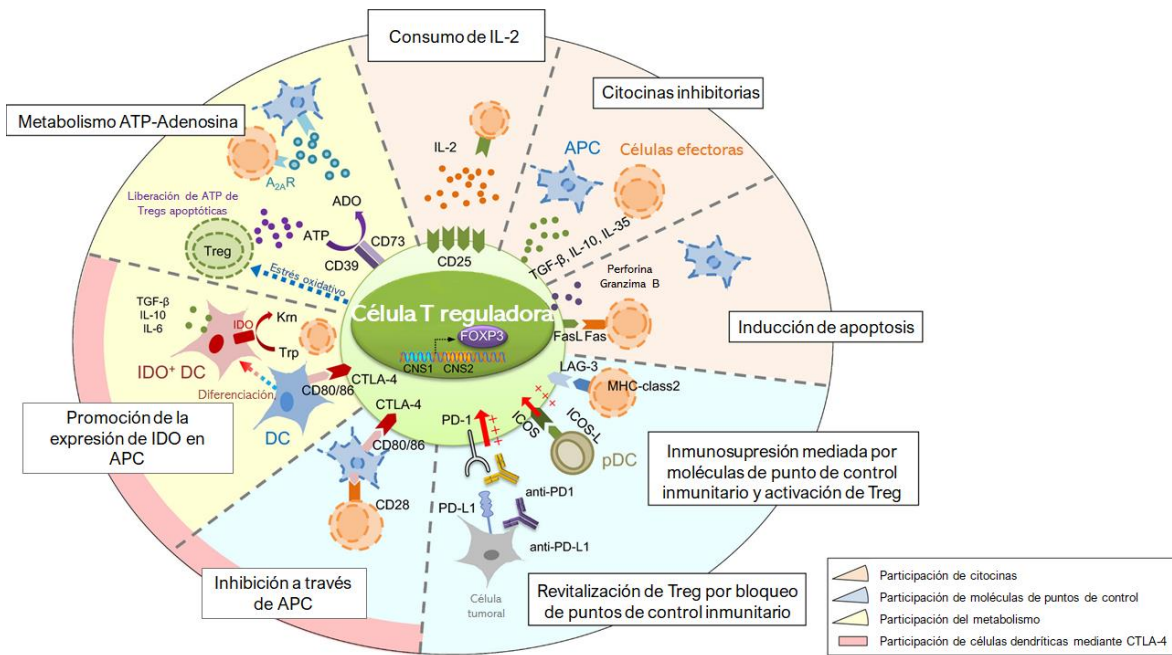


Figura 5. Mecanismos de supresión de las Tregs. Tomado y modificado de Ohue y Nishikawa, 2019.

2.2.4 Transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT6) y FoxP3

El factor de transcripción Foxp3 fue identificado por primera vez en el año 2003, permitiendo avances sustanciales en los estudios de los linfocitos Tregs, debido a su reconocimiento como nuevo marcador y el papel que desempeña en la diferenciación, función y supervivencia (Li et al., 2015). Pertenece a la familia Fox, también conocida como forkhead box, caracterizada por presentar un grupo de factores de transcripción altamente conservados evolutivamente y con numerosas funciones durante el desarrollo y la vida adulta. Las alteraciones en estas proteínas afectan a muchas cascadas moleculares por lo que se les relaciona con distintos tipos de cánceres (Li et al., 2015; Laissue, 2019).

Se encuentra ubicado en el cromosoma X, en la región cromosómica XP11.23. El gen humano presenta un 86% de homología con el de tipo murino. Este gen se encuentra expresado en órganos linfoides como el timo, bazo y ganglios linfáticos y en células CD4+CD25+ (González-Parias et al., 2010).

Su transcripción se ve mediada por la activación del receptor TCR, la persistencia de estas señales son las que ocasionan la activación de FoxP3 en los timocitos autorreactivos. Posteriormente, se busca la estabilización de la expresión de este gen para activar la función supresora de las células Treg y consolidar su diferenciación. Las regiones CNS1, CNS2 y CNS3 de Foxp3 generalmente se encuentran desmetiladas y se ven implicadas en el desarrollo celular. Además, la desmetilación parcial de la región CNS2 se considera una firma epigenética que se ve completada en linfocitos maduros. Por otro lado, los niveles altos de IL-4 inhiben la expresión de las iTregs debido a la supresión de FoxP3. Ya que el promotor de FoxP3 cuenta con una región silenciadora para IL-4 promoviendo que la cromatina se encuentre cerrada, pero en presencia de TGF- β suceda lo contrario. Por lo anterior, es que se ha propuesto que tanto STAT6 como GATA3 podrían cumplir con un papel en la inhibición independiente de FoxP3 en las etapas tempranas del compromiso hacia el linaje (Takaki et al., 2008; Toker, 2013; Colamatteo et al., 2020).

2.2.5 Participación de STAT6 en el desarrollo de los linfocitos Tregs

STAT6 pertenece a una familia de factores de transcripción que cuentan con una estructura y función similar, que son esenciales para la diferenciación de linfocitos T. Los miembros de esta familia son fosforilados por las quinasas asociadas a receptor en respuesta a las citocinas y factores de crecimiento, con la finalidad de formar homo o heterodímeros que son trasladados al núcleo celular para actuar como transcriptores (**Figura 6**). STAT6 es activado por la vía de señalización de IL-4 e IL-13, y cumple con una función clave en la diferenciación del linaje Th2, responsables de las respuestas de hipersensibilidad y contra los parásitos helmintos, como un activador transduccional e inductor. Se ha observado que STAT6 cumple con un papel importante en la prevención del rechazo de los aloinjertos, porque lo que se le ha relacionado con los linfocitos Treg (Chu et al., 2021; Karpathiou et al., 2021).

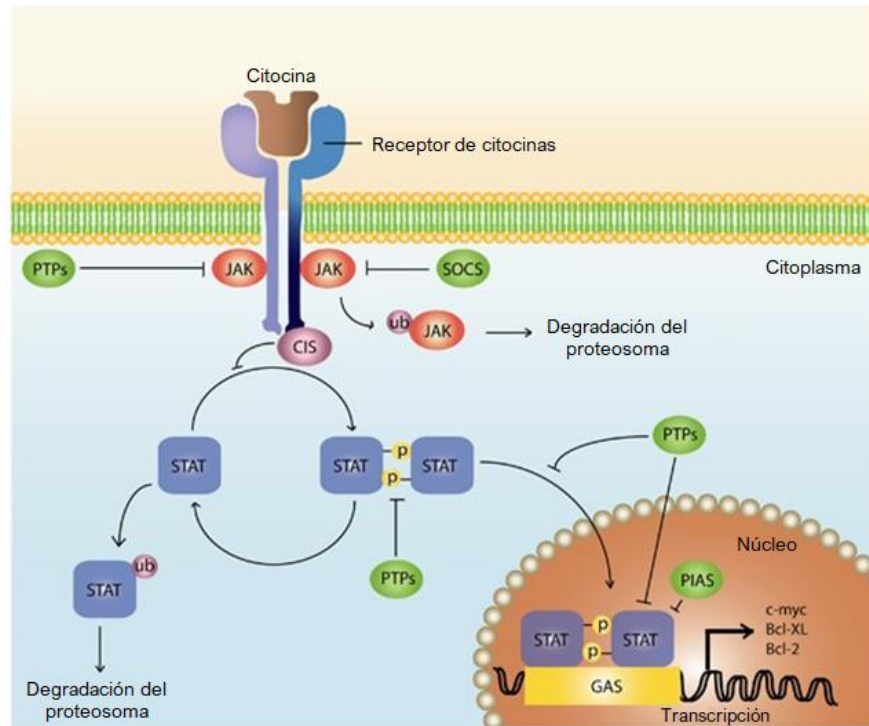


Figura 6. Activación y regulación de la vía de señalización JAK/STAT. **CIS:** Dominio SH2 inducido por citoquinas; **GAS:** Secuencia activadora γ ; **JAK:** Janus quinasa; **PIAS:** Proteína inhibidora de STAT activada; **PTP:** Tirosina fosfatasa; **SOCS:** Supresor de la señalización de citoquinas; **STAT:** Factor de transcripción de señales y activador de la transcripción.; **ub:** Ubiquitinación. Tomado y modificado de Morales et al, 2010.

STAT6 se considera clave en la vía de señalización de IL-4, quién es el activador y río abajo de STAT6, pues cuenta con efectos estimulantes e inhibidores del desarrollo y mantenimiento de las células Treg, ya que puede llegar a inhibir la función de estas células al interferir con la estabilidad de FoxP3 (Maerten et al., 2005; Pillemer et al., 2009). Se conoce que la deficiencia de STAT6 anula la capacidad de IL-4 para inducir la expresión de muchos genes, lo que representa una pérdida de función (Kaplan et al., 1996; Bruns et al., 2003).

Si bien se ha visto que dentro del cáncer la vía de señalización de STAT6 se encuentra altamente activada en distintos tipos de tumores, como linfomas, pulmón y próstata, y se ha demostrado que presenta un papel importante en la metástasis de cáncer colorrectal y de melanoma; esto se debe a los distintos procesos en los que se ve involucrado como lo es la proliferación de células cancerosas, la resistencia a la apoptosis y la metástasis. STAT6 es un factor de transcripción que, tras la persistencia de su activación mediada por las respuestas

inmunitarias, la inflamación y la proliferación en células malignas, genera una disminución de la inmunidad antitumoral y con ello un mal pronóstico en cánceres humanos, por lo que es considerado como un biomarcador específico para distinguir y diagnosticar fenotipos tumorales (Fu et al., 2019; Delgado-Ramírez et al., 2020). En modelos murinos STAT6^{-/-} de cáncer de mama se presenta una resistencia 10 veces mayor a este tipo de cáncer que en lo observado en los ratones de tipo WT. Un fenómeno similar sucede para un modelo de CAC inducido por AOM/DSS, ya que tanto en ratones STAT6^{-/-} como en ratones WT con el inhibidor AS1517499 para STAT6 ocurre una supresión de la progresión tumoral debido a un aumento en la apoptosis y en la disminución de la proliferación de las células epiteliales (León-Cabrera et al., 2017; Fu et al., 2019).

Lo anterior se ha atribuido a que la expresión de STAT6 reduce el número de células Treg, mientras que su deficiencia previene la tumorigénesis, pues reduce la infiltración de las células inflamatorias y regula a la baja a los mediadores inflamatorios. Sin embargo, tras el agotamiento de las células Treg en las etapas primarias del CAC se restablece la inflamación crónica extensa. El aumento de esta población induce una resistencia contra la inflamación y detiene la tumorigénesis en animales deficientes en STAT6 (Delgado-Ramírez et al, 2021). *In vitro* se ha observado que las iTregs deficientes en STAT6 conservan un fenotipo estable durante más tiempo, 15 días, en comparación con las iTregs WT, incluso en presencia de IL-6. Además de una mayor capacidad supresora debido a la sobreexpresión de PD-1, CTLA-4 y FoxP3, y una baja expresión de la IFN- γ . Cabe destacar que la región TSDR de estos linfocitos presenta un mayor estado de desmetilación. Lo anterior ha sugerido que STAT6 podría relacionarse con la inducción, estabilidad y capacidad supresora de las iTregs (Arroyo-Olarte et al., 2023).

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer colorrectal es la segunda neoplasia más mortal en el mundo, asociada a un gran número de factores tanto ambientales como genéticos, con un incremento notable en adultos jóvenes. Actualmente, muchos de los tratamientos utilizados comprometen la calidad de vida del paciente, pues el método más utilizado en la clínica es la resección de colon, además de los estragos ocasionados por las terapias actuales, por lo que es necesario encontrar nuevos tratamientos.

En investigación básica se ha observado que la deficiencia de STAT6 en modelos murinos *in vivo* reduce la infiltración de células inflamatorias y regula a la baja a los mediadores inflamatorios gracias a un incremento de las células Treg durante las etapas primarias del CAC, deteniendo así la tumorigénesis. Además, en experimentos *in vitro* los linfocitos iTregs deficientes en STAT6 presentan una mayor estabilidad fenotípica, hasta por 15 días, y una capacidad supresora superior a las Tregs WT inducidas gracias a una sobreexpresión de PD-1, CTLA-4 y FoxP3.

Por lo tanto, es necesario analizar la capacidad supresora de los linfocitos iTregs deficientes en STAT6 en un modelo de CAC *in vivo* mediante ensayos de transferencia adoptiva con la finalidad del desarrollo de una posible inmunoterapia.

4. HIPÓTESIS

La transferencia de las células Treg inducidas *in vitro* en deficiencia de STAT6, disminuirán la patología del CAC al ser administradas durante las primeras etapas de la progresión tumoral.

5. OBJETIVOS

GENERAL

Estudiar el potencial terapéutico de las células Treg inducidas en ausencia de STAT6 durante el CAC *in vivo*.

PARTICULARES

1. Obtener células CD4 de ratones STAT6^{+/+}FoxP3^{EGFP} y STAT6^{-/-}FoxP3^{EGFP} Knock-in y diferenciarlas *in vitro* hacia células Treg.
2. Determinar y cuantificar la viabilidad celular, la expresión e intensidad de FoxP3 y CD25 en células Treg diferenciadas en deficiencia de STAT6.
3. Administrar células Treg diferenciadas *in vitro* como tratamiento durante las primeras etapas del CAC en un modelo experimental *in vivo*.
4. Monitorear el desarrollo de la patología y la mortalidad de los ratones que recibieron el tratamiento.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron ratones macho, de tipo silvestre (WT) de fondo genético BALB/c de 8 a 10 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos en el Bioterio de la Fes-Iztacala, UNAM.

Los ratones fueron distribuidos en tres grupos experimentales. El grupo AOM/DSS consistió en 4 ratones a los que se les administró únicamente AOM/DSS. El grupo AOM/DSS Tregs WT se constituyó de 3 ratones que recibieron AOM/DSS más la administración del tratamiento de linfocitos Tregs WT, provenientes de ratones de la cepa FoxP3^{EGFP} y diferenciados *in vitro*. El último grupo AOM/DSS Tregs STAT6^{-/-} consistió en 3 ratones que recibieron AOM/DSS más la administración de linfocitos Tregs STAT6^{-/-}, provenientes de ratones de la cepa doble transgénico STAT6^{-/-} FoxP3^{EGFP} y diferenciados *in vitro*. Este experimento fue realizado en dos ocasiones.

