



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**La proteína ATG16L1 promueve
resistencia en un modelo de cáncer
de colon**

TESIS

Que para obtener el título de

Biólogo

P R E S E N T A

Javier Alejandro Martínez Morales

DIRECTOR DE TESIS

Dr. José Luis Reyes Hernández



Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2024



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.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó con el apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica DGAPA-PAPIIT UNAM IN224520 y DGAPA-PAPIIT UNAM IN215323 y Proyecto de Apoyo a los Profesores de Carrera (PAPCA) FESI-PAPCA 2021-2022-18

Agradecemos a la Biol. Marisol Ibet González y al Dr. José Luis Reyes Hernández, por el apoyo y la asesoría brindada durante la realización de este proyecto.

Agradecemos al Biol. Tomas Ernesto Villamar y MVZ María Leticia Flores, por el apoyo en el mantenimiento de los animales experimentales para la realización del proyecto.

DEDICATORIA

Escribiendo esto me doy cuenta de que no soy consciente del tiempo que ha pasado y siento que esto es sólo un pequeño paso que he dado a lo largo de todo este periodo en mi vida, tras haber terminado todas mis materias, sin embargo, me hace darme cuenta de que, aunque sea poco, me he mantenido avanzando, en movimiento. Me gusta recordar la frase “Roma no se construyó en un día” pues denota que para construir un gran imperio no se puede hacer mucho de la noche a la mañana y, aunque siento que esta es la primera piedra, sé que puedo sentirme bien conmigo mismo, porque a pesar de aquellos obstáculos (sean grandes o pequeños, depende del punto de vista de quien lo vea) he podido concluir con este paso y, a pesar de que sé que pudiera haberlo de una manera mucho más satisfactoria para mí, aún así puedo sentirme orgulloso de ello y sobre todo agradecido. Agradecido con las lecciones que he aprendido y con las personas con las que comparto este pequeño logro, pues no sólo es mío, sino de todos aquellos que me han apoyado con su amistad, sabiduría y consejos. Es por ello por lo que quiero dedicar algunas palabras hacia ellos.

A mis padres, agradezco enormemente todo su apoyo, pues son los que me han brindado todas las herramientas para poder formarme a lo largo de mi vida y aunque quizá no tengamos la relación de familia perfecta, espero que a partir de este punto se fortalezca cada vez más. Les agradezco todo y espero poder devolver con cariño todo lo que me han dado, nuevamente mil gracias.

Al Doctor José Luis y a Mari, les agradezco por haberme aceptado desde aquel lejano segundo semestre de carrera, por todo lo que me han enseñado y me han dado en su laboratorio, además de su gran amistad, pues hicieron que no se sintiera como un simple laboratorio, sino como otro hogar. Pero, sobre todo, les agradezco por su comprensión y paciencia conmigo, también espero en un futuro cercano devolverles parte de todo lo que me han dado.

A mis amigos, quienes me han apoyado y me han brindado momentos de alegría. Agradezco a mi Cachito de Galaxia (Irancita), por ser mi primera amiga de la carrera, el destino siempre quiso que coincidiéramos en esta vida, gracias por haberme apoyado cuando me encontraba triste y por ser esa gran amiga que nunca he tenido, siempre comprensiva y cariñosa y por ser esa consejera que todos necesitan. A George (Jorge), por haber sido un gran amigo todo este tiempo, pues también ha sido un gran apoyo emocional, en verdad espero se pueda estrechar aún más nuestro lazo y podamos compartir más cosas en común, gracias por ser de mis mejores amigos. A Paquito, quien llegó tarde en esta etapa de mi vida y, sin embargo, se instaló rápido como uno de mis mejores amigos, gracias por también haber sido un gran apoyo emocional y por ser alguien tan interesante y divertido, además de compartir la afición por los videojuegos. Al Inge (Luis), por ser el que llevo conociendo más tiempo, por haber compartido noches de juegos, conversaciones profundas y salidas que me han ayudado a despejarme, te agradezco ser de mis mejores amigos y espero que, aunque no compartamos la misma carrera sigamos compartiendo por mucho tiempo más esta gran amistad. También quiero agradecer a todos aquellos que han hecho del laboratorio un lugar más bonito: Dani, Artur, Doc Alicia (agradezco mucho que también me apoyó cuando me encontraba mal), Doc Tona (agradezco esas pláticas reflexivas y su apoyo), Leo, Areli, Nat, Uriel; muchas gracias por ser tan buenos compañeros y amigos.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Cáncer de colon como un problema de salud pública	6
1.2 Factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer de colon	7
1.3 Inflamación en cáncer	8
1.4 Autofagia y cáncer	9
2. ANTECEDENTES	12
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos particulares	15
6. METODOLOGÍA	15
6.1 Animales de experimentación	15
6.2 Inducción de cáncer colorrectal	15
6.3 Histología y análisis microscópico	16
6.4 Citometría de flujo	16
7. RESULTADOS	19
8. DISCUSIÓN	32
9. CONCLUSIONES	36
10. REFERENCIAS	37

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer de colon como un problema de salud pública

El cáncer de colon representa el tercer tipo de cáncer con mayor incidencia en las personas alrededor del mundo, contando para el año 2020 con un total de 1.94 millones de casos, por debajo del cáncer de mama (2.26 millones) y de pulmón (2.21 millones). A su vez, el cáncer colorrectal es el segundo tipo de cáncer que causa más muertes al año, obteniendo un aproximado de 942,000 defunciones. En México, la incidencia de casos es de alrededor de 15 mil casos al año, de los cuales un aproximado de 7,700 personas mueren a causa de este, siendo el tercer tipo de cáncer más incidente en la población mexicana, por debajo del cáncer de mama y próstata con el primer y segundo lugar respectivamente; y teniendo el segundo lugar de mortalidad, sólo por debajo del cáncer de mama (IARC, 2020).

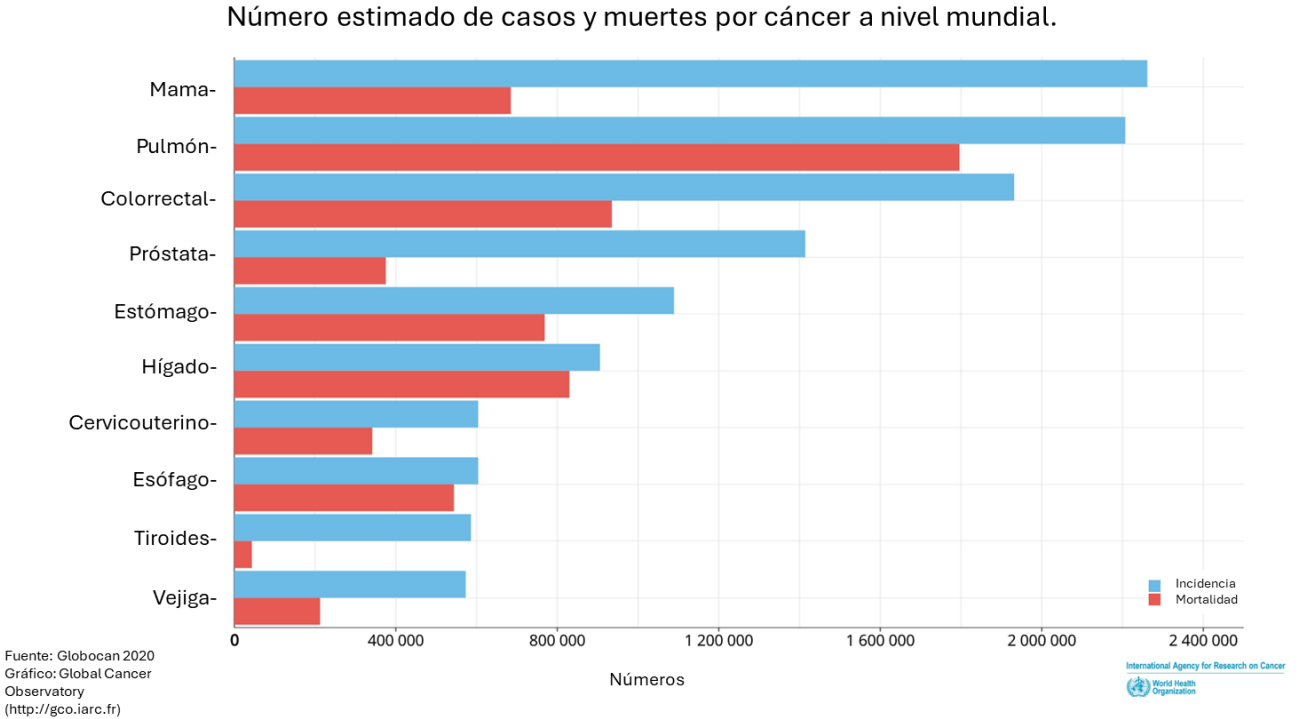


Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer de colon mundialmente. Gráfica que representa la incidencia y mortalidad del cáncer de colon a nivel mundial y su comparación con otros tipos de cáncer (extraído y modificado de: Globocan, 2020).

1.2 Factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer de colon

La dieta es el principal factor de riesgo exógeno relacionado al cáncer de colon, sin embargo, existen otros factores, tales como la deficiencia de actividad física, el consumo de tabaco, uso habitual de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, algunas condiciones genéticas y el síndrome metabólico. Además, el desarrollo de enfermedades inflamatorias intestinales (EII), Colitis Ulcerativa (CU) y enfermedad de Crohn (EC), juegan un papel importante al incrementar el riesgo de cáncer colorrectal (WCRF y AICR, 2007; Labianca R., *et al.*, 2010).

