



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DURANTE EL
DESARROLLO DE CANCER DE COLON ASOCIADO A
COLITIS EN AUSENCIA DEL GEN STAT6.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

Presenta:

Yael Gabriela Delgado Ramírez

Director de Tesis:

Dra. Sonia Andrea León Cabrera



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

No temáis a la grandeza; algunos nacen grandes, algunos logran grandeza, a algunos la grandeza les es impuesta y a otros la grandeza les queda grande.

-William Shakespeare

En los momentos de crisis, solo la imaginación es más importante que el conocimiento.

-Albert Einstein

Solo cree en el futuro incluso si es solo un castillo de arena.

-TCR CLAMP

En los momentos de crisis, solo la imaginación es más importante que el conocimiento.

Este proyecto de llevo a cabo en el laboratorio de 8 de Inmunoparasitología de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de la Fes Iztacala, UNAM.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi *alma mater* la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por permitirme crecer profesional y académicamente como bióloga, haber sido mi segundo hogar y permitirme cumplir un sueño más dentro de sus puertas.

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdez por darme la oportunidad de cumplir esta meta en su equipo de trabajo, por su apoyo y confianza.

A mi directora de Tesis la Dra. Sonia Andrea León Cabrera por su apoyo, ayuda y paciencia que demostró durante toda esta etapa, sin ella y su guía no hubiera podido completar con éxito este trabajo.

A la M. en C. Yadira por cuidar siempre de nosotros y del laboratorio como la mamá de todos, de verdad Yadi muchas gracias.

A mis compañeros del laboratorio Sandy, Mireya, Armando, Itzel, Ángel, Memo, Emmanuel, Dulce por escuchar mis quejas, soportar mi estrés constante y ser una maravillosa y muy agradable compañía.

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

Dedicatoria

A mi padre Gabriel, porque a su manera supo apoyarme y ayudarme en cada momento, muchas gracias papá por ser parte de mi vida, tu y yo recorrimos juntos este camino lleno de sacrificios hasta este punto, este trabajo es tanto tuyo como lo es mío, por fin puedo decir que he cumplido lo que hace muchos años te prometí, te quiero mucho y estaré toda la vida agradecida por todo tu apoyo.

A mi madre Marisela, porque cada día de su vida se ha dedicado a cuidarme y protegerme con amor sin importar la distancia, por ella soy lo que soy, muchas gracias mamá por estar conmigo, sé que tú eres la única persona que puede estar más feliz que yo por esto, te quiero y nunca olvides que este logro también es tuyo.

A mi novio perfecto Aldo Fuentes, porque con amor y cariño me apoyo en cada momento, ha estado presente siempre que lo he necesitado, ha sido la persona que mejor me ha entendido y comprendido y aun así me ama, sin él y su compañía jamás habría podido soportar todo este viaje, gracias por hacerme feliz y no dejarme caer en esos momentos tristes. Te amo más que demasiado.

A mis queridas amigas. Juntas partimos desde el mismo punto y recorrimos el mismo camino, gracias por todos y cada uno de los buenos y malos momentos que compartimos, las quiero y espero que aunque nuestros caminos se separen jamás olvidemos de dónde venimos y con quien lo vivimos, gracias Lu, Rebe, Keyla, y aunque su camino se separó un poco más pronto de lo esperado a Tania.

Y por último y no menos importantes a todos mis amigos que tuve la fortuna de conocer en el transcurso de este viaje Fany, Toño, los dos Betos y Vicky, gracias por hacer de esta experiencia aún mejor y más divertida.

Índice

1. Resumen	9
2. Introducción.....	10
3. Antecedentes	12
3.1. <i>Cáncer colorrectal.....</i>	12
3.2. <i>Enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal.....</i>	13
3.3. <i>Patogénesis y formas de CAC</i>	16
3.4. <i>Respuesta inmune durante el cáncer de colon asociado a colitis (CAC) ...</i>	18
3.5. <i>Janus quinasa (JAK) /Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción (STATs).....</i>	20
3.6. <i>IL-4 e IL-13</i>	22
3.7. <i>STAT6.....</i>	23
3.8. <i>Modelo experimental de Cáncer colorrectal</i>	26
4. Hipótesis	28
5. Objetivos	28
5.1. <i>General.....</i>	28
5.2. <i>Particulares.....</i>	28
7. Materiales y Métodos	29
7.1. <i>Material Biológico.....</i>	29
7.2. <i>Inducción del CAC</i>	29
7.3. <i>Valoración de colitis y progresión tumoral</i>	30
7.4. <i>Sacrificio</i>	30
7.5. <i>Análisis macroscópico.....</i>	31
7.6. <i>Técnica histológica.....</i>	32
7.7. <i>Inmunohistoquímica.....</i>	34
7.8. <i>Genotipo</i>	36
7.9. <i>Extracción de RNA.....</i>	36
7.10. <i>Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....</i>	37
7.11. <i>Ensayo de apoptosis por TUNEL</i>	39
7.12. <i>Análisis Estadístico</i>	40
8. Resultados	41
8.1. <i>Genotipo de animales STAT6</i>	41