Grupos experimentales

<i>Grupos experimentales</i>	<i>n</i>
AOM/DSS	4
AOM/DSS Tregs WT	3
AOM/DSS Tregs STAT6 ^{-/-}	3

Tabla 1. Distribución de los ratones en los grupos experimentales.

6.2 GENOTIPIFICACIÓN DE RATONES STAT6^{-/-}FoxP3^{EGFP}

La genotipificación de los ratones STAT6^{-/-}FoxP3^{EGFP} se realizó utilizando ADN obtenido de cortar la punta de la cola de los animales (0.5 mm).

Cada una de las colas se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se agregaron 288 µL de buffer de proteinasa K y 6 µL de proteinasa K (20mg/mL). Las muestras se dejaron incubar toda la noche a 56°C. Al día siguiente fueron centrifugadas a 13 000 rpm a temperatura ambiente por 10 min con la finalidad de eliminar los restos celulares. Los sobrenadantes fueron recuperados en tubos nuevos.

Para precipitar el ADN se les agregaron 500 µL de isopropanol frío y se incubaron a -20 °C por 2 h. Después fueron centrifugadas a 13 000 rpm a 4 °C por 10 min y se recuperó la pastilla

por inversión. El lavado de la pastilla se realizó con etanol frío al 75%, fueron resuspendidas y centrifugadas a 13 000 rpm a 4 °C por 10 min. Se realizó un lavado adicional con etanol frío al 75% y fueron centrifugadas por solo 5 min. Las pastillas se dejaron secar hasta eliminar los restos de etanol. Finalmente fueron resuspendidas en agua inyectable estéril tibia en un volumen de 50 a 100 µL, dependiendo del tamaño de esta.

El ADN obtenido se cuantificó en un nanofotómetro NP80 (Implen) o en un EpochTM Multi-Volume multi-sample Spectrophotometer System (Biotek). Se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Para la genotipificación se realizó una PCR de punto final (**Tabla 2, 3 y 4**) de 35 ciclos utilizando el ADN previamente obtenido.

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

Tabla 2. Secuencia de primers utilizados para la genotipificación de la cepa doble transgénico (Rivera-Rugeles, 2022).

STAT6		FoxP3	
Reactivo	1x (µL)	Reactivo	1x (µL)
H ₂ O	9.36	H ₂ O	9.36
Buffer con detergente	1.5	Buffer con detergente	1.5
MgCl ₂	1.2	MgCl ₂	1.2
dNTP's	0.12	dNTP's	0.12
Primer _{WT}	0.6	Primer _F	0.6
Primer _C	0.6	Primer _R	0.6
Primer _M	0.6	FirePol Polimerasa	0.12
FirePol Polimerasa	0.12	ADN	1.5
ADN	1.5	Total	15
Total	15		

Tabla 3. Proporciones de los reactivos para una reacción de PCR de punto final para los genes FoxP3 y STAT6.

	FoxP3	STAT6	Tiempo
<i>Incubación inicial</i>	94 °C	94 °C	2:30
<i>Desnaturalización</i>	95 °C	95 °C	0:30
<i>Alineación</i>	60 °C	58 °C	0:30
<i>Extensión</i>	72 °C	72 °C	0:30
<i>Extensión final</i>	72 °C	72 °C	7:00

Tabla 4. Condiciones de la PCR de punto final para los genes FoxP3 y STAT6.

Finalmente, se hizo una electroforesis de gel agarosa al 1.6% y TBE al 1x, utilizando como revelador EcoStain. En cada pozo se le agregaron 10 μ L de muestra, así como 2 μ L de buffer de carga. Las condiciones fueron 100v por 30 min.

6.3 DIFERENCIACIÓN A LINFOCITOS T REGULADORES

6.3.1 Obtención de esplenocitos

Para la obtención de esplenocitos se extrajo el bazo de ratones macho donantes de las cepas STAT6^{-/-}FoxP3^{EGFP} y STAT6^{+/+}FoxP3^{EGFP} de 7 a 9 semanas de edad. El bazo se colocó en una caja Petri con organza y 5 mL de medio RPMI Medium 1640, este fue macerado con el émbolo de una jeringa. El medio con células fue recuperado y centrifugado a 1500 rpm a 4 °C por 10 min. Para lisis de eritrocitos se agregaron 5 mL de solución hemolizante y se incubó en agitación por 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 5 mL de medio de cultivo incompleto para parar la reacción. Las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 3 mL de medio de cultivo incompleto, volvieron a centrifugarse y se resuspendieron en 5 mL de medio de cultivo completo.

Finalmente, las células fueron cuantificadas en la cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad mediante la prueba de azul de tripano.

6.3.2 Obtención de linfocitos CD4 totales

Los linfocitos CD4 totales fueron obtenidos a partir de 50×10^6 esplenocitos de cada una de las cepas mencionadas anteriormente. Mediante separación magnética utilizando el kit de

separación celular CD4⁺ T cells isolation Kit Mouse de Miltenyi Biotec, la columna LS de Miltenyi Biotec y el separador Midi MACS™, siguiendo las especificaciones del fabricante.

6.3.3 Diferenciación de linfocitos CD4 hacia Tregs

Se utilizaron placas de fondo plano de 96 pozos previamente tratadas con anti-CD3 (3 µg/mL) para el cultivo. Se sembraron 200 000 células por pozo con medio de cultivo de diferenciación (Medio de cultivo RPMI completo + Anti-CD28 (1 µg/mL) + Rm-IL-2 (100 u/mL) + Rh-TGF-β (5 ng/mL), en condiciones de 37 °C y a un 5% de CO₂.

Para analizar su estado de diferenciación al quinto día del cultivo fueron recolectadas, centrifugadas a 1 500 rpm a 4 °C por 10 min y resuspendidas en 1 mL de medio de expansión. Posteriormente, fueron cuantificadas en la cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad con la prueba de azul tripano. Finalmente, se sembraron 2x10⁵ células por pozo en placas nuevas y se les agrego medio de expansión hasta un volumen de 200 µL con la finalidad de expandirlas durante tres días más.

6.4 CITOMETRÍA DE FLUJO

Tras la recolección de los linfocitos se realizó un pool y se obtuvieron suspensiones celulares de 1x10⁶ células de cada uno de los cultivos. Los linfocitos fueron centrifugados a 1 500 rpm a 4 °C por 10 min, resuspendidos en anti-CD16/32 (Biolegend, 101301) e incubados durante 15 min a 4 °C en oscuridad. Después fueron incubados por segunda vez con los anticuerpos anti-CD4-APC (Biolegend, 100412) y anti-CD25-BV-711 (Biolegend, 109104), por 30 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente las células fueron lavadas e incubadas con 7AAD (MERCK) durante 10 min más.

Las células fueron lavadas nuevamente y resuspendidas en 350 µL FACS. Las muestras fueron leídas en un citómetro de flujo Attune™ NxT (BD) del Laboratorio Nacional en Salud de la FES Iztacala y analizadas en el software FlowJoV10.

Anticuerpo	Información	Descripción
<i>Anti-CD4-APC</i>	<i>APC anti-mouse CD4.</i> Clona: GK1.5. Isotipo: Rat IgG2b, κ. BioLegend, (100412).	Ig expresada principalmente en timocitos, subconjuntos de células T, pero en menor proporción en macrófagos y células dendríticas.
<i>Anti-CD25-BV-711</i>	<i>Brilliant Violet 605 anti-mouse CD25.</i> Clona: PC61 Isotipo: Rat IgG1, λ BioLegend (109104).	Glicoproteína presente en células B y T activadas, subconjuntos de timocitos, células pre-B y linfocitos T reguladores.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en la citometría de flujo (BioLegend, 2012).

6.5 AISLAMIENTO POR CELL SORTER

Pasados los 8 días del cultivo las células fueron recuperadas de las placas y centrifugadas a 1 500 rpm a 4 °C por 10 min. Las células fueron incubadas con 7AAD (MERCK) durante 10 min a 4 °C en oscuridad con la finalidad de obtener la viabilidad. Posteriormente se agregó 1 mL de medio RPMI completo. Se obtuvo el número de células con la cámara de Neubauer y la viabilidad mediante la prueba de azul de tripano.

Las células fueron aisladas con un Cell Sorter FACS ARIA FUSION (BD) del Laboratorio Nacional en Salud y con el Cell Sorter InfluxTM (BD) del Hospital General de México “Eduardo Liceaga”, a partir de la expresión de EGFP. Las células obtenidas se mantuvieron en 1 mL de medio RPMI completo hasta su uso.

6.6 INDUCCIÓN DEL MODELO DE AOM/DSS

La inducción del cáncer colorrectal asociado a colitis se realizó a través del modelo de AOM/DSS. Los ratones fueron inyectados con 12.5 mg/Kg de Azoximetano (AOM) por vía intraperitoneal. Pasados 5 días se les administró una solución de Dextrán Sulfato de Sodio (DSS) al 2% en agua potable durante 7 días. Posteriormente recibieron un periodo de descanso de 15 días en el que recibieron solo agua potable. El periodo de DSS y sólo agua potable fue realizado en tres ocasiones. Los ratones fueron sacrificados en el día 71 del modelo.

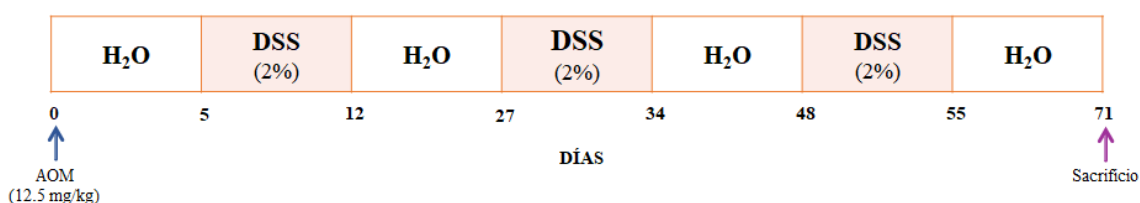


Figura 7. Cronograma del modelo de AOM/DSS. En él se señala el día de la inducción del AOM y el día del sacrificio de los grupos experimentales.

6.7 TRANSFERENCIA CELULAR ADOPTIVA

Los linfocitos Tregs aislados en medio RPMI fueron centrifugados a 1 500 rpm a 4 °C por 10 min y resuspendidas en 180 µL de solución salina fisiológica. La administración se realizó con jeringas de insulina ultrafinas de 13 mm en un volumen de 60 µL por vía intravenosa. La transferencia adoptiva se realizó con 2.6×10^5 a 3.5×10^5 Tregs, los días 13, 27 y 41 del modelo de AOM/DSS.

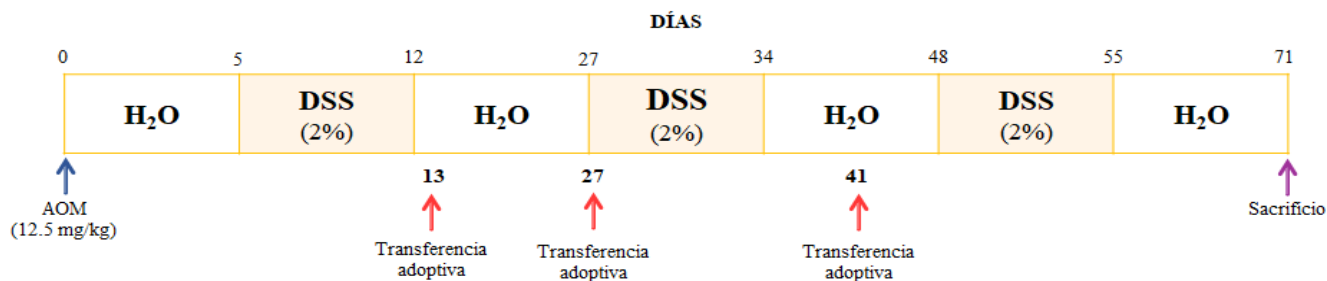


Figura 8. Cronograma de los días de transferencia adoptiva en el modelo de AOM/DSS.

6.8 VALORACIÓN DE LA COLITIS Y PROGRESIÓN TUMORAL

6.8.1 Índice de daño de la enfermedad

A lo largo del modelo se evaluó el índice de daño de la enfermedad (DAI) a través de mediciones realizadas durante la semana. Se usó una versión modificada de los criterios descritos por Murthy et al, 1993 y Kim et al, 2013. Los parámetros utilizados contemplan la consistencia de heces, pérdida de peso, en el que se considera el primer peso del ratón como el 100%, y presencia o ausencia de sangre en heces o recto. Una vez obtenida la puntuación de cada uno de los parámetros, fueron sumados y divididos entre 4 para la obtención del DAI.

Puntuación	Pérdida de peso (%)	Consistencia de las heces	Sangrado rectal
0	Sin pérdida	Normal	Sin sangrado
1	1 - 5	Ligeramente blanda	Sangre oculta en heces
2	5 - 10	Muy blanda	Sangre visible en heces
3	10 - 15	Diarrea ligera	Sangrado rectal ligero
4	> 15	Diarrea aguda	Sangrado rectal grave

Tabla 6. Parámetros y puntajes para la obtención del índice de daño de la enfermedad (Kim et al., 2013).

6.9 SACRIFICIO

El sacrificio se llevó a cabo en el día 71 del experimento. Los ratones fueron sacrificados mediante punción cardíaca y empapados en etanol al 70%, con la finalidad de evitar contaminación por pelo. De ellos se extrajo el colon completo, desde el ano hasta el ciego.

El colon fue perfundido con solución salina fisiológica para eliminar la mayor parte de la materia fecal; se obtuvo un registro de la longitud con un vernier. Posteriormente se abrió longitudinalmente, se realizó un conteo del número y tamaño de los tumores, y se fotografió.

Se cortó 1 cm de la región distal del colon y se fijó en etanol absoluto para el análisis histológico, la siguiente sección se almacenó en TRIZOL a -80 °C para la obtención de ARN.