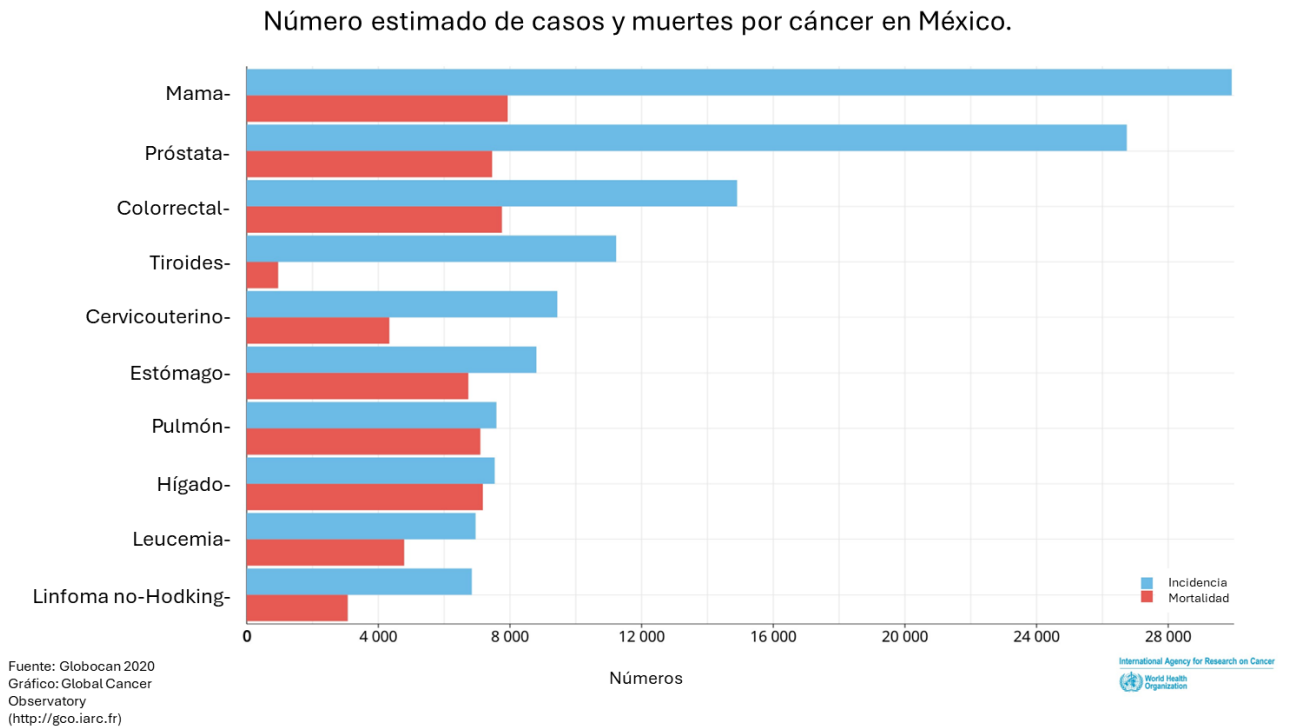


Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer de colon en México. Gráfica que representa la incidencia y mortalidad del cáncer de colon en la población mexicana y su comparación con otros tipos de cáncer presentes en México (extraído y modificado de: Globocan, 2020).

1.3 Inflamación en cáncer

La CU produce una exposición crónica a la inflamación, generando un ambiente de estrés en las células epiteliales del intestino, provocando que las células del sistema inmune puedan infiltrarse a través del epitelio, causando una desregulación en la respuesta inmune, así como una disbiosis debido a la permeabilidad de esta barrera, permitiendo a su vez una interacción con genes envueltos en rutas carcinogénicas, y produciendo diversas alteraciones genéticas (Yao D., *et al.* 2019; Shah S., 2022; Hsiao S. *et al.* 2022).

Esta exacerbación en la respuesta inmune es regulada por medio de la autofagia, proceso el cual es un regulador de la inflamación, por medio de la activación del inflammasoma (Rodger M., *et al.*, 2014; Li X. *et al.*, 2020), así como la secreción de citocinas (Saitoh T., *et al.*, 2008; Harris J., *et al.*, 2011).

1.4 Autofagia y cáncer

La autofagia es un proceso catabólico de degradación que ha sido conservado evolutivamente en organismos eucariontes, siendo de utilidad para mantener la homeostasis de las células a través el reconocimiento de macromoléculas, agregados proteicos, así como de organelos dañados e incluso patógenos, que son transportados hacia los lisosomas y degradados por medio de hidrolasas lisosomales, para la producción de nucleótidos, aminoácidos, ácidos grasos, azúcares y ATP, y posteriormente ser reciclados en el citosol (Kocaturk N., *et al.*, 2019; Li X., *et al.*, 2020). Existen tres tipos principales de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperones. La macroautofagia (referida posteriormente como autofagia), es la forma regulada principal de autofagia, constando de la formación de una doble membrana a partir de una porción del citoplasma, que reconocen y secuestran la carga celular que ha sido marcada por adaptadores de autofagia. La microautofagia implica la inmersión directa de la carga citoplasmática hacia el lisosoma mientras que la autofagia mediada por chaperones consiste en una translocación asistida por chaperones de proteínas substrato a través de la membrana del lisosoma (Zhong Z., *et al.*, 2016; Kocaturk N., *et al.*, 2019; Mizushima N y Levine B., 2020; Li X., *et al.*, 2020).

Fisiológicamente, la autofagia cumple un papel importante en la homeostasis de la célula, eliminando proteínas y organelos dañados, especies reactivas de oxígeno (ROS); proporciona estabilidad genómica, así como el mantenimiento de las funciones bioenergéticas, además de la degradación de proteínas oncogénicas y la inducción de mecanismos de respuesta en contra de transformaciones malignas. Sin embargo, el microambiente también cumple un papel importante, debido a que, si las células cancerígenas ya están establecidas, pueden utilizar la autofagia para combatir las condiciones de estrés a las que se someten las células transformadas, como la falta de nutrientes, hipoxia, estrés oxidativo; promoviendo el crecimiento de tumores, así como la angiogénesis, metástasis e invasión durante la tumorigénesis (Kocaturk N., *et al*, 2019; Mizushima N. y Levine B., 2020).

Existen proteínas asociadas a la autofagia (ATG), que son esenciales para el reconocimiento de substratos que serán degradados, así como para la biogénesis del autofagosoma (Lamb C., *et al.*, 2013; Gatica D, *et al.*, 2018), las cuales han sido altamente conservadas en eucariotas, además de actuar de manera jerárquica y similar en levaduras y mamíferos (Itakura E. y Mizushima N., 2010). La formación del autofagosoma se ve mediado por diversos factores en todas sus etapas (iniciación, nucleación, maduración, fusión y degradación), a través de las cuales interactúan diversas proteínas, teniendo un papel crucial la proteína ATG16L1 en el proceso de nucleación y maduración.

La proteína ATG16L1 de mamíferos (siendo el homólogo de la proteína atg16 en levaduras) fue inicialmente identificada en células de ratones. Es una proteína de 55-68

kDa que forma homodímeros a través de su región superenrollada y WD40. ATG16L1 forma un complejo de 800kDa, conteniendo ocho juegos de ATG5-ATG12 y ATG16L1. ATG16L1 posee tres dominios principales que contribuyen a distintas funciones: una región N-terminal conteniendo un dominio con un enlace para ATG5, una región central conteniendo un dominio superenrollado (coiled-coil, CCD) y siete dominios WD40 localizados en la mitad de la región C-terminal (Mizushima N. *et al.* 2003; Gammoh N., 2020; Hamaoui D. y Subtil A., 2021).

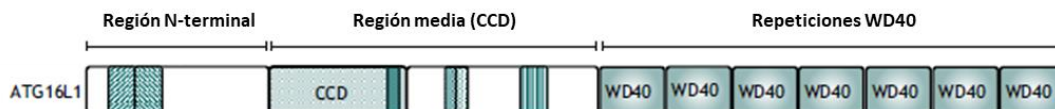


Figura 3. Organización de los dominios de la proteína ATG16L1. Arriba de la proteína se resaltan las tres regiones principales: la región N-terminal, la región media y la región WD40 (extraído y modificado de: Gammoh N., 2020).

ATG16L1 cumple con distintas funciones en diferentes etapas de la autofagia. ATG16L1 media el proceso de biogénesis del autofagosoma, reclutando al complejo ATG5-ATG12 hacia el fagóforo (Gammoh N., 2020; Hamaoui D. y Subtil A., 2021; Dudley L. *et al.*, 2019; Juris L., *et al.*, 2015). ATG16L1 (unido a ATG5) junto con el complejo ULK han sido localizados en el fagóforo en crecimiento (Koyama-Honda I., *et al.*, 2013). La biogénesis del autofagosoma es regulada por mTOR, el cual bajo condiciones basales va a desactivar la autofagia, mientras que, en condiciones de estrés oxidativo, inanición u otras perturbaciones ambientales mTOR será inhibido, activando a ULK1 y FIP200. ULK1, a través del fosfatidilinositol 3-fosfato, va a marcar el sitio de ensamblaje del fagoforo (phagophore assembly site, PAS), y crear una plataforma para reclutar

proteínas de unión a lípidos como WIPI2b, la cual junto a FIP200 ayudará al reclutamiento del complejo ATG5-1TG12/ATG16L1 al PAS (Hamaoui D. y Subtil A., 2021; Dooley H., *et al.*, 2015; Nishimura T., *et al.*, 2013). Estos eventos facilitan la lipidación de ATG8 en el fagóforo y contribuyen a la maduración del autofagosoma, para posteriormente fusionarse con el sistema del lisosoma formando un autolisosoma (Gammoh N., 2020).

2. ANTECEDENTES

El término autofagia fue acuñado por Christian de Duve en 1963 en el cual partes de la célula de alguna forma lograban introducirse dentro de los lisosomas de la misma célula para poder degradarse. La identificación de la mayoría de los productos del gen ATG (Atg1-Atg15) fue realizada en la levadura por medio de la detección en organismos mutados que no podían crecer en condiciones de falta de nitrógeno (Tsukada M. y Ohsumi Y., 1993; Gammoh N., 2020).

En 2003, Mizushima y colaboradores identificaron la proteína ATG16L1 (primero designada Apg16L), en ratón (*mus musculus*), siendo la contraparte funcional de la proteína Atg16 en levaduras. La proteína ATG16L1 comparte una gran similitud con Atg16, sin embargo, presenta un dominio C-terminal que está ausente en levaduras. Este dominio contiene siete repeticiones WD forma una plataforma para las interacciones proteína-proteína, por lo que se esperaba que el complejo de ~800 kDa tuviese una función en la formación del autofagosoma.