8.2. Síntomas de la enfermedad y Análisis de cambios del peso corporal en animales BALB/c (WT) y STAT6 (Knock-out) durante tratamiento con AOM/DSS.....	42
8.3. Análisis del índice de daño de la enfermedad (IAE)	44
8.4. Análisis de desarrollo tumoral	45
8.5. Análisis de cambios morfométricos en el intestino	46
8.6. Análisis del número y tamaño de tumores en modelos WT y STAT6-/-.....	48
8.7. Análisis histopatológico de colon (H&E).....	49
8.8. Análisis morfo-histológico de células caliciformes en colon.....	50
8.9. Análisis en la expresión de marcadores Cox-2, β -Catenina por inmunohistoquímica.....	53
8.10. Análisis en los cambios y la expresión de citocinas.....	58
8.11. Apoptosis	60
9. Discusión	62
10. Conclusiones	71
11. Literatura citada.....	72

Índice de Figuras

Figura 1 Incidencia y mortalidad de cáncer colorrectal en América Latina.....	12
Figura 2. Secuencia de inflamación-displasia-carcinoma durante el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis.....	14
Figura 3 Marcas distintivas del cáncer	16
Figura 4. Vía de señalización JAK/STAT.....	21
Figura 5. La vía STAT6 se asocia con IL-4 e IL-13.	25
Figura 6. Esquema de administración de AOM/DSS en ratones BALB/c y STAT6-/-	29
Figura 7. La puntuación clínica de un índice de actividad de la enfermedad (IAE)	30
Figura 8. Representación del colon de un ratón	31
Figura 9. Electroforesis de muestra de genotipo para animales STAT6 (-/-).....	41
Figura 10. Cambios anatómicos-morfométricos y de ganancia de peso asociados al desarrollo del CAC durante la administración de AOM/DSS.....	43
Figura 11. Índice de daño a la enfermedad (IAE)	44
Figura 12. Porcentaje de ratones libres de tumor	45
Figura 13. Colon de ratones de los grupos BALB/c AOM y STAT6-/- AOM al día 68 del tratamiento de AOM/DSS.	46
Figura 14. Peso del intestino, en los grupos control y el grupo con tratamiento, al día 68 de la inducción de DSS/AOM.....	47
Figura 15. Análisis del número y tamaño de tumores en modelos BALB/c y STAT6-/- ...	48
Figura 16 Cortes histológicos del colon con tinción H&E.....	51
Figura 17. Tinción de Alcian Blue	52
Figura 18. Inmunohistoquímica donde se muestra la expresión de COX-2.....	55
Figura 19. Inmunohistoquímica donde se muestra la expresión de Ki67.....	56

Figura 20. Inmunohistoquímica donde se muestra la expresión de β -Catenina.....	57
Figura 21. Cambios en la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF, IFN, IL-17) y antiinflamatorias (IL-6, IL-10).....	59
Figura 22. Ensayo de apoptosis.....	61

Índice de Tablas

Tabla 1. Efectos de algunas citocinas en el CAC.....	19
Tabla 2. Secuencias específicas de cada primer usadas en el análisis de PCR.	37
Tabla 3. Mezcla de reacción de PCR en punto final, para 20 μ l por reacción	38
Tabla 4. Instrucciones de ciclos para PCR.....	38