6.10 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Las muestras se fijaron en alcohol absoluto durante 24 h, con la finalidad de evitar un deterioro de las biopsias y por tanto la pérdida de la estructura del tejido por procesos como la autólisis.

Pasado el tiempo de la fijación, los tejidos fueron introducidos en cassetes de histología y se llevó a cabo el proceso de deshidratación del tejido, el cual fue realizado en tres alcoholes absolutos de 1 h cada uno. El aclaramiento o diafanización se realizó en tres xiloles de 1 h cada uno. Finalmente, para la inclusión se realizaron tres parafinas a 59 °C de 1 h cada una. Las muestras fueron llevadas a la central de inclusión donde fueron embebidas en bloques de parafina.

A partir de los bloques de parafina se realizaron cortes de 5 µm de cada uno de los intestinos en un microtomo (Leica RM 2125RT), los cuales fueron extendidos en el baño de flotación a 35 °C y adheridos a portaobjetos con polyisina al 10%. Las laminillas fueron utilizadas para las tinciones de hematoxilina-eosina y azul alcian.

6.10.1 Tinción de Hematoxilina-Eosina

La tinción de hematoxilina-eosina se utilizó para observar la morfología de los tejidos, así como los cambios que pudieron presentar. La hematoxilina al ser oxidada y transformada en hemateina tiñe las estructuras ácidas, la cromatina nuclear, en color azul y morado. Por su parte, la eosina tiñe los componentes citoplasmáticos como las fibrinas y el colágeno del citoplasma, además de la materia extracelular con una gradación de coloraciones en rosa (Montalvo-Arenas, 2010).

En un principio las laminillas fueron calentadas con un encendedor por unos segundos, para eliminar el exceso de parafina. Posteriormente se siguió el siguiente tren de tinción: Dos baños de xilol (5 min), OH-Xilol (3 min), OH 100% (2 min), OH 90% (2 min), OH 80% (2 min), OH 70% (2 min), Hematoxilina de Harris (1:30 min), Agua destilada y agua corriente

(Eliminación de exceso del colorante), OH ácido (2 lavados), Agua amoniacal (1 lavado), Agua destilada (1 lavado), Eosina amarillenta (1:30 min), Agua destilada y agua corriente (Eliminación del colorante), OH 70% (2 min), OH 80% (2 min), OH 90% (2 min), OH 100% (2 min), OH Xilol (2 min), Xilol 2 (10 min) y Xilol 1 (5 min).

El montaje de los tejidos se realizó con Entellan y cubreobjetos de 24x50mm.

6.10.1.1 Índice de daño histopatológico

Se realizó un análisis de daño histopatológico utilizando una versión modificada de los parámetros descritos por He et al., 2019 y el análisis fotográfico de Koelink et al., 2018. En ellos se contempla el daño en la estructura de las criptas, edema en la submucosa y el infiltrado de células inflamatorias. Una vez obtenida la puntuación de cada uno de los parámetros, fueron sumados y divididos entre 3 para la obtención del análisis.

Puntuación	0	1	2	3
Daño en la arquitectura de las criptas	Ninguno	Regeneración	Destrucción	Ulceración
Edema en la submucosa	Ninguno	Ligero	Moderado	Severo
Infiltración de célula inflamatorias	Ausente/Raro	Lámina propia	Submucosa	Capa muscular

Tabla 7. Parámetros y puntajes considerados para el índice de daño histopatológico. Tomado y modificado de He et al., 2019.

6.10.2 Tinción de Azul alcian con Hematoxilina-Eosina

La tinción de azul alcian fue utilizada a un pH de 2.5 con la finalidad de teñir las mucinas ácidas presentes en las células caliciformes. Debido a su función como productoras de glicoproteínas de mucina para la conservación de la capa interna del colon (Dao y Le, 2022; Meyers, 2023).

Se eliminó el exceso de parafina calentando las laminillas unos segundos con un encendedor. Posteriormente se siguió el siguiente tren de tinción: Dos baños de xilol (5 min), 1 baño de OH-Xilol (3 min), OH 100% (2 min), OH 90% (2 min), OH 80% (2 min), OH 70% (2 min), Agua destilada (1 lavado), Azul alcian (1 min), Hematoxilina de Harris (40 s), Agua destilada y agua corriente (Eliminación de exceso del colorante), Agua amoniacal (2 lavados), Agua destilada (1 lavado), Eosina amarillenta (5 min), Agua destilada y agua corriente (Eliminación del exceso del colorante), OH 70% (2 min), OH 80% (2 min), OH 90% (2 min), OH 100% (2 min), OH Xilol (2 min), Xilol 2 (5 min) y Xilol 1 (10 min).

El montaje de los tejidos se realizó con Entellan y cubreobjetos de 24x50mm.

6.11. EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN EL COLON

Las muestras almacenadas en TRIzol fueron maceradas en un mortero con nitrógeno líquido. Posteriormente fueron recuperadas en tubos nuevos con 400 μ L de TRIzol, se homogeneizaron y se dejaron en hielo hasta procesar todas las muestras. Después se les agregaron 200 μ L de cloroformo y se homogeneizaron. Las muestras se incubaron en hielo por 10 min y fueron centrifugadas a 13 500 rpm 15 min a 4° C con la finalidad de recuperar la fase acuosa (ARN) en tubos eppendorf de 1.5 mL.

Una vez obtenida se le añadieron 800 μ L de isopropanol se mezclaron por inversión y se incubaron a -20 °C durante 2 h. Las muestras fueron centrifugadas a 13 500 rpm por 15 min a 4 °C y se decantó el sobrenadante. Se realizó un lavado con 800 μ L de Etanol absoluto a 13 500 rpm 10 min a 4 °C y se decantó el sobrenadante. Se realizó un segundo lavado con 800 μ L de Etanol al 80%, el sobrenadante fue decantado con la finalidad de dejar secar las pastillas por 30 min y resuspenderlas en 200 μ L LiCl al 2.5 M (-20 °C), se incubaron 90 min en hielo y se centrifugaron a 13 500 rpm 30 min a 4 °C, el sobrenadante fue removido con la

micropipeta y se realizó una segunda incubación con LiCl. Al finalizar la segunda incubación las pastillas se resuspendieron en 200 μ L de Acetato de sodio al 0.3 M, se les agregó 200 μ L de isopropanol y se mezclaron por inversión. Las muestras se dejaron precipitar toda la noche.

Al día siguiente fueron centrifugadas a 13 500 rpm 30 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 500 μ L de Etanol al 80%. Las muestras volvieron a ser centrifugadas a 13 500 rpm 10 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se dejaron secar por 30 min. Finalmente fueron resuspendidas en 10 μ L de agua inyectable estéril.

El ADN se cuantificó en un EpochTM Multi-Volume multi-sample Spectrophotometer System (Biotek). Se verificó su integridad mediante una electroforesis en gel agarosa al 0.8% en condiciones de 100v por 30 min. La síntesis de cDNA se realizó usando el kit InvitrogenTM M-MLV Reverse Transcriptase, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Las PCR se realizaron en un termociclador T100TM Thermal Cycler (Bio-Rad) con la finalidad de evaluar las citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias presentes en el colon.

Reactivo	1x (μL)
H ₂ O	9.78
Buffer con detergente	1.5
MgCl ₂	1.2
dNTP's	0.12
Forward	0.6
Reverse	0.6
FirePol Polimerasa	0.2
cDNA	1
TOTAL	15

Tabla 7. Proporciones para PCR de punto final para citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias.

Gen	Primer	Secuencia 5' > 3'	Tamaño del amplicon	Tm°	Ciclos
18s	Forward	CCGCCGCCATGTCTCTAGT	150 pb	60 °C	30
	Reverse	CTTTCCTCAACACCACATGAGC			
IL-1β	Forward	TGCCACCTTTTGACAGTGATG	138 pb	60 °C	35
	Reverse	TGATGTGCTGCTGCGAGATT			
IL-6	Forward	GGAGTCACAGAAGGAGTGGC	151 pb	59 °C	35
	Reverse	GACCACAGTGAGGAATGTCCA			
IL-10	Forward	ACCTGGTAGAAGTGATGCCCCAGGCA	237 pb	59.6°C	35
	Reverse	CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAAA			
IL-17	Forward	CCCTCAGACTACCTCAACCG	132 pb	59 °C	35
	Reverse	CAGCTTTCCTCCGCATTGA			
TNF-α	Forward	GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC	307 pb	59 °C	35
	Reverse	ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCG			
TGF-β	Forward	GCCCTTCCTGCTCCTCAT	195 pb	61 °C -2°C	36
	Reverse	TTGGCATGGTAGCCCTTG			

Tabla 9. Primers utilizados en la PCR de punto final para distintos genes de interés.

	Temperatura	Tiempo
<i>Incubación inicial</i>	94 °C	1:00
<i>Desnaturalización</i>	95 °C	0:30
<i>Alineación</i>	Tm°	0:30
<i>Extensión</i>	72 °C	0:30
<i>Extensión final</i>	72 °C	7:00

Tabla 10. Condiciones de la PCR en punto final.

Finalmente, se realizaron electroforesis de gel agarosa al 1.5% y TBE al 1x, utilizando como revelador EcoStain o Bromuro de Etidio. En cada pozo se agregaron 10 µL de muestra, así como 2 µL de buffer de carga. Las condiciones fueron 100v por 30 min.

Los geles fueron revelados con ayuda de un fotodocumentador Gel Doc™ EZ Gel Documentation System. Las imágenes obtenidas fueron analizadas en el software Image J.

6.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

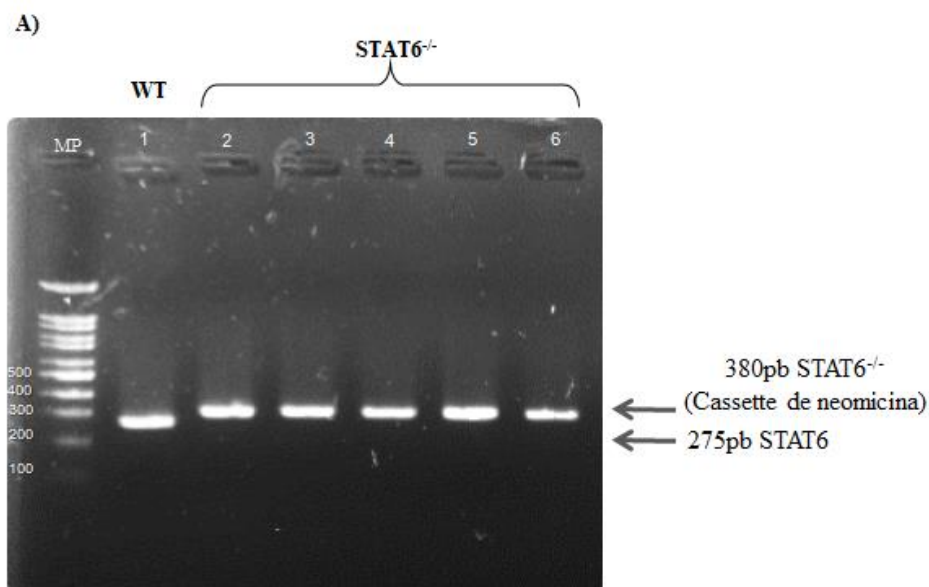
Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el software GraphPad Prism 8 (San Diego, CA, EE. UU.). Los análisis se realizaron con la prueba de ANOVA de una, dos vías y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para la obtención de la significancia estadística ($\alpha < 0.05$, 95%). Los datos se presentan como la media \pm SEM.

7. RESULTADOS.

7.1 Genotipo de ratones $STAT6^{-/-}FoxP3^{EGFP}$ y $STAT6^{+/+}FoxP3^{EGFP}$

Con la finalidad de corroborar que la cepa $STAT6^{-/-}FoxP3^{EGFP}$, previamente generada en el laboratorio, fuera deficiente en STAT6 y expresara $FoxP3^{EGFP}$ se realizaron constantemente PCR de genotipo durante el mantenimiento de la cepa y antes de cada experimento. La obtención del genotipo para los ratones $STAT6^{+/+}FoxP3^{EGFP}$ fue realizada antes de cada experimento.

La deficiencia de STAT6 se observó mediante un amplicon de 380 pb (**Figura 9. A**) correspondiente al cassette de neomicina presente en su región codificante mientras que el de $FoxP3$ obtuvo un tamaño de 325 pb (**Figura 9. B**) gracias a la secuencia LoxP ubicada en dicho gen. Por otro lado, los ratones WT para ambos genes presentaron amplicones de 275 pb.



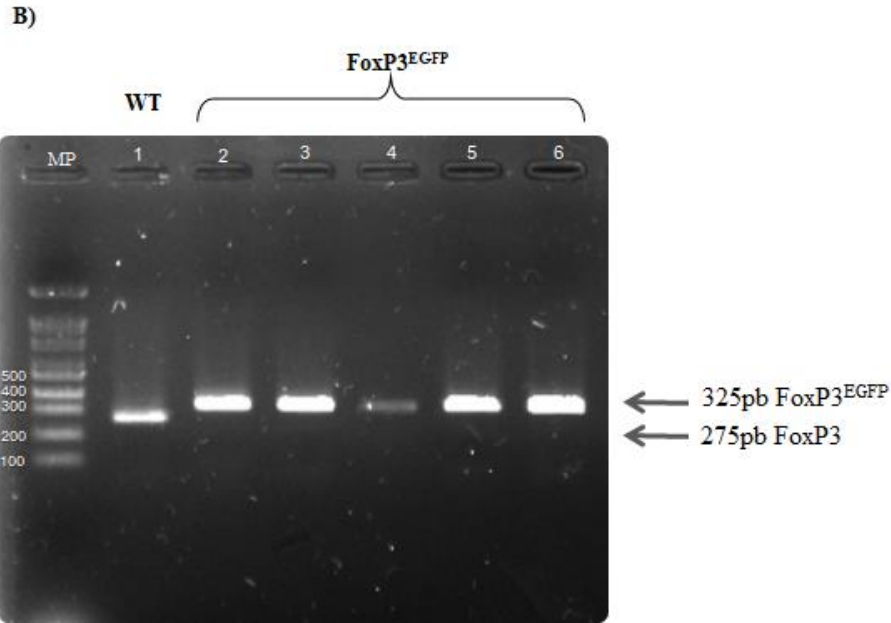


Figura 9. Gel de electroforesis del gen STAT6^{-/-} (A) y FoxP3 (B). El pozo 1 corresponde a un ratón WT para ambos genes, el 2 a un ratón STAT6^{+/+}FoxP3^{EGFP} y del 3 al 6 a ratones STAT6^{-/-}FoxP3^{EGFP}.