En 2008, Cadwell y colaboradores propusieron como objetivo si el gen ATG16L1 cumplía un papel importante en la enfermedad de Crohn. Para analizar el papel de

ATG16L1, generaron dos líneas con alteraciones mediadas por trampas de genéticas, lo cual provocó que la expresión de la proteína tuviera un decremento, expresando un 23-37% de la cantidad esperada. Esto provocó cambios en la organización de las células de Paneth así como una expresión disminuida de LC3-II, y una disminución en la inducción de autofagosomas, demostrando que la proteína ATG16L1 interviene en el proceso de autofagia.

La autofagia juega un papel importante en la modulación de la inflamación. Se ha demostrado en diversos estudios que ATG16L1 tienen un enlace con la inflamación intestinal. Matsuzawa y colaboradores (2017), demostraron que ATG16L1 es esencial en el epitelio intestinal para evitar la pérdida de las células de Paneth, así como para el exceso de muerte celular presente en modelos animales de EII disparada viralmente. Además, en los organoides que carecían de ATG16L1 se reprodujo la pérdida de las células de Paneth y se mostró una necroptosis mediada por TNF- α , lo cual asociaron al rol de la autofagia al promover la homeostasis mitocondrial. Finalmente, bloquearon la necroptosis mediante la inhibición de TNF- α O RIPK1, lo cual mostró una mejoría en la EII desencadenada por virus. Esto demostró que a diferencia de las células tumorales en las que la autofagia promueve la muerte celular independiente de caspasa, ATG16L1 mantiene la barrera intestinal al inhibir la necroptosis del epitelio. En 2018, Aden y colaboradores analizaron la actividad de ATG16L1 en las células epiteliales del intestino. En el estudio, observaron que ATG16L1 señala la interleucina 22 (IL-22), en el epitelio intestinal, lo cual dirige a un estrés transitorio en el retículo endoplasmático (RE) y posteriormente a la activación del interferón tipo I dependiente de STING (IFN-I), el cual

se ve aumentado en los organoides intestinales mutantes para ATG16L1. Esta amplificación en la señalización contribuye a la muerte celular por medio de necroptosis. En los estudios *in vivo*, los ratones presentaban una potenciación en la inflamación ileal endógena, causando la muerte celular generalizada del epitelio. Finalmente, demostraron que el bloqueo terapéutico de INF-I mejora la inflamación ileal inducida por IL-22 en los ratones deficientes de ATG16L1.

3. JUSTIFICACIÓN

La proteína ATG16L1 juega un papel importante en la regulación de la inflamación y el proceso de carcinogénesis, así como en la enfermedad inflamatoria intestinal, sin embargo, no se conocen con exactitud los mecanismos asociados al cáncer de colon y el cómo la autofagia actúa durante el desarrollo de la patología del cáncer asociado a colitis.

4. HIPÓTESIS

La proteína ATG16L1 promueve resistencia en el avance patológico del cáncer de colon asociado a colitis.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Determinar el papel de la proteína ATG16L1 durante el desarrollo experimental de cáncer de colon asociado a colitis.

5.2 Objetivos particulares

- Inducir cáncer de colon a ratones hipomórficos para la expresión de la proteína ATG16L1 (ATG16L1^{HM}) y silvestres (WT) por medio de la administración de azoximetano y dextrano sulfato de sodio (DSS).
- Registrar el avance del cáncer asociado a colitis a través de signos clínicos: peso, longitud del colon.
- Analizar los cambios morfológicos en el colon tras la inducción de cáncer a través de análisis macroscópico e histológico.
- Caracterizar las poblaciones de células inmunitarias de linfocitos T y linfocitos B en ganglio, bazo y células peritoneales.

6. METODOLOGÍA

6.1 Animales de experimentación

Se utilizaron dos grupos de ratones, un grupo silvestre (WT) y un grupo de ratones hipomórficos para la expresión de la proteína ATG16L1 (ATG16L1^{HM}), ambos de 4-5 semanas de edad, con un fondo genético C57BL/6. Todos los animales fueron mantenidos y proporcionados por el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Todos los animales experimentales fueron manejados bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

6.2 Inducción de cáncer colorrectal

Se realizó una inyección intraperitoneal de azoximetano (12.5mg/Kg) a los ratones C57BL/6, así como a los ratones ATG16L1^{HM} y, tras 5 días post inoculación, se comenzó a administrar dextrano sulfato de sodio (DSS) al 1.5% diluido en agua. Este

procedimiento se llevó a cabo durante dos ciclos de 1 semana de exposición al DSS, por 2 semanas de restauración en los cuales se administraba agua sin el compuesto. Finalmente, ambos grupos se expusieron a un último ciclo de 1 semana de administración de DSS y 11 semanas de rehabilitación. Durante todo este proceso, se registró el peso de los ratones durante 6 días de la semana. Al término, se llevó a cabo la obtención de suero sanguíneo, realizando un corte en la vena caudal previo al sacrificio. Se realizó la obtención del colon, así como el análisis macroscópico de este y, posteriormente el proceso de histología.

6.3 Histología y análisis microscópico

Se realizó la fijación del tejido con formalina al 4% por 24h. Luego, se llevó a cabo la deshidratación con alcohol etílico a diferentes concentraciones por 20 minutos cada uno (60%, 70%, 80%, 90%, 96%) y finalmente con 3 ciclos de 20 minutos de alcohol amílico. Una vez realizada la deshidratación, se realizó la infiltración de parafina al tejido durante 2 ciclos de 24h y finalmente se llevó a cabo la inclusión en bloques de parafina. Al finalizar, se llevó a cabo la microtomía de los bloques y se realizó tinción de las muestras con la técnica de hematoxilina y eosina y una vez montadas las muestras, se analizó por medio del microscopio óptico.

6.4 Citometría de flujo

Para la obtención de células peritoneales se realizó una inyección intraperitoneal de 10mL de solución salina, con la cual se realizó un lavado peritoneal. Posteriormente, se recuperaron las células con la jeringa y se colocaron en tubos Eppendorf de 15mL. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos, se decantó el

sobrenadante y agregaron 10mL de medio y posteriormente se contabilizó la cantidad de células en cámara de Neubauer y se ajustaron a una densidad de 1×10^6 células/mL. Después, se colocaron las células en tubos Eppendorf con 300 μ L de Buffer de FACS y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante de las muestras y se le colocaron 200 μ L de Buffer de FACS, la pastilla fue resuspendida y se adicionaron 10 μ L de solución de bloqueo FBS durante diez minutos. Posteriormente se analizó por medio de citometría de flujo.

Para las células de bazo y ganglio (una vez extraídos), se realizó la separación de células en una campana de flujo laminar previamente esterilizada. Para ello se utilizaron un separador celular (100 μ m) y 2mL de medio RPMI y se maceró con el embolo de una jeringa y se colocaron las células en tubos Eppendorf. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y se agregaron 3mL de buffer de cloruro de amonio (ACK) durante 5 minutos para eliminar eritrocitos restantes en la muestra. Después, se neutralizó la reacción con 3mL de medio RPMI y adicionado con FBS. Finalmente, se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante, la pastilla resultante fue resuspendida en 10mL de medio y se realizó el conteo con ayuda de la cámara de Neubauer y posteriormente se ajustó a una densidad de 1×10^6 células/mL. Después, se colocaron las células en tubos Eppendorf con 300 μ L de Buffer de FACS y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante de las muestras y se le colocaron 200 μ L de Buffer de FACS, la pastilla fue resuspendida y se adicionaron 10 μ L de solución de bloqueo FBS durante diez

minutos. Posteriormente se colocaron los anticuerpos conjugados. Los anticuerpos utilizados para las muestras fueron los siguientes:

	1 rx
CD3-FITC-A	1 μ L
CD19-APC-A	0.4 μ L
PDL1-R-PE-A	0.4 μ L
7AAD	3 μ L

Posteriormente a la adición de los anticuerpos, se incubaron las muestras a 4°C durante 30 minutos y se utilizó citómetro ATTUNE Life Technologies para su análisis.

7. RESULTADOS

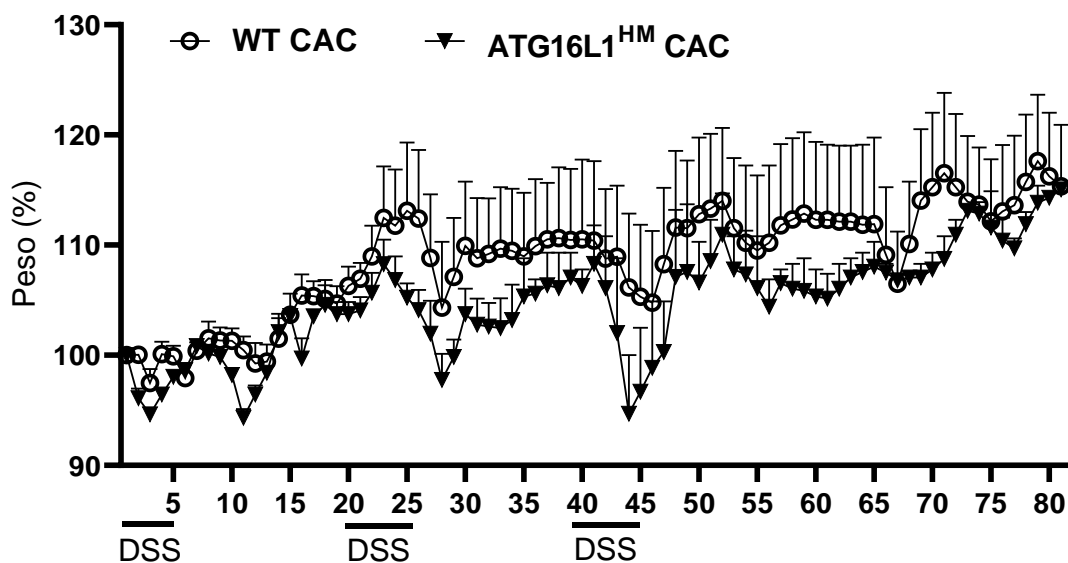


Figura 4. La deficiencia de ATG16L1 promueve la pérdida de peso en el desarrollo de cáncer asociado a colitis. Se registró la ganancia de peso durante el proceso de carcinogénesis. Se observan los tres ciclos de DSS, así como las etapas de recuperación.