1. Resumen

El cáncer de colon y recto es la cuarta causa de muerte por cáncer en el mundo. Más del 20% de los pacientes con alguna enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) como la colitis, desarrollan cáncer de colon asociado a colitis (CAC); resultado de un infiltrado celular inflamatorio que incluye moléculas promotoras de tumores. El transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT6) participa en la respuesta celular a citocinas (IL-4 e IL-13). Se ha demostrado que las citocinas IL-4, IL-13 y el receptor IL-4R α pueden estar involucrados en la iniciación y desarrollo del cáncer. Por lo tanto, en este estudio se evaluó el papel de STAT6 en el desarrollo de CAC, mediante un modelo experimental empleando azoximetano (AOM) y dextrán sulfato de sodio (DSS) como inductores del desarrollo de cáncer, en ratones BALB/c y STAT6 $-/-$. El AOM se administró a 12.5 mg/Kg intraperitoneal en dosis única, 5 días después se suministró DSS al 2% en el agua para beber por 7 días, seguido de 15 días con agua normal. Este ciclo se repitió 3 veces. Los animales se sacrificaron a los días 20, 40 y 68 del tratamiento. Los resultados mostraron que los ratones STAT6 $-/-$ -AOM no presentaron signos asociados a la enfermedad, el 70% no desarrollaron tumores al día 68, no presentaron cambios a nivel histológico ni en el número de células caliciformes y tuvieron una menor expresión de Cox-2 y β -Catenina. Tampoco presentaron cambios significativos en la expresión de las citocinas proinflamatorias como TNF- α , IFN- γ e IL-17 α pero sí un aumento de IL-10 e IL-6 al día 68. El análisis de la apoptosis en el colon, indicó un aumento en la actividad apoptótica en este grupo al inicio del tratamiento (día 20), pero sin diferencias en la expresión de Ki67. Estos resultados sugieren que STAT6 puede estar involucrado en promover el desarrollo del CAC, ya que en su ausencia se previene el crecimiento tumoral que fue asociado a una menor expresión de citocinas proinflamatorias y marcadores relacionados con el progreso tumoral como β -Catenina y Cox-2, además de un aumento en la apoptosis a nivel del colon.

2. Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) ocupa el cuarto lugar en mortalidad por neoplasias malignas a nivel mundial, resultando una de las complicaciones más graves posterior a trastornos de inflamación a nivel intestinal, especialmente la colitis ulcerosa (UC) (Eaden, Abrams et al. 2001). Diversos estudios demuestran que más del 20% de los pacientes con alguna enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) desarrollan cáncer de colon asociado a colitis (CAC) de un periodo de 30 años a partir del inicio de la enfermedad inflamatoria (Rutter, Saunders et al. 2006).

Durante una etapa inicial, la colitis se presenta como resultado de un infiltrado celular inflamatorio que incluye macrófagos y neutrófilos, acompañado de un flujo de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, así como de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, capaces de incrementar el daño genético por mutación e inestabilidad cromosómica (Coussens and Werb 2002). Por lo tanto, actualmente se considera a los procesos inflamatorios repetitivos o sostenidos como uno de los factores que aumentan la probabilidad de que células epiteliales se hagan displásicas y eventualmente desarrollen una transformación cancerosa maligna como adenocarcinomas invasores, donde diversas vías de señalización tienen lugar.

El transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT6) participa en la respuesta celular frente a citocinas y factores de crecimiento presentes en el microambiente. Además STAT6 resulta el encargado de señalizar la unión de las citocinas IL-4 e IL-13 a su receptor y mediar activación de la respuesta inmune tipo Th2. Se ha reportado que STAT6 es capaz de regular la transcripción de múltiples genes, entre ellos los relacionados con crecimiento celular, proliferación y apoptosis (Becker, Fantini et al. 2004). Existen reportes donde el análisis de líneas celulares de cáncer de colon, con fenotipo STAT6^{high} (HT-29) y STAT6^{null} (Caco-2) demuestran que células con fenotipo de menor activación para STAT6, desarrollan la sobre-expresión de citocinas tipo Th1 y Th17, disminución del ciclo celular así como un elevado índice de células apoptóticas tempranas, a diferencia de células con fenotipo activo “high” STAT6, que mostraban sobre-expresión de citocinas de perfil Th2, aumento en la expresión y activación de genes anti-apoptóticos y pro-metastásicos. Por lo que, proponen que la susceptibilidad a la apoptosis en estas células está relacionada con la

actividad de STAT6, y que esta propiedad debe ser reproducible en diferentes tipos de células, siempre y cuando estas lleven un fenotipo STAT6^{null} (Li, Yang et al. 2008).

La sobre activación de STAT6 está asociada a varios tipos de cáncer como el de próstata (Ni Z, Lou W et al. 2002), el linfoma cutáneo de células y el linfoma de Hodgkin (Skinnider BF, Elia AJ et al. 2002). Mediante un modelo experimental de trasplantes de carcinomas mamarios altamente malignos y metastásicos en ratones BALB/c, se demostró que el crecimiento de carcinomas disminuye en ausencia de STAT6, sugiriendo que este factor puede estar involucrado en el control del crecimiento tumoral (Ostrand-Rosenberg S, Grusby MJ et al. 2000).