7.2 Análisis de la expresión e intensidadde FoxP3 y CD25 en células Treg diferenciadas en deficiencia de STAT6

Para la obtención de los linfocitos Treg utilizados para la terapia adoptiva se aislaron linfocitos T CD4⁺, mismos que fueron cultivados durante 8 días con TGF- β , IL-2, CD3 y CD28, en otras palabras, los cultivos se mantuvieron con 5 días de diferenciación y 3 días más de expansión con la finalidad de estimular la diferenciación hacia el fenotipo T regulador.

Se realizaron análisis de citometría de flujo utilizando la estrategia descrita en la **Figura 10. A**, en ella se observó que los cultivos de ratones STAT6^{-/-}FoxP3^{EGFP} (Tregs STAT6^{-/-}) presentaban más del doble (**Figura 10. B**) de linfocitos CD4⁺FoxP3⁺ en comparación con los ratones STAT6^{+/+}FoxP3^{EGFP} (Tregs WT). Lo mismo se observa para el CD25⁺FoxP3⁺. Partiendo de lo anterior se evaluó el porcentaje de expresión de CD25 y de FoxP3. En FoxP3 se obtuvo un mayor porcentaje de linfocitos positivos en las Tregs STAT6^{-/-} en comparación con las Tregs WT (**Figura 10. C**). Sin embargo, para el CD25 se observa una mayor expresión en las Tregs STAT6^{-/-} pero no presenta significancia estadística.

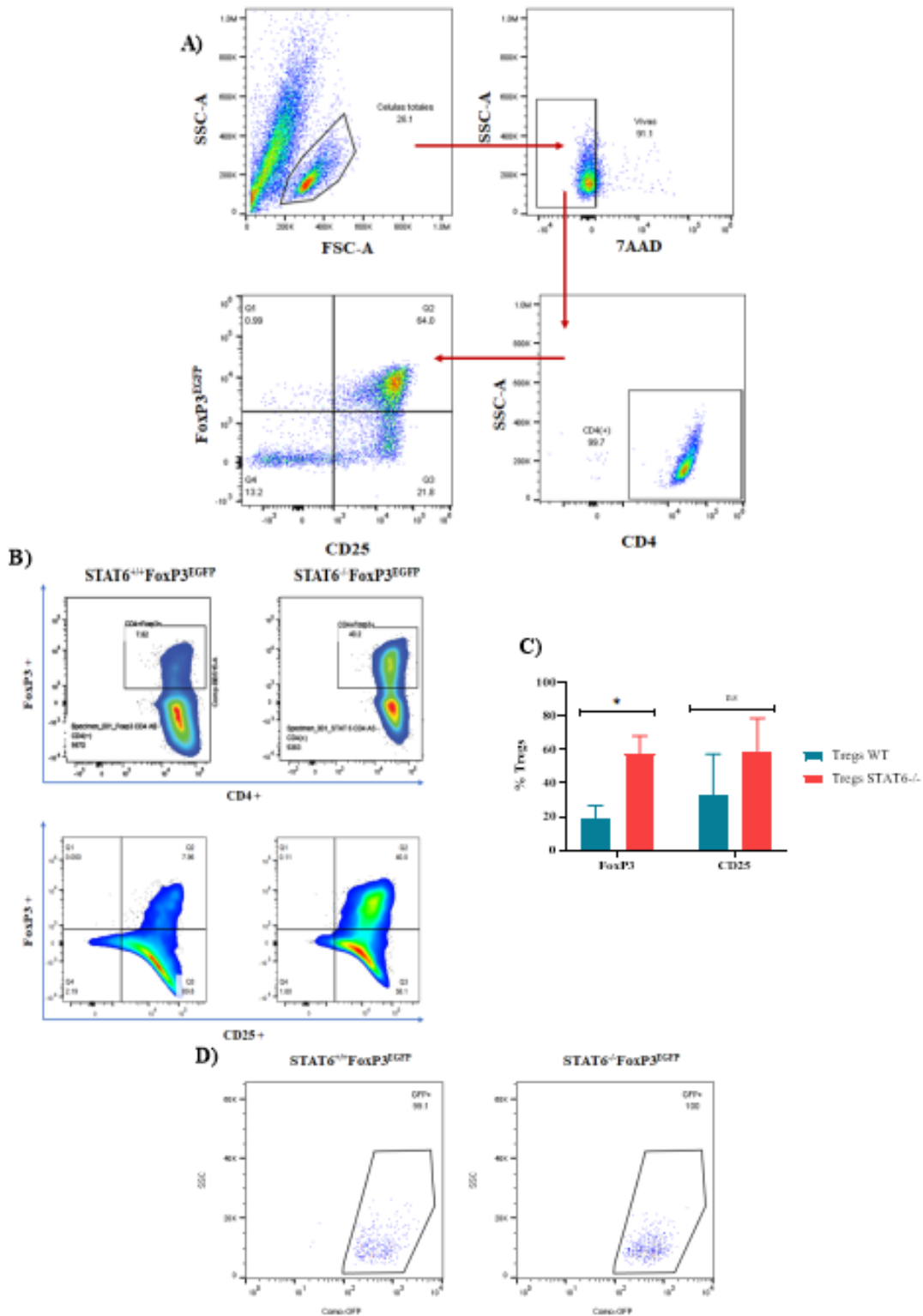


Figura 10. Citometría de flujo de Tregs diferenciadas en deficiencia de STAT6. A) Estrategia de análisis de citometría de flujo para linfocitos Tregs. B) Dot Plots de citometría de flujo del día 8 de

cultivo de Tregs obtenidas a partir de CD4 totales de ambas cepas de ratón. C) Expresión del CD25 y FoxP3 de Tregs obtenidas a partir de tres cultivos independientes de 8 días de ambas cepas de ratón. D) Dots Plots representativos donde se muestra la población obtenida del Cell Sorter (EGFP⁺).

Los linfocitos Tregs fueron aislados mediante Cell Sorter, en este presentó el fenómeno antes descrito, pues las Tregs provenientes de los ratones STAT6^{-/-}FoxP3^{EGFP} se expandieron más del doble en comparación de las Tregs WT (**Figura 10. D**). Sin embargo, se consideró el número de Tregs obtenidas del cultivo WT para determinar la cantidad de células a administrar por ratón fuera la misma en ambos grupos.

7.3 Cambios en el peso corporal de los grupos experimentales con AOM/DSS y con administración de Tregs

Durante los 71 días del experimento se registró dos veces por semana el peso corporal de los ratones y se consideró el peso inicial para la obtención de los datos en porcentaje. Los grupos que recibieron el tratamiento con Tregs WT y STAT6^{-/-} presentaron un aumento de peso durante todo el experimento, en cambio los ratones que no lo recibieron presentaron pérdidas notables en los días 15, 34, 64 y 68, correspondientes al término de cada ciclo de DSS y posteriores a los días de transferencia celular (**Figura 11**).

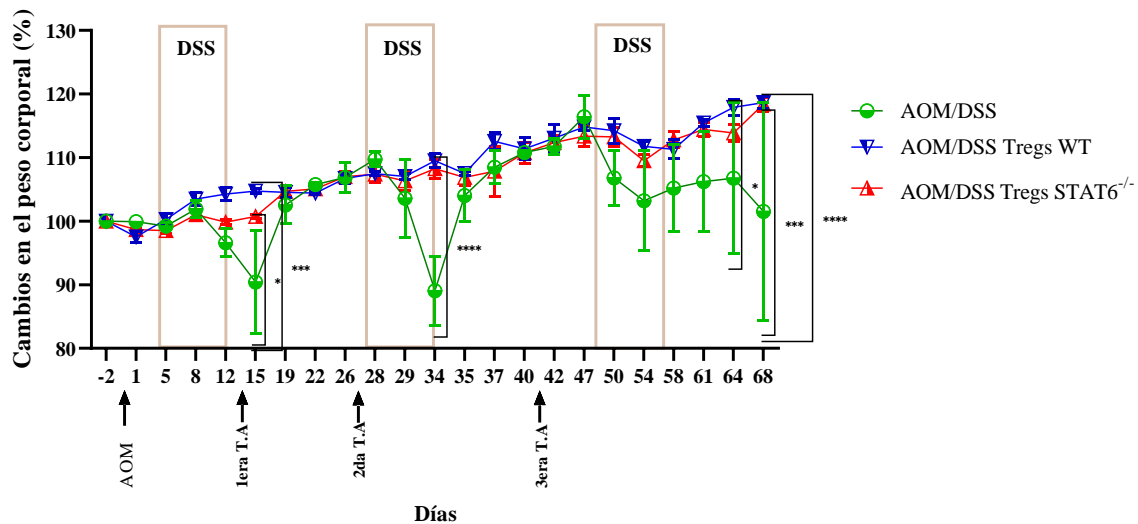


Figura 11. Cambios en el peso corporal expresado en porcentaje. En ella se observa los días de administración del AOM, los ciclos de DSS y de transferencia celular (T.A).

7.4 Análisis del índice de daño de la enfermedad

A lo largo del experimento se llevó un registro dos veces por semana de los parámetros del DAI o índice de daño de la enfermedad (**Figura 12. B**), el cual se compone de la pérdida de peso, consistencia de heces y la ausencia o presencia de sangrado, con una puntuación descrita en la **Tabla 6**. Además, se realizó un registro fotográfico de cada uno de los individuos permitiendo observar la progresión de la enfermedad en los ratones que recibieron AOM/DSS y el tratamiento con las Tregs WT y STAT6^{-/-} (**Figura 12. A**).

Como se observa en la **Figura 11** el grupo AOM/DSS Tregs STAT6^{-/-} presentó un menor índice en comparación a los otros dos grupos, principalmente al final del experimento, el cual se compone de las etapas tardías del CAC y en el que se observa una mayor significancia estadística. Por otro lado, el grupo AOM/DSS fungió como un control para observar si el modelo de inducción funcionaba, al igual que la transferencia adoptiva, sin embargo, en este grupo se presentaron decesos días después del término del primer ciclo de DSS (**Figura 12. C**), mismo que no se observó en el resto de los grupos. Lo anterior permitió existieran desviaciones grandes como la observada en el día 34.

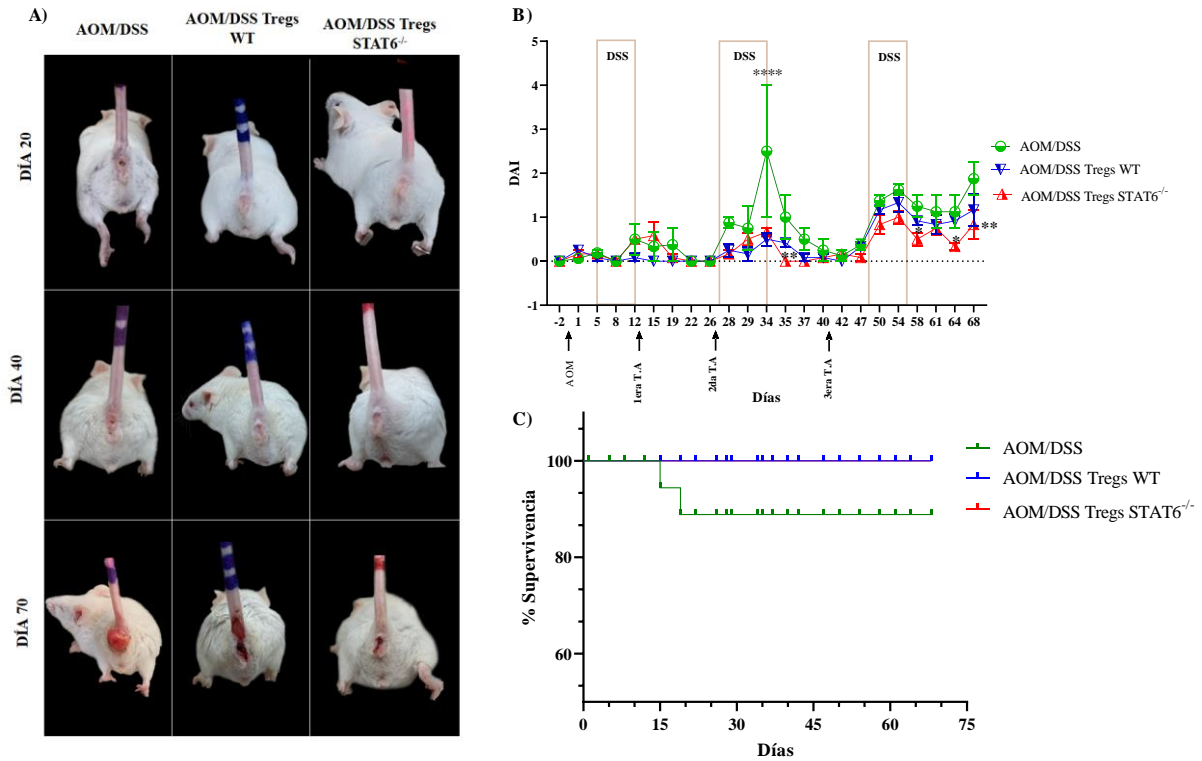


Figura 12. Índice de daño de la enfermedad. A) Fotografías de los días 20, 40 y 70 de los tres grupos experimentales, en ellas se observa la progresión de la enfermedad. B) Registro del DAI o índice de daño de la enfermedad dos veces por semana, en ella se contempla la pérdida de peso, la consistencia de las heces y la ausencia o presencia de sangrado. C) Mortalidad de los grupos experimentales a lo largo del modelo de CAC.

7.5 Análisis de los cambios morfométricos del intestino

Tras finalizar el experimento en el día 71 se llevó a cabo el sacrificio de los ratones. Durante este suceso se realizó un registro de la longitud del colon, el número y tamaño de los tumores. El grupo AOM/DSS Tregs STAT6^{-/-} presentó un intestino de mayor longitud, seguido del AOM/DSS Tregs WT y finalmente el AOM/DSS, sin embargo, no se obtuvo significancia estadística entre estos grupos, pero sí con el CTR (**Figura 13. B**).