El registro del peso de los ratones se llevó a cabo a lo largo de 81 días, obteniendo el porcentaje total de pérdida y aumento de peso de los ratones a través de este periodo. Se pueden observar tres picos de disminución considerable en un promedio de 4 días posteriores a la administración de DSS. En el caso de los ratones WT, la disminución observada fue en promedio de 4.4% comparado con el peso inicial en los tres picos; mientras que para los ratones ATG16L1^{HM} la disminución fue mayor, teniendo un promedio de 10.2%.

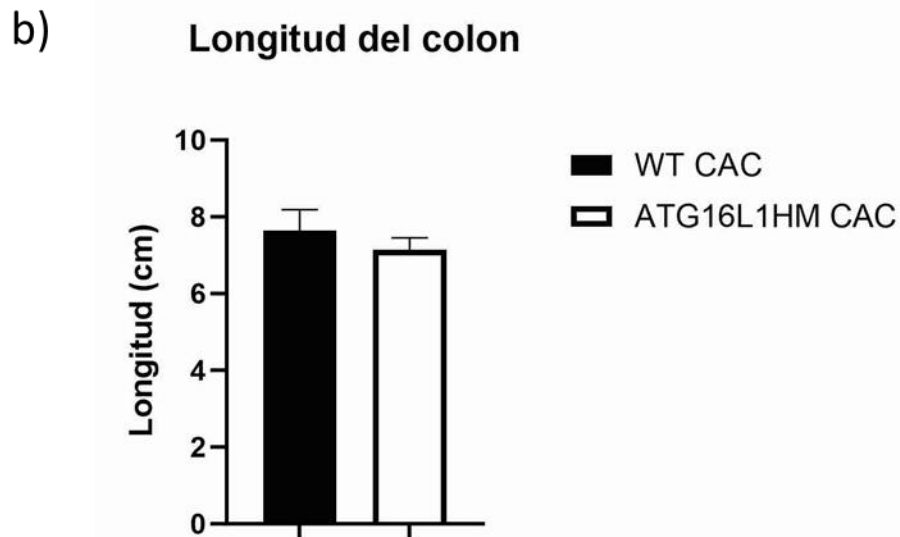


Figura 5. ATG16L1 disminuye la inflamación provocada por el desarrollo de cáncer asociado a colitis. A) se observa el colon de los ratones WT y ATG16L1^{HM}. B) gráfica de los promedios de la longitud de colon de ambos grupos de ratones.

Posterior al sacrificio, se realizó la medición del colon de los grupos experimentales. La longitud promedio del grupo WT fue de 7.6, mientras que la longitud de los ratones ATG16L1^{HM} fue de 7.2, por lo cual la diferencia no fue significativa.

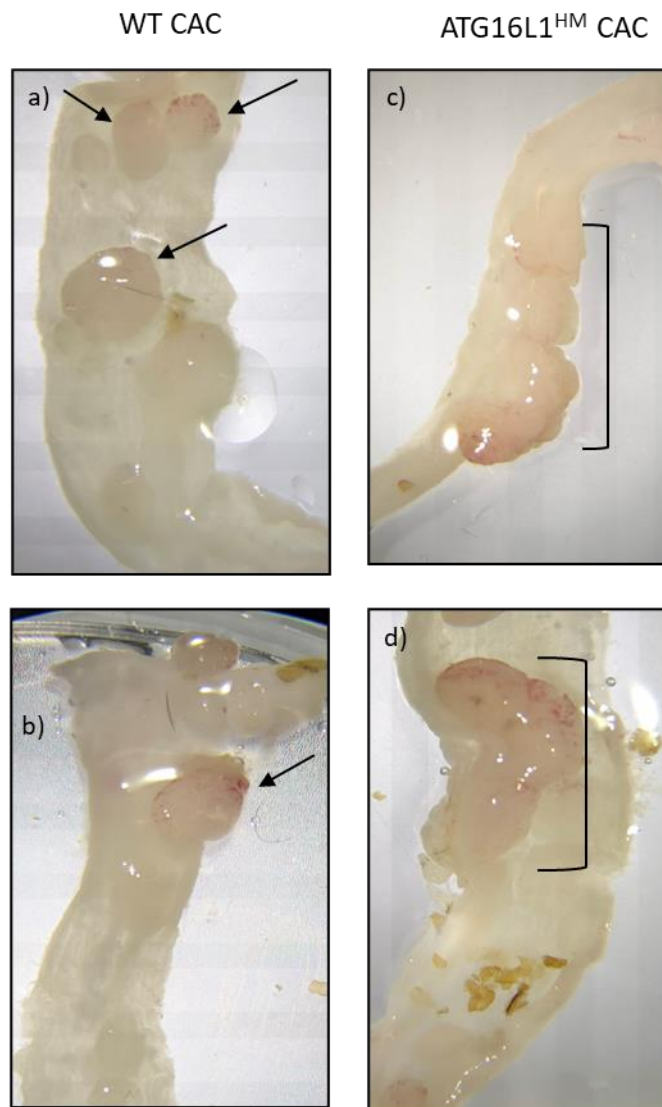
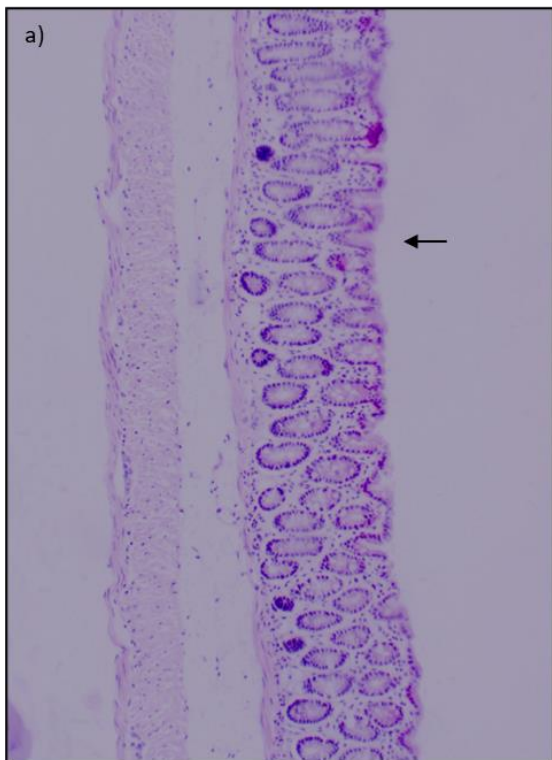


Figura 6. ATG16L1 genera resistencia al desarrollo de tumores. Imágenes representativas de colon obtenidas de animales WT (a y b) y ATG16L1^{HM} (c y d) inducidos a CAC, donde se observan los tumores que se desarrollan en cada grupo de experimentación. Todas las imágenes fueron tomadas a través de microscopio estereoscópico.

Continuando con el análisis macroscópico, se realizó un corte longitudinal para poder observar los tumores presentes en el tracto del colon de ambos grupos a través del microscopio estereoscópico. En los ratones WT, se observan tumores individuales,

pudiendo distinguirse entre sí donde inician. En los ratones ATG16L1^{HM}, se puede ver una cantidad mayor de tumores, además de que estos forman masas tumorales, sin distinguir el comienzo de cada uno de los tumores debido a la fusión entre sí (Figura 6).



WT CAC



ATG16L1^{HM} CAC

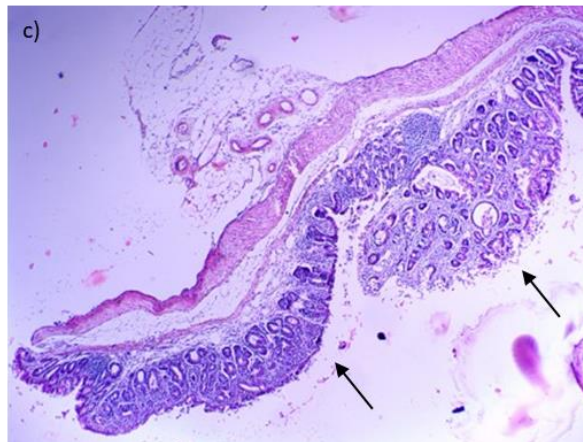


Figura 7. ATG16L1 disminuye el daño provocado por el cáncer asociado a colitis. A) Se puede observar un corte sin daño, donde se puede ver que la mucosa no tiene alteraciones. B) Se observa la mucosa de un ratón WT, la cual presenta tumores formados (flechas), así como una porción donde la estructura se mantiene intacta. C) Se observa la mucosa de un ratón hipomórfico para la proteína ATG16L1, se pueden apreciar los tumores formados (flechas), sin embargo, la mucosa presenta alteraciones a través de toda su estructura. Cortes de colon teñidos con la técnica H y E con una amplitud de 40X.

El daño en el tejido se analizó a través de cortes longitudinales de colon teñidos con H&E y las imágenes obtenidas bajo el microscopio de luz se muestran en la figura 7. En los cortes se puede observar la mucosa colónica en ratones control (a la izquierda) para poder realizar la comparación del daño desarrollado. Los ratones WT presentan un daño a través de la mucosa del colon, pudiendo observarse el desarrollo de tumores a lo largo del tracto, con separaciones entre ellos por zonas en las que el daño es mínimo, pues se observa una mucosa moderadamente transformada. En el caso del grupo ATG16L1^{HM} el colon presenta tumores de mayor tamaño abarcando una mayor porción, además