Diversos estudios empleando animales deficientes para citocina IL-4 o su receptor IL-4R α durante el desarrollo del cáncer de colon experimental, no han sido concluyentes, ya que algunos señalan disminución en el número de tumores (Hull et al. 2006), mientras otros no reportan cambios en cuanto al crecimiento del tumor (Fingleton et al. 2012). Por lo que, para nuestro grupo de investigación resulta necesario determinar si la señalización mediada por STAT6, se encuentra involucrada en el desarrollo tumoral del cáncer de colon.

En el presente trabajo, se evaluó el papel de STAT6 durante el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis en un modelo experimental in vivo. Para ello se utilizaron ratones BALB/c y ratones deficientes para STAT6 utilizando un modelo experimental de azoximetano (AOM) como generador de mutaciones y dextran sulfato de sodio (DSS) como mecanismo de daño local en colon, puesto que tiene la capacidad para afectar la arquitectura de la pared intestinal causando lesiones y sangrado rectal. Esto con el objeto de determinar si STAT6 desempeña un papel determinante en el desarrollo de cáncer asociado a inflamación crónica como probablemente ocurre en el cáncer colon asociado a colitis (CAC).

3. Antecedentes

3.1. Cáncer colorrectal

El cáncer de colon y recto ocupa el tercer lugar como neoplasia maligna más frecuente y el cuarto lugar de mortalidad por cáncer en todo el mundo (Tenesa and Dunlop 2009). Más de 1 millón de nuevos casos de cáncer colorrectal (CCR) se diagnostican en el mundo cada año. Datos recientes en América Latina, reportado por Globocan (2012) describen que el CCR se encuentra entre las causas más comunes de muerte por cáncer en ambos sexos (**Figura 1**). Dado que solo el 15% de los casos de CCR se asocian con historial familiar, queda abierta la duda acerca de la participación de los factores ambientales que contribuyen al desarrollo de la enfermedad, así como los mecanismos involucrados (Rustgi 2007).

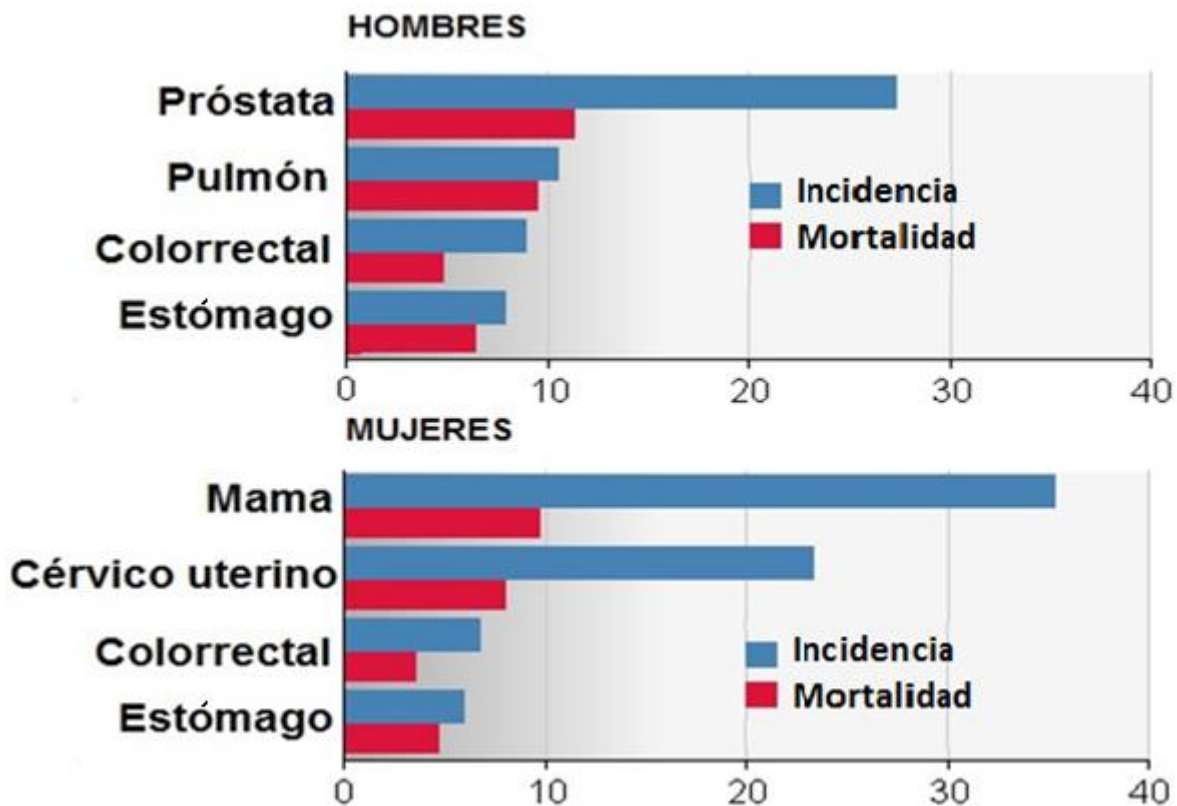


Figura 1 Incidencia y mortalidad de cáncer colorrectal en América Latina. La imagen muestra datos que representan la tasa por cada 100,000 habitantes (Globocan, 2012).