Por otro lado, el número y tamaño de tumores fue heterogéneo en los grupos, ya que el grupo AOM/DSS presentó una mayor cantidad de tumores, mismos que se distribuyeron en un tamaño desde el 0 a los 6 mm. El grupo AOM/DSS Tregs WT, en su mayoría, presentaron un menor número de tumores, sin embargo, uno de ellos fue el que obtuvo la mayor cantidad en todos los grupos. Además, ellos se agruparon cerca de los 3 mm. Finalmente, en el grupo AOM/DSS Tregs STAT6^{-/-} los tumores se agruparon cercanos a los 4 y 2.5 mm; en cuanto al número de tumores estos se distribuyeron en la gráfica (**Figura 13. C y D**).

La mayoría de los tumores presentaron un tamaño mayor a los 2 mm para los tres grupos, pero el AOM/DSS Tregs WT presentó la menor cantidad de tumores menores a 2 mm (**Figura 13. E**).

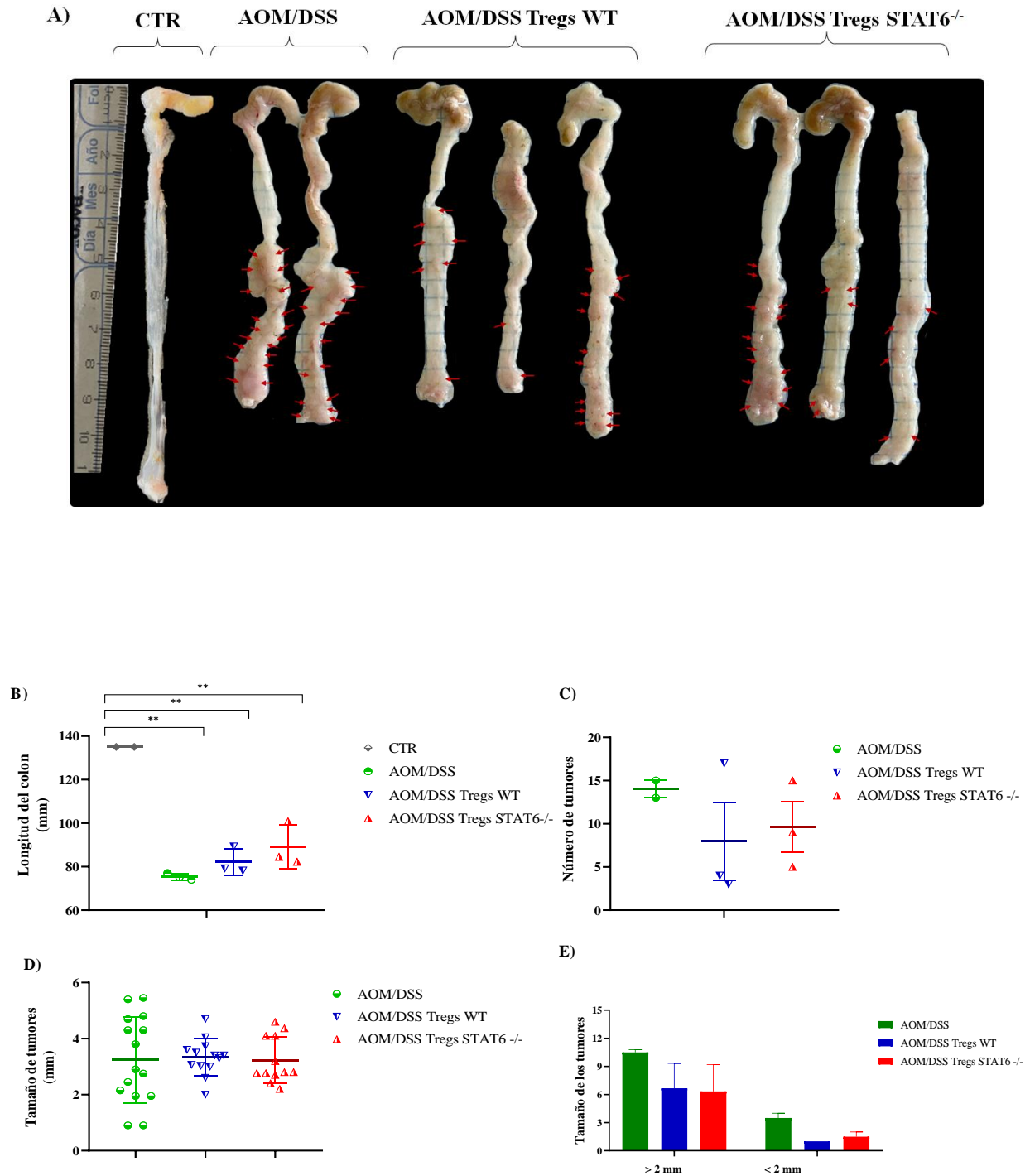


Figura 13. Cambios morfométricos del intestino. A) Fotografía comparativa del colon del control sano (CTR) y de los tres grupos experimentales en los que se observan la longitud del intestino y los tumores señalados en flechas rojas. B) Longitud del colon de los tres grupos experimentales más el control. C) Cuantificación del número total de tumores. D) Distribución del tamaño de los tumores. E) Agrupación de los tumores en mayores y menores a 2 mm.

7.6 La administración de Tregs STAT6^{-/-} disminuye el daño en el epitelio colónico

La tinción de hematoxilina-eosina nos permitió observar la morfología de los tejidos y realizar un análisis del daño histopatológico.

El grupo AOM/DSS presentó una mayor transformación del epitelio del colon, ya que en él se observó un daño notable en la estructura de las criptas, el cual es considerado como ulceración; el edema en la submucosa se consideró moderado; y finalmente el infiltrado de células inmunitarias alcanzó la región la capa muscular.

Por otra parte, los ratones que recibieron la transferencia adoptiva con las Tregs WT presentaron un infiltrado inflamatorio predominante en el área de la submucosa. En cuanto al daño de las criptas se determinó que se observaban entre un estado de destrucción y ulceración, siendo este último predominante, mientras que el edema de la submucosa se observó en un estado moderado.

Finalmente, el grupo de transferencia adoptiva con Tregs STAT6^{-/-} presentó criptas transformadas en un estado de destrucción; el edema de la submucosa se encontró entre ligero y moderado, mientras que el infiltrado se observó disminuido en el área de la submucosa, lo anterior nos indica que tras la administración de las Tregs STAT6^{-/-} existe una tendencia hacia la reducción del daño, pero sin significancia estadística (**Figura 14 y 15**).

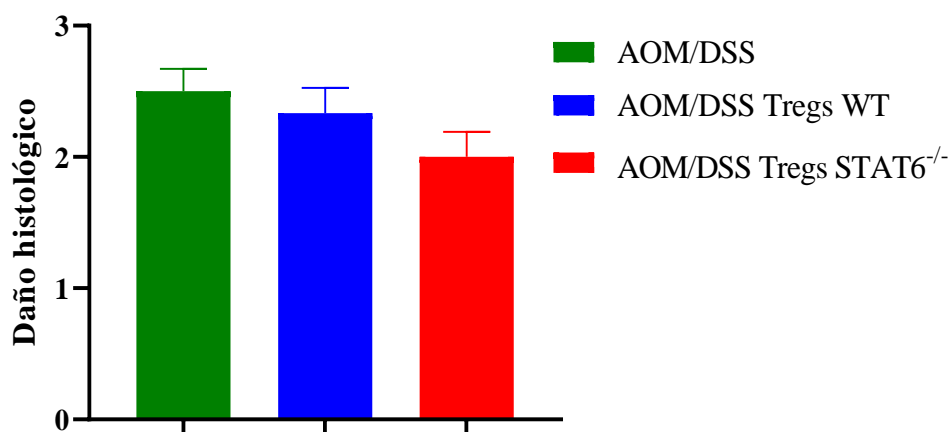


Figura 14. Daño histopatológico al día 71 del modelo.

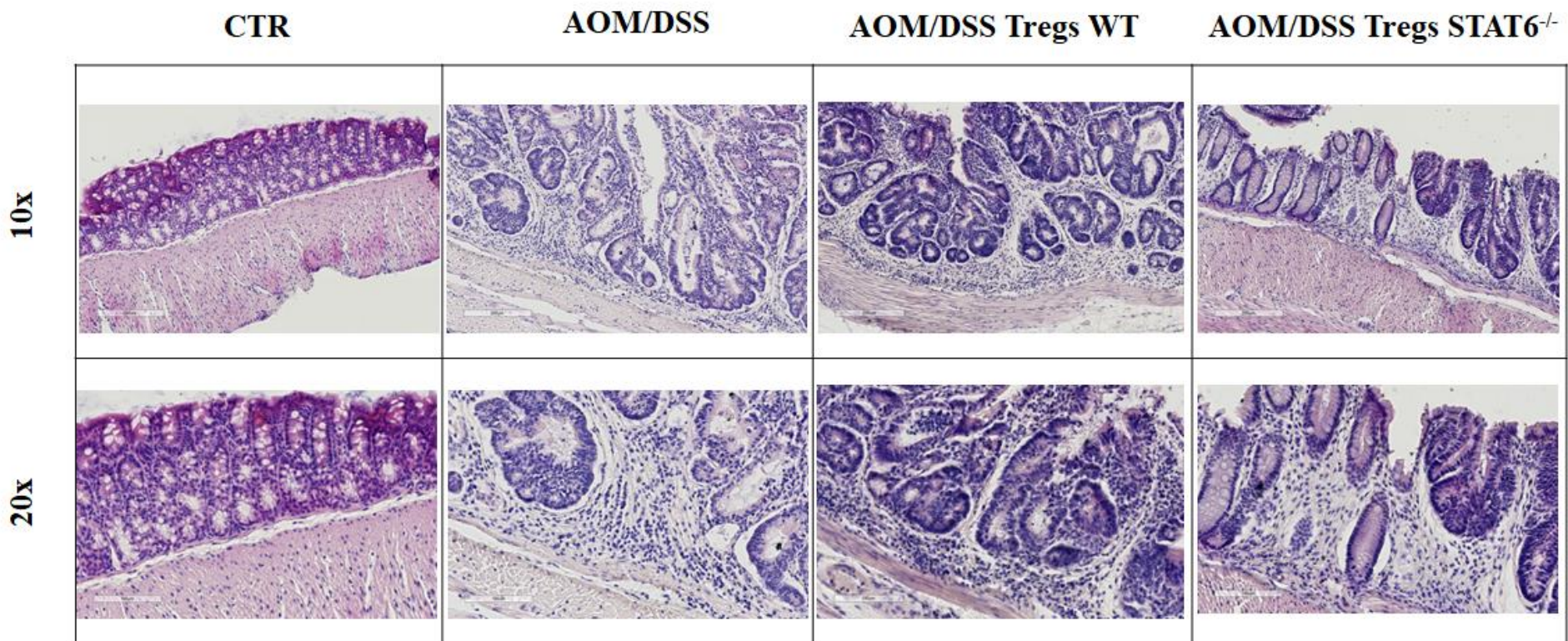


Figura 15. Tinción de Hematoxilina-Eosina a 10x y 20x en cortes de 5 μ m al día 71 del modelo.

7.7 Las células caliciformes se preservan en los grupos con transferencia adoptiva

Se conoce que durante el cáncer de colon ocurre una pérdida de las células caliciformes. Dentro de sus funciones más importantes se encuentra la segregación de mucinas que protegen el epitelio colónico y conservan la homeostasis intestinal. La tinción de azul alcianos nos permitió observar las mucinas ácidas segregadas por estas células, al mismo tiempo que nos dejó analizar la pérdida de estas.

De los tres grupos con AOM/DSS, aquellos que recibieron la transferencia adoptiva conservaron un mayor número de caliciformes, especialmente el grupo AOM/DSS Tregs STAT6^{-/-} quienes preservaron cerca del 50% de las observadas en el CTR. Seguido del grupo AOM/DSS Tregs WT y finalmente el grupo con solo AOM/DSS. Sin embargo, solo se obtuvo significancia estadística al comparar con el CTR y no entre el resto de los grupos (**Figura 15**).

En la **figura 16** se puede observar con detalle la preservación de este grupo celular en aumentos de 10x y 20x.

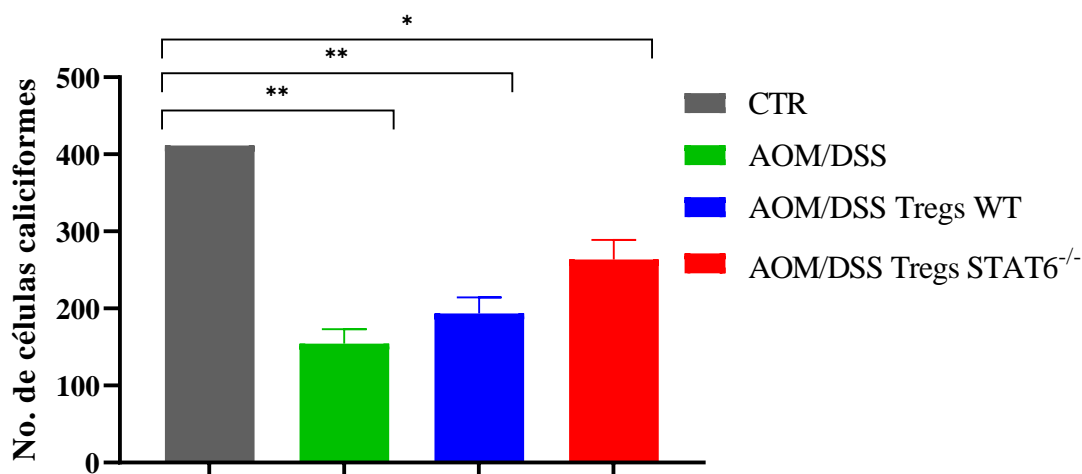


Figura 16. Número de células caliciformes conservadas al día 71 del modelo.