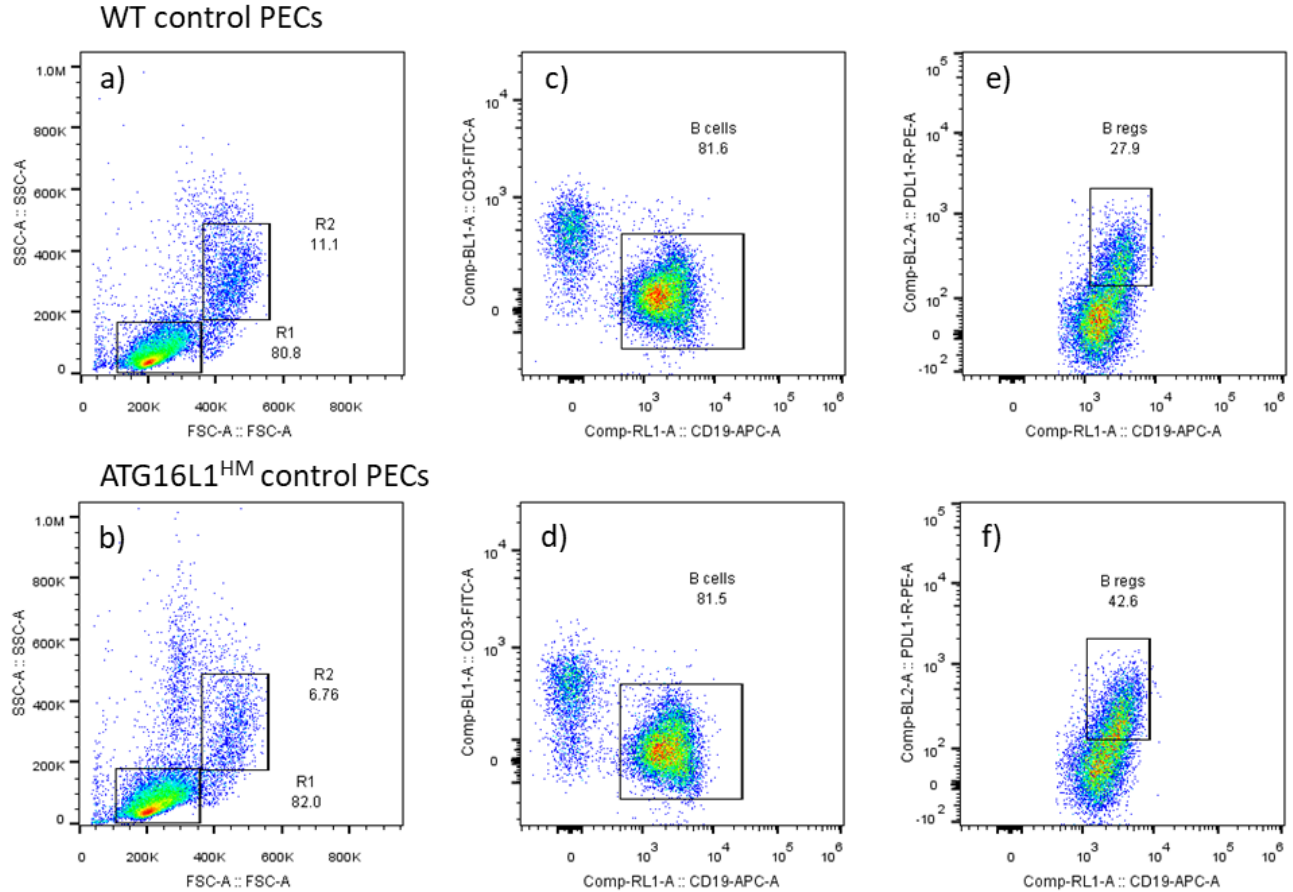


Figura 8. ATG16L1 regula la maduración de células B reguladoras. Del conteo total de células peritoneales se obtuvo su tamaño y complejidad (a, b), tomando la región 1 (R1) para ser analizada. Posteriormente, se tomaron las células positivas para los marcadores CD19 y CD3, y se eligió la región de células B (c, d). Finalmente se analizó las células positivas para el marcador PD-L1, obteniendo el total de células que son B reguladoras (e, f).

Al final del experimento se realizó la recolección de las células peritoneales (PECs), se realizó citometría de flujo para poder analizar las células de la respuesta inmune de interés. En el total de células se obtuvo un total de 80.8% de linfocitos (R1) en los

ratones WT control (a), mientras los ratones ATG16L1^{HM} control presentaron un 82% (b). Del total de linfocitos se analizaron con los marcadores CD19 y CD3 y se tomó la región de células B, para la cual el grupo WT control presentó un total de 81.6% (c) y el grupo ATG16L1^{HM} control obtuvo un total de 81.5% (d). Finalmente se analizaron las células B con marcador PD-L1, obteniendo así el total de células B reguladoras (Bregs), con un 27.9% en los ratones WT control (e) y un 42.6% en los ratones ATG16L1^{HM} control (f).

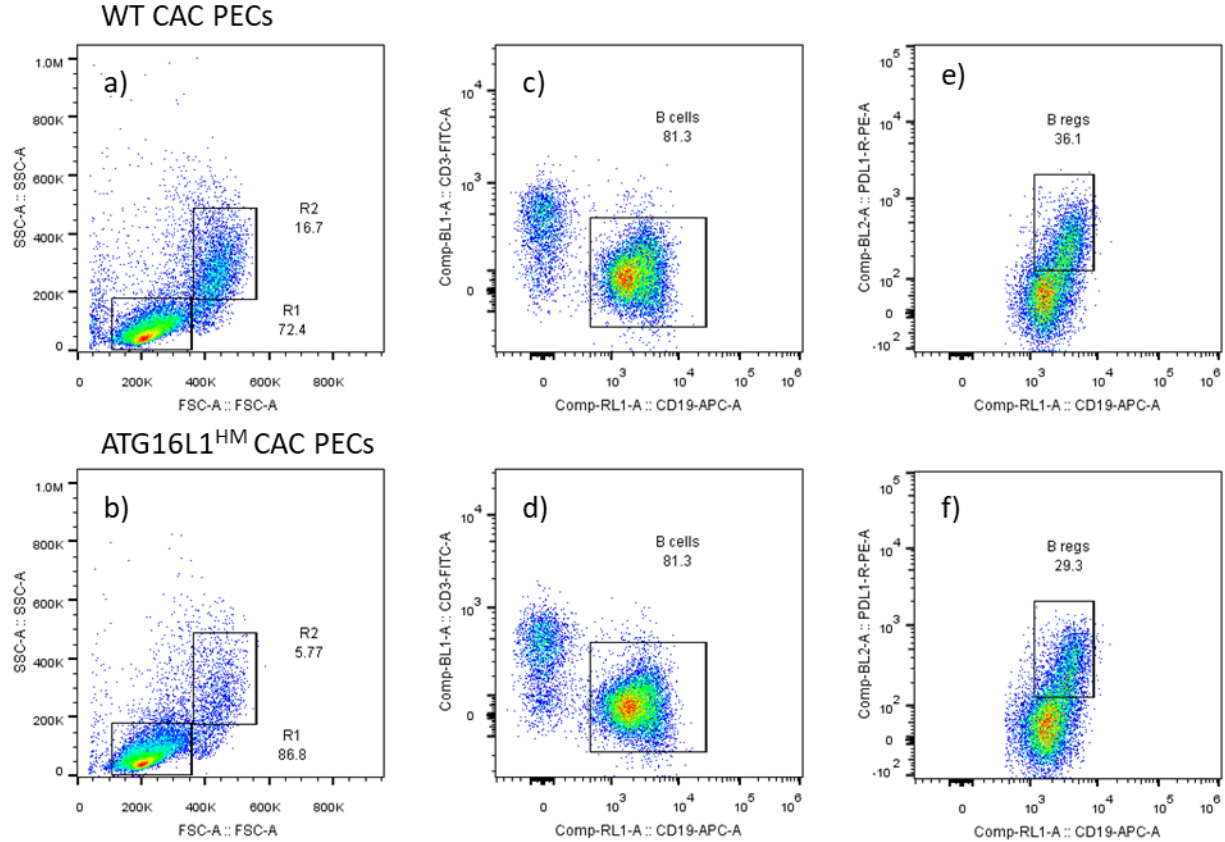


Figura 9. ATG16L1 disminuye la maduración de células B reguladoras durante el proceso de cáncer asociado a colitis. Del conteo total de células peritoneales se obtuvo su tamaño y complejidad (a, b), tomando la región 1 (R1) para ser analizada. Posteriormente, se tomaron las células positivas para los marcadores CD19 y CD3, y se eligió la región de células B (c, d). Finalmente se analizó las células positivas para el marcador PD-L1, obteniendo el total de células que son B reguladoras (e, f).

Posteriormente se analizaron las PECs de los grupos experimentales. Después de obtener el total de células se analizaron las regiones de linfocitos (R1) en ambos grupos, mostrando que en el grupo WT CAC hay un total de 72.4% (a) mientras que el grupo ATG16L1^{HM} CAC tuvo 86.8% (b). Del total de linfocitos, ambos grupos presentaron un

total de 81.3% de células B (c, d) y de este total, en el grupo WT CAC obtuvo un total de 36.1% de células Breg (e), mientras que el grupo ATG16L1^{HM} presentó 29.3% de células Breg (f).

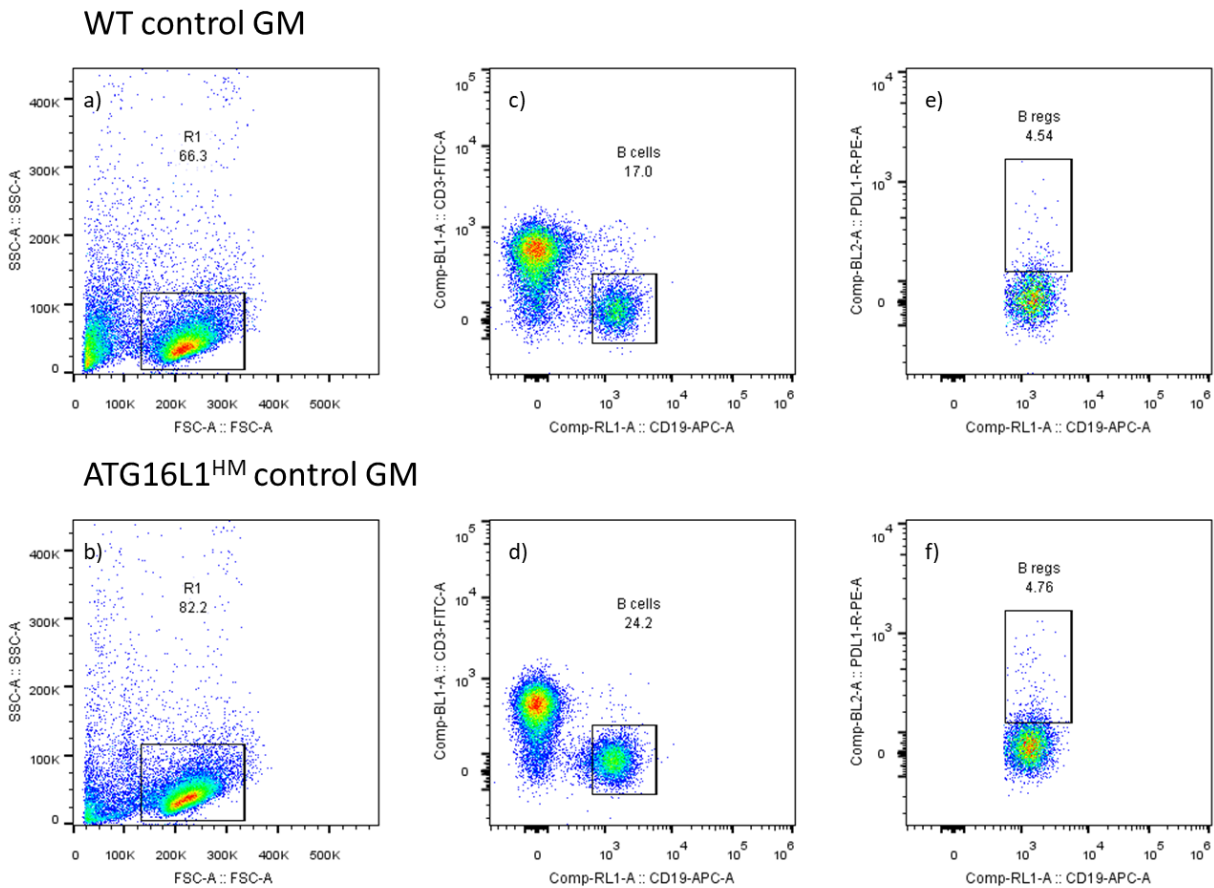


Figura 10. ATG16L1 regula la cantidad de células B reguladoras en el ganglio mesentérico. Del total de células presentes en el ganglio mesentérico (a y b), se analizaron las células positivas para los marcadores CD19 y CD3 (c y d), eligiéndose aquellas células positivas para CD19. Finalmente, se obtuvieron las células B positivas para el anticuerpo monoclonal PD-L1 (e y f).

Después se analizó el ganglio mesentérico para obtener el total de células Breg en los grupos control. El grupo WT control obtuvo un total de 66.3% linfocitos del total de células (a), mientras que el grupo ATG16L1^{HM} control presentó un total de 82.2% (b). Del total de linfocitos, los ratones WT control tuvieron un total de 17% (c) y los ratones ATG16L1^{HM} un 24.2% (d). Finalmente, se obtuvo el total de células Breg en ambos grupos control; siendo un 4.54% para los ratones WT (e) y un 4.76% para los ratones ATG16L1^{HM} (f).

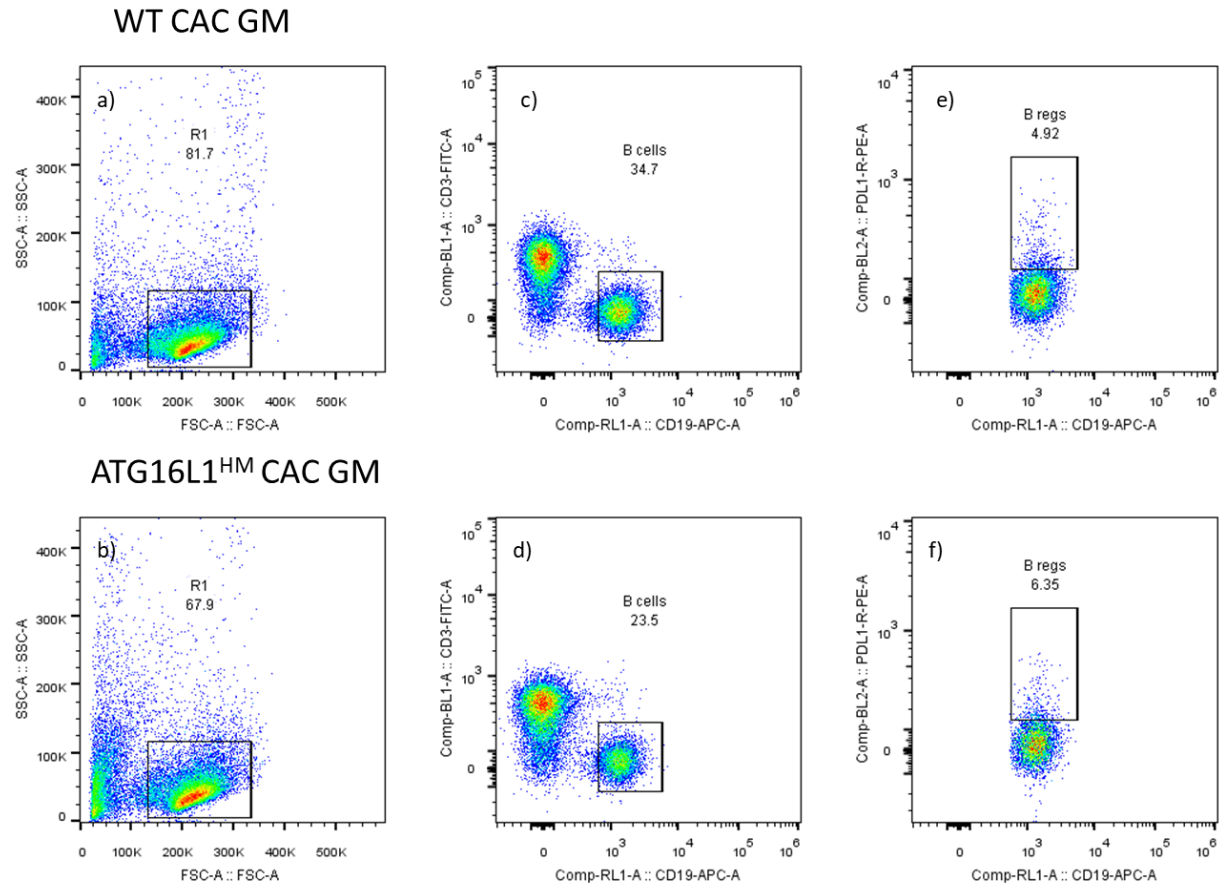


Figura 11. ATG16L1 promueve la maduración de células B reguladoras en el ganglio mesentérico durante el proceso de cáncer asociado a colitis. Del total de células presentes en el ganglio mesentérico, de los ratones experimentales (a y b), se analizaron las células positivas para los marcadores CD19 y CD3, eligiéndose aquellas positivas para CD19. Finalmente se obtuvieron las células B positivas para el anticuerpo monoclonal PD-L1 (e y f) obteniéndose el total de células B reguladoras en el ganglio mesentérico.

Luego se analizó el ganglio mesentérico de los grupos experimentales. Del total de células se obtuvo que el grupo WT CAC presentaba 81.7% de linfocitos (a), mientras que el grupo ATG16L1^{HM} CAC presentó un total de 67.9% (b); de los cuales el total de

células B fueron 34.7% y 23.5% respectivamente (c, d). Finalmente, del total de células B, en el grupo WT CAC hubo 4.92% de células Breg (e) y en el grupo ATG16L1^{HM} CAC un total de 6.35% (f).

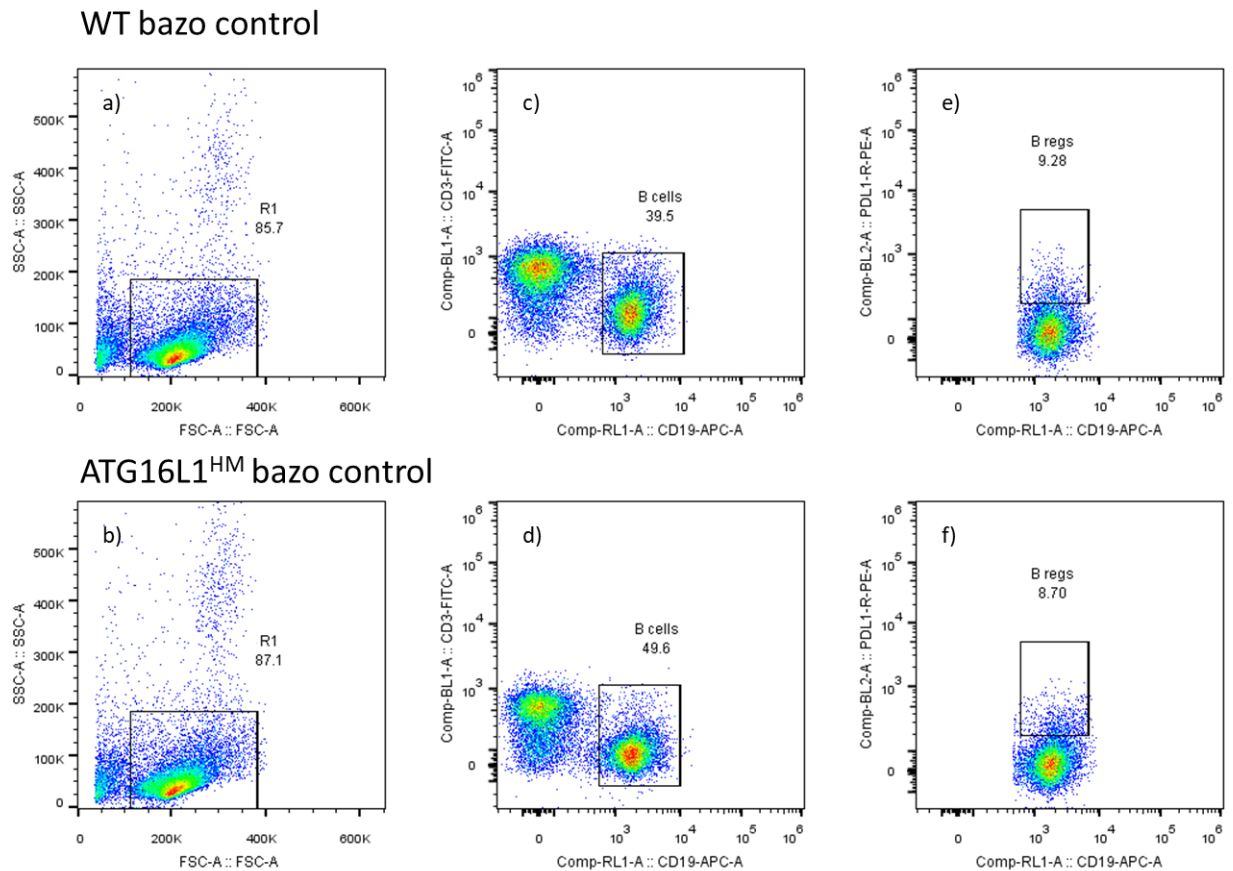


Figura 12. La deficiencia de ATG16L1 incrementa la cantidad de células B reguladoras en el bazo. Del total de células de bazo obtenidas (a y b) se analizaron con los marcadores CD19 y CD3, eligiéndose las positivas para CD19 (c y d). Posteriormente, se analizaron con el anticuerpo monoclonal PD-L1, obteniéndose el total de células B reguladoras en bazo.