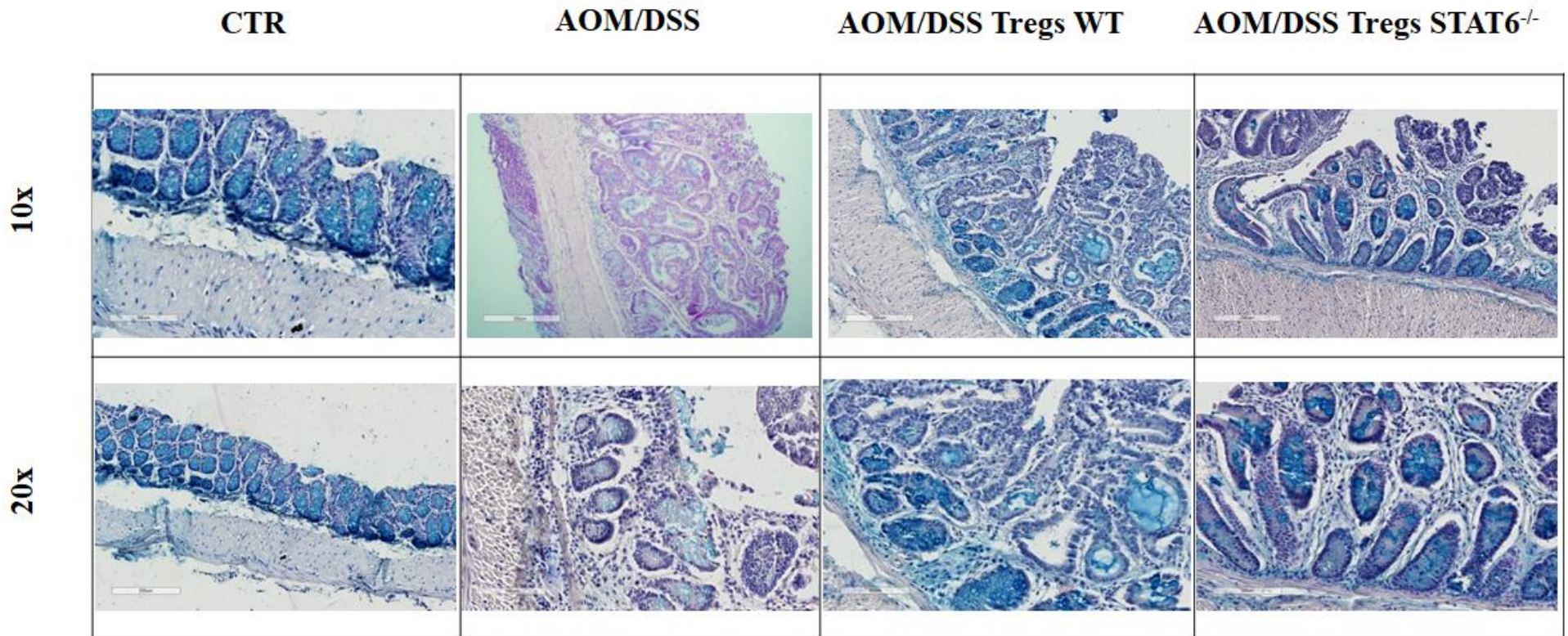


Figura 17. Tinción de Azul alcian con Hematoxilina-Eosina a 10x y 20x en cortes de 5 μ m al día 71 del modelo.

7.8 Análisis de la expresión de citocinas antiinflamatorias y proinflamatorias en el colon

Con la finalidad de obtener un análisis detallado sobre las citocinas presentes en el tejido colónico se realizó su estudio mediante la expresión de mRNA.

Se analizaron IL-10 y TGF- β como citocinas antiinflamatorias, ya que se conoce que cumplen un papel inmunorregulador y son capaces de inhibir las respuestas proinflamatorias, además de ser secretadas por las Tregs. No obstante, al estudiar su expresión observamos que no solo no se observa ninguna tendencia si no que tampoco hay significancia estadística en los grupos (**Figura 18. B y F**), ya que observamos que para IL-10 el grupo CTR presenta una mayor proporción de esta citocina, seguido del AOM/DSS, del grupo con tratamiento de Tregs STAT6^{-/-} y finalmente el Tregs WT. En el caso de TGF- β el grupo CTR y el AOM/DSS Tregs WT presentaron una proporción similar, seguidos del grupo AOM/DSS Tregs STAT6^{-/-} y finalmente el AOM/DSS.

En el caso de las citocinas proinflamatorias se analizaron IL-1 β , IL-6, IL-17 y TNF- α (**Figura 18. A, C, D y E**). En ellas ocurre un fenómeno similar al observado con las citocinas antiinflamatorias, ya que observamos que la relación entre las distintas citocinas es heterogénea por lo que no se observan tendencias ni significancia estadística en los grupos. Cabe mencionar que para IL-6 e IL-17 el grupo con las Tregs STAT6^{-/-} presentan una mayor proporción de estas citocinas, lo que nos indicaría un mayor estado inflamatorio; mientras que para IL-1 β y TNF- α se refleja en mayor proporción en los grupos con Tregs WT y el AOM/DSS.

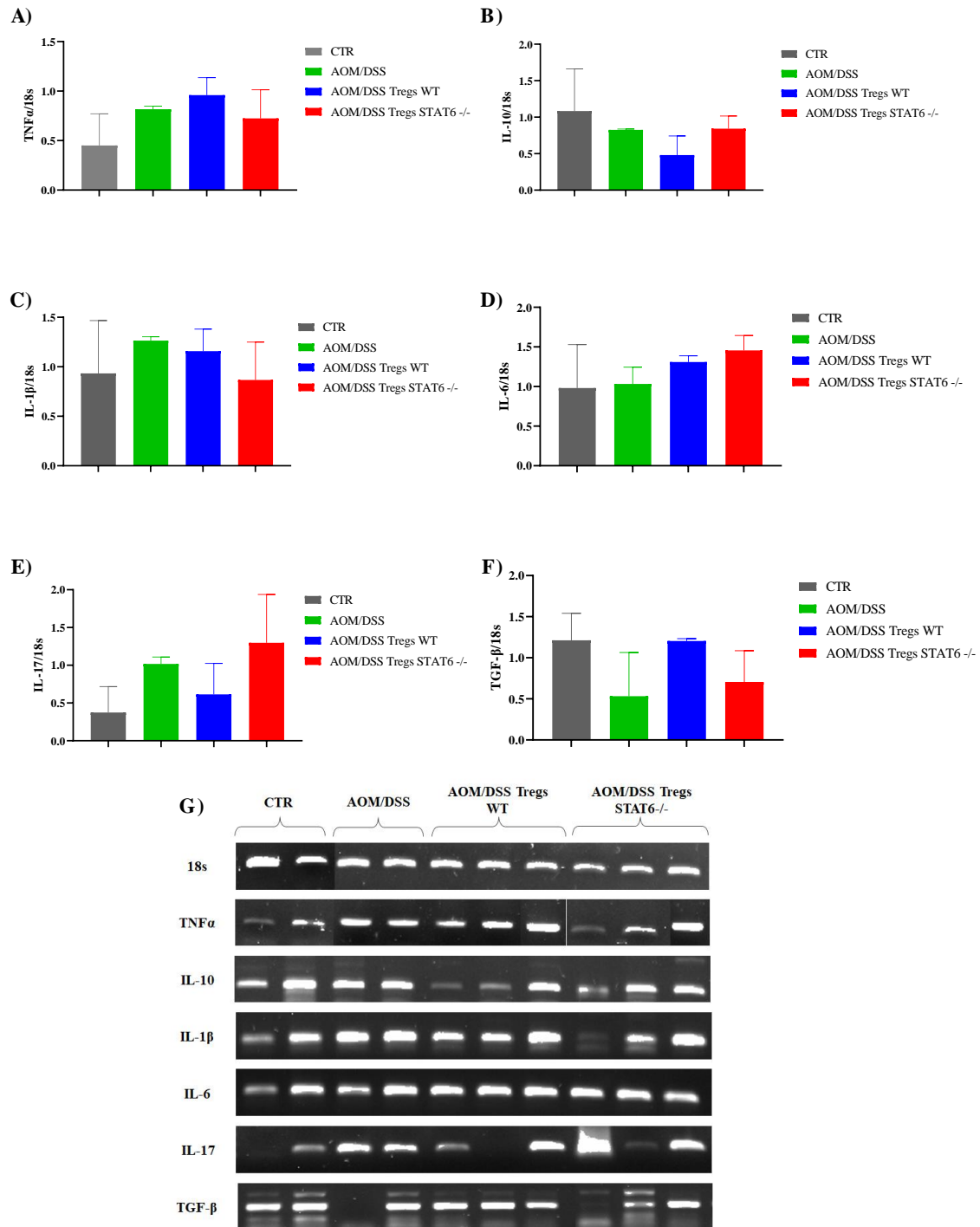


Figura 18. Análisis de la expresión de mRNA de citocinas antiinflamatorias (**B** y **F**) y proinflamatorias (**A**, **C**, **D** y **E**) presentes en el tejido del colon.

8. DISCUSIÓN

Los linfocitos Tregs modulan muchas poblaciones inmunitarias, lo que les ha permitido ser consideradas como un posible blanco terapéutico para un abundante número enfermedades autoinmunes, así como para enfermedades intestinales inflamatorias (EII) y para la prevención y tratamiento de cánceres epiteliales (Erdman et al., 2005; Zhao et al., 2017). Sin embargo, su papel ha sido ampliamente controversial dentro del cáncer de colon, ya que, si bien son capaces de cumplir un papel en la regulación de la inflamación local, dependiendo del momento en el que ocurra un incremento en su frecuencia va a generar cambios favorables o perjudiciales para el pronóstico del paciente (Tanaka y Sakaguchi, 2016; Olguín et al., 2020; Delgado-Ramírez et al., 2021). Por lo tanto, la mayoría de las inmunoterapias actuales basadas en células Tregs, se dirigen hacia enfermedades autoinmunes. No obstante, en modelos murinos de enfermedades intestinales inflamatorias se ha visto una reducción de la progresión de la enfermedad y la restauración del epitelio del colon, lo que ha permitido comenzar con el desarrollo de ensayos clínicos para la enfermedad de Crohn ([ClinicalTrials.gov](https://www.clinicaltrials.gov); Stucchi et al., 2023).

En trabajos previos del grupo de investigación se observó que en los ratones STAT6^{-/-} bajo el modelo de AOM/DSS las Tregs incrementaban su número al principio del modelo y decaían al final, mientras que en los ratones de tipo WT sucedía lo contrario. Este fenómeno favorecía que disminuyeran los signos de la enfermedad, la carga tumoral y el daño histológico (Delgado-Ramírez et al., 2021). A partir a esto se buscó recrear un escenario similar al transferir células Tregs en los días 17, 27 y 41, con la finalidad de determinar si eran las Tregs STAT6^{-/-} las causantes de este efecto y no la deficiencia de STAT6 sistémica. *In vitro* la deficiencia de STAT6 en las células iTregs les permite conservar su estabilidad fenotípica durante un mayor tiempo y ser más supresoras a través de la sobreexpresión de CTLA-4, PD-1 y FoxP3 (Arroyo-Olarte et al., 2023).

En el presente trabajo se evaluó si las Tregs deficientes en STAT6 podrían actuar como inmunoterapia en un modelo de cáncer de colon asociado a colitis inducido por AOM/DSS en ratones de tipo silvestre, mostrando así que tras la transferencia con Tregs WT y Tregs STAT6^{-/-} disminuyen los signos de la enfermedad, tras presentar una tendencia hacia la ganancia de peso, además de una ligera reducción en el daño histológico y una mayor

preservación de las células caliciformes Sin embargo, en cuanto a la carga tumoral no se contempló una disminución entre los grupos con y sin tratamiento.

Una gran parte de las investigaciones en las que se hace uso del modelo de AOM/DSS para el estudio del CAC emplean ratones hembra, esto a causa de que se conoce que el sexo del individuo tiene implicaciones en este modelo, pues se ha visto que los ratones macho presentan una mayor sensibilidad al desarrollo de la carcinogénesis atribuida a la deficiencia de los estrógenos. Algunos de ellos, como el estradiol, son capaces de reducir la colitis y generar un efecto protector para la inestabilidad de microsátélites (Slattery et al., 2001; León-Cabrera et al., 2017; Lee et al., 2016; Son et al., 2019; Delgado-Ramírez et al 2021; Arroyo-Olarte et al., 2023). De tal manera que se utilizaron ratones macho con la finalidad de observar un cambio entre los grupos, incluso si este fuera mínimo.

Aunado a esto, uno de los principales retos de la terapia adoptiva con Tregs es determinar el número clínicamente eficaz de linfocitos para que ejerzan una función supresora eficiente (Schlöder et al., 2022). Se ha visto en ensayos de transferencia adoptiva que dos administraciones de 3.5×10^5 o una de 1×10^6 células representan un número adecuado para observar mejoras en los ratones sometidos a ensayos de CAC o de EII, ya que se reduce la colitis, la displasia epitelial y en el caso de ratones $APC^{\text{min/+}}$, una reducción en la multiplicidad de los adenomas, por lo que consideramos 3.5×10^5 una dosis adecuada de Tregs para nuestros ensayos (Erdman et al., 2003; Mottet et al., 2003; Erdman et al., 2005).

La transferencia de Tregs generalmente es realizada en las primeras semanas de la inducción del CAC, principalmente en la semana 4, lo que en nuestros experimentos comprende el día 28 del modelo, no obstante, determinamos suministrar dos transferencias de iTregs en los días 13 y 27 con la finalidad de contribuir a la reparación del epitelio del colon al controlar la inflamación inicial (Erdman et al., 2003; Mottet et al., 2003). Por otro lado, Erdman et al. reporta una segunda administración en la semana 12, lo que comprende nuestra tercera aplicación (Día 41), sin embargo, esta última dosis se encontró cercana al final del modelo, lo que pudo ser perjudicial y promover que en esta etapa incrementara el porcentaje de Tregs y restablecer la progresión tumoral (Erdman et al., 2003; Togashi et al., 2019). De manera que sería interesante evaluar la transferencia adoptiva solamente en las fechas 13 y 27 del modelo de CAC.