Finalmente se realizó el análisis de las células en bazo. Los linfocitos obtenidos del total de células presentes en el grupo WT control fue de 85.7% (a) y del grupo ATG16L1^{HM} control fue de 87.1% (b); de los cuales el total de células B fue de 39.5% y 49.6% respectivamente (c, d). Posteriormente, se obtuvo el total de células Breg, siendo un 9.29% para los ratones WT control (e) y un 8.7% para los ratones ATG16L1^{HM}(f).

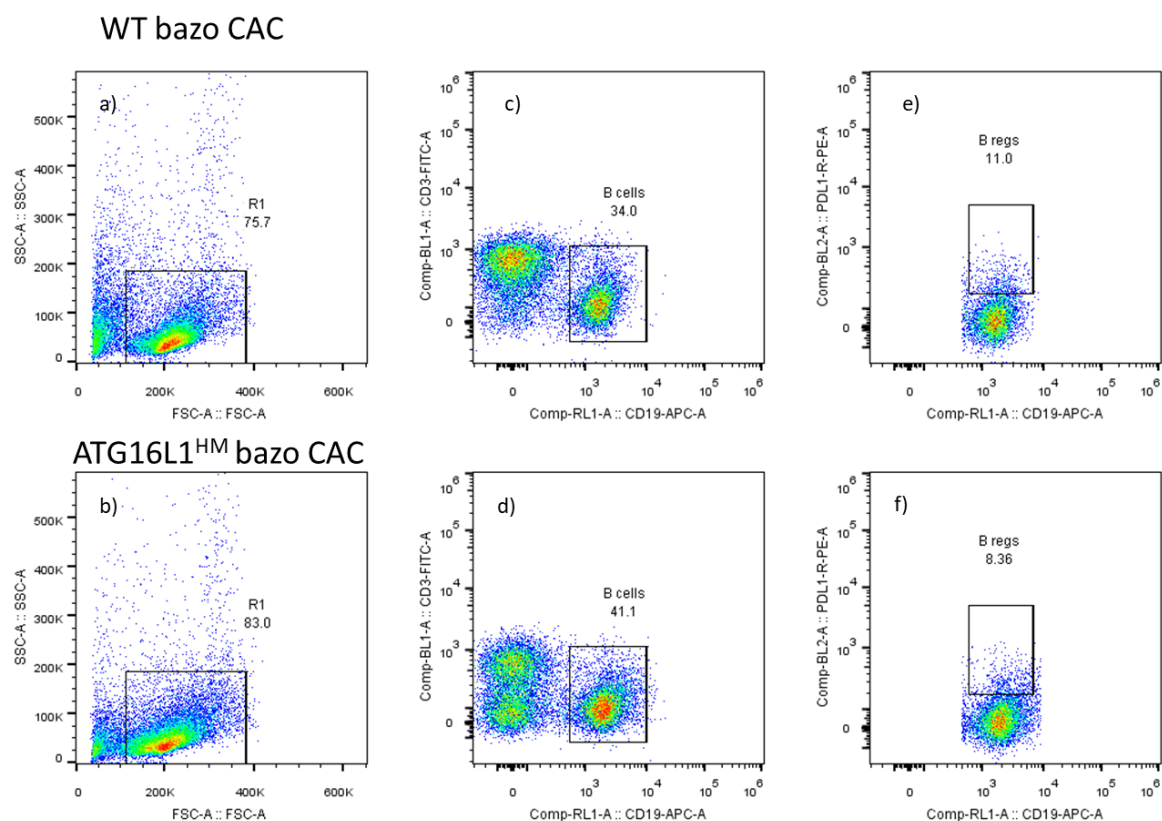


Figura 13. ATG16L1 regula la cantidad de células B reguladoras en el bazo durante el proceso de cáncer asociado a colitis. Del total de células de bazo obtenidas de los ratones experimentales (a y b) se analizaron con los marcadores CD19 y CD3, eligiéndose las células positivas para CD19 (c y d). Posteriormente, se analizaron con el anticuerpo monoclonal PD-L1 (e y f), obteniéndose el total de células B reguladoras en bazo.

Posteriormente, se realizó el análisis del bazo en los grupos experimentales. Del total de células en bazo, el total de linfocitos para el grupo WT CAC fue de 75.7% (a) y para el grupo ATG16L1^{HM} CAC fue de 83% (b); de las cuales las células B totales fueron 34% y 41.1% respectivamente (c, d). Finalmente, los ratones WT CAC obtuvieron un total de 11% (e) y para los ratones ATG16L1^{HM} fue un total de 8.36% para células Breg.

8. DISCUSIÓN

La EII puede tener diferentes manifestaciones clínicas, siendo una de ellas la pérdida de peso, además de ser un signo patológico del modelo de AOM/DSS (Snider A., *et al.*, 2016; Chen S., *et al.*, 2023). Para verificar el desarrollo del avance de la colitis a lo largo del modelo experimental se registró el peso de los ratones a través de los ciclos de administración de DSS, así como en los periodos de recuperación. En cada ciclo de DSS hubo una pérdida de peso aproximadamente de 3 a 5 días tras la exposición, acorde con el desarrollo de colitis. En el primer ciclo hubo una decaída de 1.1% en los ratones WT, mientras que en los ratones ATG16L1^{HM} el decremento fue de 5.4%, para los otros dos ciclos, el peso disminuyó un total de 7.9% contra 10.6% y 4.2% contra 13.6% para los ratones WT y ATG16L1^{HM} respectivamente (Figura 4).

Para analizar el avance de la patología generada se analizó el colon macroscópicamente. Se realizó la medición de la longitud del colon, a partir de la válvula ileocecal hasta la terminación del tracto intestinal. Se puede observar que la longitud del colon de los ratones WT tiende a ser mayor en comparación con los ratones ATG16L1^{HM}, teniendo una diferencia promedio de 0.5cm en la longitud, sin embargo, esta disminución no representa una diferencia significativa para evaluar el daño en el

tejido (Figura 5). A su vez, se puede observar la diferencia en la formación de los tumores entre ambos grupos. Los ratones ATG16L1^{HM} presentan tumores fusionados, conformando una masa tumoral, indicando un grado mayor en el avance del desarrollo de cáncer, mientras que los ratones WT presentan tumores individuales (Figura 6).

Posteriormente, para analizar el daño desarrollado en el tejido se realizó la técnica histológica en las muestras de colon de los ratones WT y ATG16L1^{HM}. Ambos grupos presentan un avance en la patología, mostrando cambios morfológicos en la composición de la mucosa. En los ratones WT, se presentan tumores a lo largo del colon, siendo regiones donde las criptas están ausentes y el tamaño de las células ha incrementado, además de presentar regiones donde la mucosa no presenta modificaciones. En cambio, los ratones ATG16L1^{HM} presentan una mucosa completamente modificada. Se pueden observar los tumores de mayor tamaño a lo largo de todo el corte, siendo continuos y sin presentar regiones en las cuales la mucosa no presente daños, además de que el tamaño de estos es mayor, presentando a su vez células de mayor tamaño que en los ratones WT, así como una mayor cantidad de infiltrado celular. La ausencia de la proteína ATG16L1 sugiere que el daño a través del tejido, así como el desarrollo de los tumores se ve agravado (Figura 7).

Durante el desarrollo de cáncer de colon, la continua exposición de las células inmunes hacia el microambiente generado por los factores derivados por tumores contribuye al avance del crecimiento canceroso en diversas maneras, como promoviendo directamente el crecimiento tumoral, la provocación de la angiogénesis, el reclutamiento y expansión de células inflamatorias adicionales y el fomento de la

metástasis (Michaud D. *et al.* 2021). A su vez, la regulación de la inflamación juega un papel de protección, pues en caso de que la respuesta persista puede causar daños a los tejidos adyacentes, lo cual puede provocar el desarrollo de patologías mediadas por la respuesta inmune (Medzhitov R., 2008; Rosser E. y Mauri C., 2015). Las células B reguladoras (Breg) han sido asociadas con la inhibición de la inflamación excesiva (Mauri C. y Bosma A., 2012). Para entender cómo se comportaba la respuesta inmune en el desarrollo de cáncer asociado a colitis se realizó la recolección y conteo total de células peritoneales, de bazo y ganglio mesentérico. Primero, se realizó el análisis de las células peritoneales, obteniendo una cantidad similar de células totales y teniendo un total de células positivas para el marcador CD19 igualmente similar, sin embargo, se puede observar que la ausencia de ATG16L1 por sí sola provoca un aumento en la maduración de las células B reguladoras, obteniendo un total de 27.95% en ratones WT y un 42.65% para los ratones ATG16L1^{HM} (Figura 8). En cuanto al desarrollo de cáncer, las células peritoneales de los ratones ATG16L1^{HM} presentaron un aumento en su conteo total siendo un 86.8%, contra un 72.4% para los ratones WT. El porcentaje de células B totales fue similar en ambos grupos, sin embargo, la ausencia de ATG16L1 en ratones que desarrollaron cáncer asociado a colitis provocó que el total de células Breg disminuyera, obteniendo un porcentaje de 29.3, a diferencia de las células Breg en los ratones WT, que presentaron un porcentaje de 36.1 (Figura 9). Posteriormente, se analizaron las células totales en el ganglio mesentérico. En el caso de los grupos control, los ratones ATG16L1^{HM} presentaron un aumento en el número de células totales (82.2%), a diferencia de los ratones WT (66.3%). En cuanto el total de células B, el porcentaje del grupo ATG16L1^{HM} fue mayor al grupo WT, siendo un total de 24.2% y un