Por otro lado, la mayoría de las Tregs ubicadas en la lámina propia del colon son periféricas, también conocidas como Tregs residentes de tejido no linfoide, y tienen como finalidad mediar las interacciones de los antígenos de los alimentos y de la microbiota comensal (Jacobse et al, 2021). En general, se ha visto que, tanto en pacientes como en ratones, las Tregs que muestran un funcionamiento deficiente participan en la progresión de la inflamación intestinal, y particularmente en los pacientes con enfermedad de Crohn tienen funciones alteradas, de ahí que se haya decidido transferir iTregs de ratones sanos y no de aquellos que estuvieran cursando el modelo de CAC (Canavan et al., 2016; Clough et al., 2020).

Diversos autores han observado que durante la transferencia con iTregs CD4+CD25+ para el tratamiento de la colitis, particularmente las Tregs de origen esplénico tienden a acumularse en los nódulos linfáticos mesentéricos y en la lámina propia del colon, donde comienza un proceso de expansión clonal y en algunas situaciones llegan a colonizar estas áreas. Además, estos linfocitos se encuentran en contacto directo con las células dendríticas CD11c+ y las células T efectoras (Mottet et al., 2003; Uhlig et al., 2006). Si este fenómeno se presentará en nuestros experimentos es probable que las colonias de las iTregs STAT6^{-/-} se conserven por un mayor tiempo en el individuo, lo que les permitiría ser más eficientes para el control de la inflamación, al no transformarse fácilmente a efectoras en condiciones inflamatorias, lo que explicaría la ligera reducción del daño histológico y una mayor preservación de las células caliciformes, en comparación con el grupo con iTregs WT. Por lo que sería interesante estudiar las interacciones entre las iTregs y otras células inmunes presentes en el microambiente del epitelio del colon.

Se ha visto que el potencial terapéutico de las Tregs durante las EII es mediado principalmente por IL-10 y TGF- β (Fahlén et al., 2005). Sin embargo, nosotros no vemos diferencias en estas citocinas en intestino al final del experimento, esto puede deberse a dos situaciones distintas. La primera de ellas puede atribuirse a la aplicación de la última dosis de iTregs, ya que como se mencionó anteriormente es probable que haya favorecido que incrementara la frecuencia de las Tregs en las etapas finales del modelo y que éstas a su vez inhibieran las respuestas antitumorales al volverse más supresoras tras su infiltración al tumor, contrarrestando así el efecto previo de las dos primeras administraciones (Togashi et

al., 2019). En segundo lugar, es posible que se utilice un mecanismo adicional independiente de estas citocinas, ya que particularmente en las iTregs STAT6^{-/-} se conoce que sobreexpresan CTLA-4 y al estar en contacto con el CD80/86 de las células dendríticas se controlaría la activación de los linfocitos T o conduciría a las T efectoras a un estado de anergia (Kennedy et al., 2022).

Finalmente, otro de los retos importantes en la inmunoterapia con Tregs es el aislamiento de ellas, ya que de manera tradicional se utiliza la leucoféresis o su obtención a partir de muestras de sangre de cordón umbilical, lo que proporciona una fuente limitada de células que requiere de expansión, activación, y en algunos casos, de modificaciones genéticas antes de su uso como terapia (Schlöder et al., 2020). Las células iTregs utilizadas en este trabajo fueron obtenidas a partir de la diferenciación de linfocitos T CD4 totales lo que podría exponerlas a estímulos provenientes de células no diferenciadas. Sería interesante iniciar cultivos a partir de células CD4 naïve para los próximos ensayos. Además, sería recomendable evaluar otro esquema de administración que contemple únicamente las etapas iniciales del CAC donde la inflamación es más activa.

9. CONCLUSIÓN

La administración de iTregs provenientes de ratones WT o STAT6^{-/-} como terapia durante el desarrollo del CAC experimental disminuyen los signos de la enfermedad, reducen el daño histológico y preservan las células caliciformes. Sin embargo, no se observaron diferencias al usar el tratamiento con iTregs WT o STAT6^{-/-}. En próximos ensayos se sugiere partir de células CD4 naïve para su diferenciación a Tregs y probar un esquema de tratamiento enfocado a las etapas más tempranas.

10. LITERATURA CITADA

1. Ahmadzadeh, M., Pasetto, A., Jia, L., Deniger, DC., Stevanović, S., Robbins, PF., Rosenberg, SA. (2019) Tumor-infiltrating human CD4⁺ regulatory T cells display a distinct TCR repertoire and exhibit tumor and neoantigen reactivity. *Sci Immunol*.
2. Andrade-Meza, A., Arias-Romero, L. E., Armas-López, L., Ávila-Moreno, F., Chirino, Y. I., Delgado-Buenrostro, N. L., García-Castillo, V., Gutiérrez-Cirlos, E., Juárez-Avelar, I., Leon-Cabrera, S., Mendoza-Rodríguez, M., Olguín, J., Perez-Lopez, A., Pérez-Plasencia, C., Reyes, J., Sánchez-Pérez, Y., Terrazas, L., Vaca-Paniagua, F., Villamar-Cruz, O. y Rodríguez-Sosa, M. (2023). Mexican Colorectal Cancer Research Consortium (MEX-CCRC): Etiology, Diagnosis/Prognosis, and Innovative Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2115.
3. Antoni L, Nuding S., Wehkamp J. y Stange E. (2014) Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World Journal Gastroenterology*. 20(5):1165-79.
4. Arce-Sillas, A., Álvarez-Luquín, D., Tamaya-Domínguez, B., Gomez-Fuentes, S., Trejo-García, A., Melo-Salas, M., Cárdenas, G., Rodríguez-Ramírez, J. y Adalid-Peralta, L. (2016) Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation. *Journal of Immunology Research*. 2314-8861.
5. Arroyo-Olarte, R., Rivera-Rugeles, A., Nava-Lira, E., Sánchez-Becerra, A., Ledesma-Soto, Y., Saavedra, R., Armas-López, L., Terrazas, L., Ávila-Moreno, F. y León Cabrera, S. (2023) STAT6 controls the stability and suppressive function of regulatory T cells. *European Journal of Immunology*.
6. Astarita JL, Dominguez CX, Tan C, Guillen J, Pauli ML, Labastida R, Valle J, Kleinschek M, Lyons J, Zarrin AA. (2023) Treg specialization and functions beyond immune suppression. *Clin Exp Immunol*. 211(2):176-183.
7. BioLegend. (2012) APC anti-mouse CD4 Antibody. Consultado el 08 de marzo de 2023. En: <https://www.biolegend.com/en-us/products/apc-anti-mouse-cd4-antibody-245?GroupID=BLG4745>
8. BioLegend. (2012) Brilliant Violet 605 TM anti-mouse CD25 Antibody. Consultado el 08 de marzo de 2023. En: <https://www.biolegend.com/en-us/products/brilliant-violet-605-anti-mouse-cd25-antibody-7639>

9. Bruns, H., Schilender, U. y Kaplan, M. (2003) Expression of a Constitutively Active STAT6 in vivo alters lymphocyte homeostasis with distinct effects in T and B cells. *The Journal of Immunology*. 170:3478-348.
10. Cao, X., Cai, S., Fehniger, T., Song, J., Collins, L., Piwnica-Worms, D. y Ley, T. (2007) Granzyme B and Perforin Are Important for Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Tumor Clearance. *Immunity*. 27 (4): 635-646.
11. Canavan, J.B., Scottà, C., Vossenkämper, A., Goldberg, R., Elder, M., Shova, I., Marks, E., Stolarczyk, E., Lo, J., Powell, N., Fazekasova, H., Irving, P., Sanderson, J., Howard, J., Yagel, S., Afzali, B., MacDonald, T., Hernandez-Fuentes, M., Shpigel, N., Lombardi, G., Lord, D. (2016) Developing in vitro expanded CD45RA+ regulatory T cells as an adoptive cell therapy for Crohn's disease. *Gut*. 65:584-594.
12. Center, M., Jemal, A., Smith, R. y Ward, E. (2009) Worldwide Variations in Colorectal Cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 59. 6.
13. Chen, R., Lai, L., Brentnall, T., Pan, S. (2016) Biomarkers for colitis-associated colorectal cancer. *World Journal Gastroenterology*. 22: 7882–7891.
14. Chu K-H, Lin S-Y and Chiang B-L (2021) STAT6 Pathway Is Critical for the Induction and Function of Regulatory T Cells Induced by Mucosal B Cells. *Front. Immunol*. 11:615868.
15. Colamatteo, A., Carbone, F., Bruzzaniti, S., Galgani, M., Fusco, C., Maniscalco, G., Di Rella, F., Candia, P., De Rosa, V. (2020). Molecular Mechanisms Controlling Foxp3 Expression in Health and Autoimmunity: From Epigenetic to Post-translational Regulation. *Frontiers in Immunology*. 10:3136.
16. Clinical Trials. Consultado el 12 de septiembre de 2023. En: <https://clinicaltrials.gov/search?distance=50&intr=Treg%20cell&cond=Crohn>
17. Clough, JN., Omer, OS., Tasker, S., Irving, P. (2020). Regulatory T-cell therapy in Crohn's disease: challenges and advances. *Gut*. 69: 942-952.
18. Dao D y Le P. (2022) Histology, Goblet Cells. StatPearls Publishing. Consultado el 04 de marzo de 2023. En: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553208/>
19. Delgado-Ramirez Y, Colly V, Gonzalez GV, Leon-Cabrera S. (2020) Signal transducer and activator of transcription 6 as a target in colon cancer therapy. *Oncol Lett*.

20. Delgado-Ramírez, Y., Ocaña-Soriano, A., Ledesma-Soto, Y., Olguín, J., Hernández-Ruiz, J., Terrazas, L. y León-Cabrera, S. (2021). STAT6 is critical for the induction of regulatory T cells in vivo controlling the initial steps of colitis-associated cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(8).
21. Erdman, SE., Rao, VP., Poutahidis, T., Ihrig, MM., Ge, Z., Feng, Y., Tomczak, M., Rogers, AB., Horwitz, BH., Fox, JG. (2003) CD4(+) CD25(+) regulatory lymphocytes require interleukin 10 to interrupt colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res*. 63(18):6042-50.
22. Erdman, SE., Sohn, JJ., Rao, VP., Nambiar, PR., Ge, Z., Fox, JG., Schauer, DB. (2005) CD4+CD25+ regulatory lymphocytes induce regression of intestinal tumors in *ApcMin/+* mice. *Cancer Res*. 65(10):3998-4004.
23. Fahlén, L., Read, S., Gorelik, L., Hurst, SD., Coffman, RL., Flavell, RA., Powrie, F. (2005) T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med*. 201(5):737-46.
24. Fu, C., Jiang, L., Hao, S., Liu, Z., Ding, S., Zhang, W., Yang, X. y Li, S. (2019) Activation of the IL-4/STAT6 Signaling Pathway Promotes Lung Cancer Progression by Increasing M2 Myeloid Cells. *Frontiers in Immunology*.
25. GLOBOCAN (2020) Consultado el 08 de marzo de 2023. En <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie>
26. González-Parias, J., Duque-Giraldo, V. y Velásquez-Lopera, M. (2010) FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Inmunología*. 29(2):74-84.
27. Göschl, L., Scheinecker, C. y Bonelli, M. (2019) Treg cells in autoimmunity: from identification to Treg-based therapies. *Semin Immunopathol* 41, 301–314.
28. Guzmán-Flores, J. y Portales-Pérez. (2013) Mecanismos de supresión de las células Treguladoras (Treg). *Gaceta Médica de México*. 149:630-8.
29. He, Y., Yu, H., Ge, Y., Li, X., Jiang, M., Liu, Y., Li, X., Wang, Y., Guo, M., Qin, X. y Wang, X. (2019) Bacterial β -glucuronidase alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: A possible crucial new diagnostic and therapeutic target for inflammatory bowel disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 513 (2): 426-433.

30. Himmel, M., MacDonald, K., Garcia, R., Steiner, T. y Levings, M. (2013) Helios⁺ and Helios⁻ Cells Coexist within the Natural FOXP3⁺ T Regulatory Cell Subset in Humans. *J Immunol*.
31. Inomata, T., Hua, J., Di Zazzo, A., Dana, R. (2016) Impaired Function of Peripherally Induced Regulatory T Cells in Hosts at High Risk of Graft Rejection. *Sci Rep*.
32. Jacobse, J., Li, J., Rings, EHM., Samsom, JN. y Goettel, JA. (2021) Intestinal Regulatory T Cells as Specialized Tissue-Restricted Immune Cells in Intestinal Immune Homeostasis and Disease. *Front. Immunol*. 12:716499.
33. Josefowicz, S.Z., Lu, L.F. y Rudensky, A.Y. (2012) Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 30:531-64.
34. Karpathiou, G., Papoudou-Bai, A., Ferrand, E., Dumollard, J. y Peoc'h, M. (2021) STAT6: A review of a signaling pathway implicated in various diseases with a special emphasis in its usefulness in pathology. *Pathology - Research and Practice*. 223.
35. Keller, D., Windsor, A., Cohen, R. y Chand, M. (2019) Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: review of the evidence. *Techniques in Coloproctology*. 23, 3–13.
36. Kennedy A., Waters, E., Behzad, R., Hinze C., Williams, C., Janman, D., Fox, T., Booth, C., Pesenacker, A., Halliday, N., Soskic, B., Kaur, S., Qureshi, O., Morris, E., Ikemizu, S., Paluch, C., Huo, J., Davis, S., Boucrot, E., Walker, L. y Sansom, D. (2022) Differences in CD80 and CD86 transendocytosis reveal CD86 as a key target for CTLA-4 immune regulation. *Nature Immunology*. 23. 1365-1378.
37. Kim, D., Ko, J., Jeon, Y., Han, Y., Kim, H., Poudel, A., Jung, H., Ku, S., Kim, S., Park, S., Park, J., Choi, B., Park, S., Um, J. y Hongm S. (2013) *Ixeris dentata* NAKAI Reduces Clinical Score and HIF-1 Expression in Experimental Colitis in Mice. *Evid Based Complement Alternt Med*. 9.
38. Koelink, P., Wildenberg, M., Stitt, L., Feagan, B., Koldijk, M., van't Wout, A., Atreya, R., Vieth, M., Brandse, J., Duijst, S., Velde, A., D'Haens, G., Levesque, B. y Brink, G. 2018. Development of Reliable, Valid and Responsive Scoring Systems for Endoscopy and Histology in Animal Models for Inflammatory Bowel Disease, *Journal of Crohn's, and Colitis*. 12 (7): 794-803.

39. Laissue, P. (2019) The forkhead-box family of transcription factors: key molecular players in colorectal cancer pathogenesis. *Molecular Cancer*. 18:5.
40. Landy J., Ronde E., English N., Clark S., Hart A., Knight S., Ciclitira P. y Al-Hassi H. (2016) Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel diseases associated colorectal cancer. *World Journal Gastroenterology*. 22(11):3117-26.
41. Lee, SM., Kim, N., Son, HJ., Park, JH., Nam, RH., Ham, MH., Choi, D., Sohn, SH., Shin, E., Hwang, YJ., Sung, J., Lee, DH, Lee, HN. (2016) The Effect of Sex on the Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium-treated Mice Model of Colon Cancer. *J Cancer Prev*.21(4):271-278.
42. Leon-Cabrera, S., Molina-Guzman, E., Delgado-Ramirez, Y., Vázquez-Sandoval, A., Ledesma-Soto, Y., Pérez-Plasencia, C., Chirino, Y., Delgado-Buenrostro, N., Rodríguez-Sosa, M., Vaca-Paniagua, F., Ávila-Moreno, F., Gutierrez-Cirlos, E., Arias-Romero, L. y Terrazas, L.(2017) Lack of STAT6 Attenuates Inflammation and Drives Protection against Early Steps of Colitis-Associated Colon Cancer. *Cancer Immunol Res* 1 May 2017; 5 (5): 385–396.
43. Li, C., Jiang, P., Wei, S., Su, X., Wang, J. (2020) Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Molecular Cancer* 19, 116.
44. Li, M. y Rudensky, A. (2016) T cell receptor signalling in the control of regulatory T cell differentiation and function. *Nat Rev Immunol* 16, 220–233.
45. Li, Z., Li, D., Tsun, A. et al. (2015) FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation. *Cell Mol Immunol* 12, 558–565.
46. Li, X. y Zheng, Y. (2015) Regulatory T cell identity: formation and maintenance. *Trends in Immunology*. 36 (6); 344-353.
47. Lin X, Chen M, Liu Y, Guo Z, He X, Brand D, Zheng S. (2013) Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 6(2):116-23.
48. Long, A., Lundsmith, E. y Hamilton, K. (2017) Inflammation and Colorectal Cancer. *Curr Colorectal Cancer*.

49. Marley A. y Nan H. (2016) Epidemiology of colorectal cancer. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*. 7(3):105-114.
50. Mármol, I., Sánchez de Diego, C., Pradilla, A., Cerrada, E. y Rodríguez, J. (2017) Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Internacional Journal of Molecular Science*. 18:197.
51. Maerten, P., Shen, C., Bullens, D., Van Assche, G., Van Gool, S., Geboes, K., Rutgeerts, P. y Ceuppens, J. (2005) Effects of interleukin 4 on CD25+CD4+ regulatory T cell function. *Journal Autoimmunity*. 25, 112 - 120.
52. Meyers, R. (2023). Técnicas especiales de tinción para la evaluación de mucinas. Leica Biosystems. Consultado el 04 de marzo de 2023. En: <https://www.leicabiosystems.com/es/knowledge-pathway/special-stain-techniques-for-the-evaluation-of-mucins/>
53. Mottet, C., Holm, H., Uhlig, Powrie, F. (2003) Cutting Edge: Cure of Colitis by CD4+CD25+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 1; 170 (8): 3939–3943.
54. Montalvo-Arenas, C. (2010) Técnica histológica. Facultad de Medicina. UNAM. 12.
55. Morales, J., Falanga, Y., Depczynski, U. Fernando, J. y Ryan, J. (2010) Mast cell homeostasis and the JAK-STAT pathway. *Genes & Immunity*. 11: 599-608.
56. Murthy, S. Cooper S., Shim, H., Shah., Ibrahim, A. y Sedergran J. (1993) Treatment of dextran sulfate sodium-induced murine colitis by intracolonic cyclosporin. *Digestive diseases and sciences*. 1722-1734.
57. Nagao-Kitamoto, H., Kitamoto S. y Kamada, N. (2022) Inflammatory bowel disease and carcinogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*. 41. 301-316.
58. Najafi, M., Farhood, B. y Mortezaee, K. (2019) Contribution of regulatory T cells to cancer: A review. *Journal of Cellular Physiology*. 234:6. 7983-7993 pp.
59. Nishikawa, M., Oshitani, N., Matsumoto, T., Nishigami, T., Arakawa, T., Inoue, M. (2005) Accumulation of mitochondrial DNA mutation with colorectal carcinogenesis in ulcerative colitis. *Br J Cancer*.
60. Ohkura, N., Hamaguchi, M., Morikawa, H., Sugimura, K., Tanaka, A., Ito, Y., Osaki, M., Tanaka, Y., Yamashita, R., Nakano, N., Huehn, J., Fehling, HJ., 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*.
61. Ohue, Y. y Nishikawa, H. (2019) Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci.* 110(7):2080-2089.
 62. Olguín, J. E., Medina-Andrade, I., Rodríguez, T., Rodríguez-Sosa, M., y Terrazas, L. I. (2020). Relevance of Regulatory T Cells during Colorectal Cancer Development. *Cancers*, 12(7), 1888.
 63. Patel, S. y Ahnen, D. (2018) Colorectal Cancer in the Young. *Current Gastroenterology Reports* 20(15).
 64. Peixoto, R, Ferreira, A., Cleary, J., Fogacci, J., Vasconcelos, J. y Jácome A. (2022) Risk of Cancer in Inflammatory Bowel Disease and Pitfalls in Oncologic Therapy. *Journal of Gastrointestinal Cancer*.
 65. Rivera-Rugeles, Ana. (2022) Participación de STAT6 en la modulación de las células T reguladoras durante las etapas tempranas del cáncer de colon asociado a colitis. 2022. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
 66. Rogler, G. (2014) Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Letters*. 345:2. 235-241.
 67. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. y 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. *J Immunol.*155 (3):1151-64.
 68. Salvo-Romero, E., Alonso-Cotoner, C., Pardo-Camacho, C., Casado-Bedmar, M. y Vicario, M. (2015) Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 107:11. 686-696.
 69. Sawant, D. y Vignali, D. (2014) Once a Treg, always a Treg? *Immunological Reviews*. 1 (259): 173-191.
 70. Schiavon, V., Ducheze, S., Branchtein, M., How-Kit, A., Cassius, C., Daunay, A., Shen, Y., Dubanchet, S., Colisson, R., Vanneaux, V., Pruvost, A., Roucairol, C., Setterblad, N., Bouaziz, JD., Boissier, MC., Semerano, L., Graux, C., Bensussan, A., Burny, A., Gallo, R., Zagury, D. y Le Buanec, H. (2019) Microenvironment tailors nTregs structure and function. *PNAS*. 116 (13): 6298-6307

71. Schmetterer, K., Neunkirchner, A. y Pickl, W. (2012) Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *The FASEB Journal*, 26: 2253-2276.
72. Schmitt E. y Williams C. (2013) Generation and function of induced regulatory T cells. *Front. Immunol.* 4:152.
73. Schmitt, M. y Greten, F. (2021) The inflammatory pathogenesis of colorectal cancer. *Nature Reviews Immunology* 21, 653–667. Deepali
74. Schmidt, A., Oberle, N. y Krammer, PH. (2012) Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol.*
75. Serrano-Hernández, A. (2009) Células colaboradoras 9TH1, TH2, TH17 y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatología Clínica.* 5: 1-5.
76. Shevryev, D. y Tereshchenko, V. (2020) Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis. *Front. Immunol.* 10:3100.
77. Siachoque, H., Satisteban, N., e Iglesias-Gamarra, A. (2011) Linfocitos T reguladores: subpoblaciones, mecanismo de acción e importancia en el control de la autoinmunidad. *Revista Colombiana de Reumatología*, 18(3): 203-220.
78. Slattery, ML., Potter, JD., Curtin, K., Edwards, S., Ma, KN., Anderson, K., Schaffer, D., Samowitz, WS. (2001) Estrogens reduce and withdrawal of estrogens increase risk of microsatellite instability-positive colon cancer. *Cancer Res.* 1;61(1):126-30.
79. Son, H., Sohn, S., Kim, N., Lee, H., Lee, S., Nam, R., Park, J., Song, C., Shin, E., Na, H., Kim, J., Lee, D., Surh, Y. (2019) Effect of Estradiol in an Azoxymethane/Dextran Sulfate Sodium-Treated Mouse Model of Colorectal Cancer: Implication for Sex Difference in Colorectal Cancer Development. *Cancer Res Treat.* 51(2):632-648.
80. Stintzing S. (2014) Management of colorectal cancer. *F1000Prime Reports.* 6:108.
81. Stucchia, A., Maspes, F., Montee-Rodrigues, E., Fousteri, G. (2023) Engineered Treg cells: The heir to the throne of immunotherapy. *Journal of Autoimmunity.* 0896-8411.
82. Sun, B., Liu, M., Cui, M. y Li, T. (2020) Granzyme B-expressing Treg cells are enriched in colorectal cancer and present the potential to eliminate autologous T conventional cells. *Immunology Letters* 217. 7-14 pp.

83. Takaki, H., Ichiyama, K., Koga, K., Chinen, T., Takaesu, G., Sugiyama, Y., Kato, S., Yoshimura, A. y Kobayashi. (2008) STAT6 Inhibits TGF-beta1-mediated FoxP3 induction through direct binding to the FoxP3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 283(22):14955-62.
84. Tanoue, T., Atarashi, K. y Honda, K. (2016) Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 16, 295–309.
85. Togashi, Y., Shitara, K. & Nishikawa, H. (2019) Regulatory T cells in cancer immunosuppression - implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 356–371.
86. Toker A, Engelbert D, Garg G, Polansky JK, Floess S, Miyao T, et al. (2013) Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus. *J Immunol*. 190:3180–8.
87. Torrencillas-Torres, L., Cervantes-Sánchez, G., Cárdenas, E., Martínez, B., Reyes-Pérez, J., Casanova, I., Ademe-González, I., Hernández-Guerrero, A., Melchor-Ruan, J.-López-Basave, H., Farías-Alarcon, A., Fernández-Orozco, A., Calderillo-Ruiz, G., Pimentel-Renteria, A., Huitzil-Meléndez, F. y Valle-Solis, A. (2019) Recomendaciones para diagnóstico y tratamiento del cáncer de colon y recto en México. *Gaceta Mexicana de Oncología*.
88. Uhlig, H., Coombes, J., Mottet, C., Izcue, A., Thompson, C., Fangerm A., Tannapfel, A., Fontenot, J., Ramsdell, F., Powrie, F. (2006) Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-Secreting CD4+CD25+ T Cells during Cure of Colitis. *The Journal of Immunology*. 177(9):5852-5860.
89. Vancamelbeke, M. y Vermeire, S. (2017) The instinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 11:9.
90. Weinberg, B., Marshall J. y Salem M. (2017) The Growing Challenge of Young Adults with Colorectal Cancer. *Oncology*. 31(5):381-389.
91. Zhang, YZ., Li, YY. (2014) Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 7;20(1):91-9.
92. Zeng, H., Zhang, R., Jin, B., Chen, L. (2015) Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell Mol Immunol* 12, 566–571.

93. Zhao H, Liao X and Kang Y (2017) Tregs: Where We Are and What Comes Next? Front. Immunol. 8:1578.
94. Zhong, W., Liu, X., Zhu, Z., Li, Q. y Li., K. (2021) High levels of Tim-3+Foxp3+Treg cells in the tumor microenvironment is a prognostic indicator of poor survival of diffuse large B cell lymphoma patients. International Immunopharmacology. 96

11. ANEXO

11.1 SOLUCIONES

Azul alcian

Ácido acético al 3% (pH de 2.5) + 0.5 g de Azul alcian.

Buffer de FACS

PBS + SFB 0.5 % + NaN₃ 15.4 mM.

Buffer de Proteinasa K.

Agua destilada + NaCl 100mM + EDTA 25mM + SDS 0.5%.

Buffer de separación magnética

PBS + EDTA (2 mM) + BSA 0.5%. Ajustar a pH de 7.2 y filtrar con membranas de 0.22 μm.

Buffer TBE 1x

Agua destilada + H₃BO₃ 1M + Tris-Base 1M + EDTA 0.02 M.

Eosina amarillenta

Solución madre (1%): 0.5 g de Eosina Amarillenta (Hycel) + 10 mL de Agua destilada + 40 mL Etanol al 95%.

Solución de trabajo: 25 mL de la solución madre + 75 mL de Etanol al 80% + 0.5 mL de Ácido acético glacial.

Medio RPMI Medium 1640

Agua destilada + Medio RPMI Medium 1640 (Gibco, R4130-1L) + NaHCO₃ 0.2%. Ajustar a pH de 7.1 y filtrar con membrana de 0.2 mm (Corning).

Medio incompleto

Medio RPMI Medium 1640 + SFB al 10% + Antibióticos (Penicilina-Estreptomicina) al 1%. Filtrar con membrana de 0.22 μm.

Medios de cultivo RPMI completo

Medio incompleto + Piruvato de sodio (1 mM) + Solución de aminoácidos no esenciales (1x) + β -mercaptoetanol (50 mM).

Medio de cultivo de diferenciación

Medio de cultivo RPMI completo + Anti-CD28 (1 μ g/mL) + Rm-IL-2 (100 u/mL) + Rh-TGF- β (5 ng/mL).

Medio de expansión

Medio de cultivo completo + Rm-IL-2 (100 u/mL).

PBS (Buffer de fosfato salino) 1x

Agua destilada + NaCl 137 mM + Na₂HPO₄ 10 mM + KCl 2.7 mM + KH₂PO₄ 1.8 mM.
Ajustar a pH de 7.4 y filtrar con membrana de 0.22 μ m.

Solución hemolizante

Agua destilada + Tris HCl 13 mM + NH₄Cl 155mM.