17% respectivamente. Sin embargo, el porcentaje total de células positivas a PD-L1 es similar en ambos casos, teniendo un porcentaje de 4.54% en ratones WT y un 4.76% en ratones ATG16L1^{HM} (Figura 10). En los grupos experimentales, las células totales de los ratones WT fue mayor (81.7%) a diferencia del grupo ATG16L1^{HM} (67.9%), así como el total de células B, teniendo un 34.7% y un 23.5% respectivamente. El porcentaje de los ratones WT para células positivas a PD-L1 fue de 4.92 a diferencia de los ratones ATG16L1^{HM} que obtuvieron un total de 6.35 (Figura 11). Finalmente, se realizó el conteo de células de bazo. Los grupos control presentaron un conteo de células totales similar, resultando un porcentaje de 85.7 en ratones WT y un 87.1 en ratones ATG16L1^{HM}. El total de células B en los ratones WT fue de 39.5% y un 49.6% para el grupo ATG16L1^{HM}. En cuanto a las células positivas a PD-L1 fue de 9.28% y 8.7% respectivamente (Figura 12). Los grupos experimentales presentaron un total de 75.7% en ratones WT y 83% en ratones ATG16L1^{HM}. El total de células B en ratones WT (34%) fue menor que el de ratones ATG16L1^{HM} (41.1%). Finalmente, el porcentaje de células positivas para PD-L1 en ratones WT fue de 11, mientras que en ratones ATG16L1^{HM} fue de 8.36 (Figura 13). Estos datos sugieren que la ausencia de la proteína ATG16L1 provoca una desregulación en la respuesta inmune, provocando un aumento en la maduración de las células B en células Breg. Además, durante el desarrollo de cáncer asociado a colitis se nota un aumento en la maduración de las células Breg en el peritoneo y ganglio mesentérico en los ratones WT, mientras que los ratones ATG16L1^{HM} presentan una mayor cantidad de estas células, lo cual indica un posible papel protector durante la carcinogénesis, pues la ausencia de la proteína provoca un avance mayor de la patología y, a su vez, las células Breg, cuyo papel se ha demostrado ayuda en la

regulación de la inflamación se ven disminuidas, mientras que se ve aumentado su número dentro del bazo.

9. CONCLUSIONES

La proteína ATG16L1 es un componente esencial en la autofagia, al ser parte de las proteínas que median la formación de los autofagosomas que ayudarán a que la célula mantenga una correcta homeostasis. La deficiencia de ATG16L1 en un modelo de cáncer asociado a colitis demuestra que el desarrollo de colitis ulcerativa, así como el avance de la patología del cáncer se vean exacerbados, ayudando a proteger de daños en el tejido, así como del avance en el crecimiento de los tumores desarrollados, además de disminuir la inflamación.

La respuesta inmune se ve afectada durante el proceso del desarrollo de cáncer asociado a colitis, iniciando con la inflamación previa a la carcinogénesis, así como una vez que el ambiente se ve modificado por los tumores. Es así que, la proteína ATG16L1 sugiere tener un papel en la regulación de la maduración de las células Breg durante el desarrollo de cáncer de colon y durante la patogenia provocada por la colitis.

10. REFERENCIAS

- Aden K., Tran F., Ito G., Sheibani R., Lipinski S., Kuiper J., Tschurtschenthaler M., Saveljeva S., Bhattacharyya J., Häsler R., Bartsch K., Luzius A., Jentzsch M., Falk M., Stengel S., Welz L., Schwarzer R., Rabe B., Barchet W., Bartsch S., Hartmann G., Pasparakis M., Blumberg R., Schreiber S., Kaser A. y Rosenstiel P., 2018. ATG16L1 orchestrates interleukin-22 signaling in the intestinal epithelium via cGAS-STING. *The Journal of Experimental Medicine*, 19pp.
- Cadwell K., Liu J., Brown S., Miyoshi H., Loh J., Lennerz J., Kishi C., Wumesh K.C., Carrero J., Hunt S., Stone C., Brunt E., Xavier R., Sleckman B., Li E., Mizushima N., Stappenbeck T. y Virgin H., 2008. A unique role for autophagy and Atg16L1 in Paneth cells in murine and human intestine. *Nature*: 456(7219), 259-263.
- Chen S., Li C., Li W., Liu Q., Hu S., Zhao M., Hu D., Hao Y. y Zhang Y., 2023. How autophagy, a potential therapeutic target, regulates intestinal inflammation. *Frontiers in Immunology*, 14pp.
- Dooley H., Wilson M. y Tooze S., 2015. WIPI2B links PtdIns3P to LC3 lipidation through binding ATG16L1. *Autophagy*, 11(1), 190-191.
- Dudley L., Cabodevilla A., Makar A., Sztacho M., Michelberger T., Marsh J., Houston D., Martens S., Jiang X. y Gammoh N., 2019. Intrinsic lipid binding activity of ATG16L1 supports efficient membrane anchoring and autophagy. *The EMBO Journal*.
- de Duve C., 1963. The lysosome. *Scientific American*: 208(5), 64-73.

- Gammoh N., 2020. The multifaceted functions of ATG16L1 in autophagy and related processes. *Journal of Cell Science*: 133(20), 11p.
- Gatica D., Lahiri V. y Klionsky D., 2018. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nature Cell Biology*: 20, 233-242.
- Hamaoui D. y Subtil A., 2021. ATG16L1 functions in cell homeostasis beyond autophagy. *The FEBS Journal*.
- Harris J., Hartman M., Roche C., Zeng S., O'Shea A., Sharp F., Lambe E., Creagh E., Golenbock D., Tschopp J., Kornfeld H., Fitzgerald K. y Lavelle E., 2011. Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting pro-IL-1 β for degradation. *The Journal of Biological Chemistry*: 286(11), 9587-9597.
- Hsiao S., Yen H. y Chen Y., 2022. Chemoprevention of colitis-associated dysplasia or cancer in inflammatory bowel disease. *Gut and Liver*: 16(6), 840-848.
- IARC, 2020. GLOBOCAN. [https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/cancer#:~:text=Los%20tipos%20de%20c%C3%A1ncer%20que,hep%C3%A1tico%20\(830%20000%20defunciones\)%3B](https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/cancer#:~:text=Los%20tipos%20de%20c%C3%A1ncer%20que,hep%C3%A1tico%20(830%20000%20defunciones)%3B)
- Itakura E. and Mizushima N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* 6(6), 764–776.
- Juris L., Montino M., Rube P., Schlotterhose P., Thumm M. y Krick R., 2015. PI3P binding by Atg21 organises ATG8 lipidation., *The EMBO Journal*, 34(7), 995-973.
- Kocaturk N., Akkoc Y., Kig C., Bayraktar O. y Gozuacik D., 2019. Autophagy as a molecular target for cancer treatment. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*: 134, 116-137.

- Koyama-Honda I., Itakura E., Fujiwara T. y Mizushima N., 2013. Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy*, 9(10), 1491-1499.
- Labianca R., Beretta G., Kildani B., Milesi L., Merlin F., Mosconi S., Pessi A., Prochilo T., Quadri A., Gatta G., Braud F. y Wils J., 2010. Colon cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*: 74, 106-133.
- Lamb C., Yoshimori T. y Tooze S., 2013. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*: 14(12), 759-774.
- Li X., He S. y Ma B., 2020. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular cancer*: 19(1), 16pp.
- Matsuzawa Y., Shono Y., Gomez L., Hubbard V., Cammer M., Neil J., Dewan M., Lieberman S., Lazrak A., Marinis J., Beal A., Harris P., Bertin J., Liu C., Ding Y., van den Brink M. y Cadwell K., 2017. Autophagy protein ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium. *The Journal of Experimental Medicine*: 214(12), 3687-3705.
- Mauri C. y Bosma A., 2012. Immune regulatory function of B cells. *Annual Review of Immunology*: 30(1), 221-241.
- Medzhitov R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*: 454(7203), 428-435.
- Michaud D., Steward C., Mirlekar B. y Pylayeva Y., 2021. Regulatory B cells in cancer. *Immunological Reviews*: 299(1), 74-92.
- Mizushima N., Kuma A., Kobayashi Y., Yamamoto A., Matsubae M., Takao T., Natsume T., Ohsumi Y. y Yoshimori T., 2003. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat

- protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of Cell Science*: 116(9), 1679-1688.
- Mizushima N. y Levine B., 2020. Autophagy in human diseases. *The New England Journal of Medicine*. 383(16), 1564-1576.
 - Nishimura T., Kaizuka T., Cadwell K., Sahani M., Saitoh T., Akira S., Virgin H. y Mizushima N., 2013. FIP200 regulates targeting of Atg16L1 to the isolation membrane. *EMBO Reports*, 14(3), 284-291.
 - Rodgers M., Bowman J., Liang Q. y Jung J., 2014. Regulation where autophagy intersects the inflammasome. *Antioxidants and Redox Signaling*: 20(3), 35p.
 - Rosser E. y Mauri C., 2015. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*, 42(4), 607-612.
 - Saitoh T., Fujita N., Jang M., Uematsu S., Yang B., Satoh T., Omori H., Noda T., Yamamoto N., Komatsu M., Tanaka K., Kawai T., Tsujimura T., Takeuchi O., Yoshimori T. y Akira S., 2008. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature*: 456(7219), 264-268.
 - Snider A., Bialkowska A., Ghaleb A., Yang V., Obeid L. y Hannun Y., 2016. Murine model for colitis-associated cancer of the colon. *Mouse models for drug discovery*, 245-254.
 - Tsukada M. y Ohsumi Y., 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*: 333(1-2), 169-174.
 - Yao D., Dong M., Dai C. y Wu S., 2019. Inflammation and inflammatory cytokine contribute to the initiation and development of ulcerative colitis and its associated cancer. *Inflammatory Bowel Diseases*: 20(20), 8p.

- WCRF y AICR, 2007. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Washington, DC: AICR.
- Zhong Z., Sanchez-Lopez E. y Karin M., 2016. Autophagy, inflammation and immunity: a Troika Governing cancer and it's treatment. Cell: 166(2), 288-298.