3.2. Enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal

Una complicación importante para los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) que incluyen la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerativa (UC), es el riesgo de desarrollar cáncer de colon asociado a colitis (CAC).

Por ejemplo, se ha demostrado que los pacientes con colitis ulcerativa elevan 2% el riesgo a desarrollar CAC en los próximos 10 años posterior al diagnóstico por UC; 8% a 20 años y 18% a 30 años (Eaden, Abrams et al. 2001). Adicionalmente, en América Latina reportes que han examinado cerca de 600 pacientes pertenecientes al programa de vigilancia endoscópica durante un período de 30 años encontraron que 10.8% de los pacientes con UC desarrollaron neoplasias durante los próximos 30 años de seguimiento y desarrollo de la enfermedad (Rutter, Saunders et al. 2006).

Asimismo, la aparición de tumores en pacientes con IBD se incrementa cuando la colitis se diagnostica en edades tempranas y está acompañada por la duración prolongada de la enfermedad (Soetikno, Lin et al. 2002). Aunque el cáncer colorrectal en ausencia de poliposis hereditaria y poliposis adenomatosa familiar se ha asociado con un riesgo importante a desarrollar CCR, se conoce que la inflamación es una condición muy importante para el desarrollo de este padecimiento. Más del 20% de los pacientes con alguna IBD desarrollan cáncer de colon asociado a colitis (CAC) dentro de los primeros 30 años desde el inicio de la enfermedad. Se estima que 50% de estos pacientes morirán por CAC en alguna de sus etapas (Lakatos and Peter-Laszlo 2008). Al respecto se ha sugerido que no solo la predisposición genética, promueve el desarrollo del CAC, sino, que está precedido por un ambiente inflamatorio agudo y crónico el cual provoca desbalance en la mucosa intestinal y posiblemente contribuyendo a trastornos en el microbioma, así como deficiencias en los mecanismos de regeneración y reparación epitelial. También, es probable que el estrés oxidativo que afecta directamente a la célula epitelial favorezca mutaciones en genes supresores de tumores, promoviendo la formación de adenocarcinomas (Hyun, Han et al. 2012).

Diversos autores sugieren que el CAC se desarrolla a través de un proceso complejo multifactorial el cual se evidencia por la secuencia de eventos “Inflamación-displasia-carcinoma” (**Figura 2**). A este respecto Vogelstein et al. (1992) fueron los investigadores

pioneros en describir una serie de eventos moleculares que definen las etapas de iniciación, promoción y progresión neoplásica, que se resumen de la siguiente manera: Primero convierten la mucosa normal en epitelio hiperplásico, posteriormente en pólipos adenomatosos con células displásicas, alcanzando un estado de carcinoma in situ, para su posterior transformación maligna con capacidad de invasión a la membrana basal y metástasis (Cho KR and B. 1992; Kinzler and Vogelstein 1996; Vogelstein and Kinzler 2004). Esto se conoce como la secuencia adenoma-carcinoma (hipótesis Vogelstein) que comenzó con la detección de mutaciones en el gen APC (poliposis adenomatosa coli) que promueven el desarrollo de tumores de colon (Powell, Zilz et al. 1992). Este gen se ha encontrado alterado en las células de la línea germinal de pacientes con tumores de colon, por una enfermedad llamada poliposis adenomatosa familiar (FAP).

No obstante, se conocen alteraciones en el oncogen K-ras (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), pérdida en la función del retinoblastoma (rb1), del gen TP53, y la supresión del gen DCC. En el cáncer esporádico, la disposición genética y alteraciones adquiridos durante el envejecimiento son factores clave que promueven la carcinogénesis. En el desarrollo del cáncer asociado a colitis es la inflamación la que promueve el desarrollo de tumores (Foersch and Neurath 2014).

El desarrollo de la colitis, inicia cuando el colon normal es afectado por una inflamación causada por la llegada de infiltrados celulares inmunes, que dan como resultado colitis a través de secreción de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), que incrementan las posibilidades de desarrollar mutaciones a nivel genético (Coussens and Werb 2002).

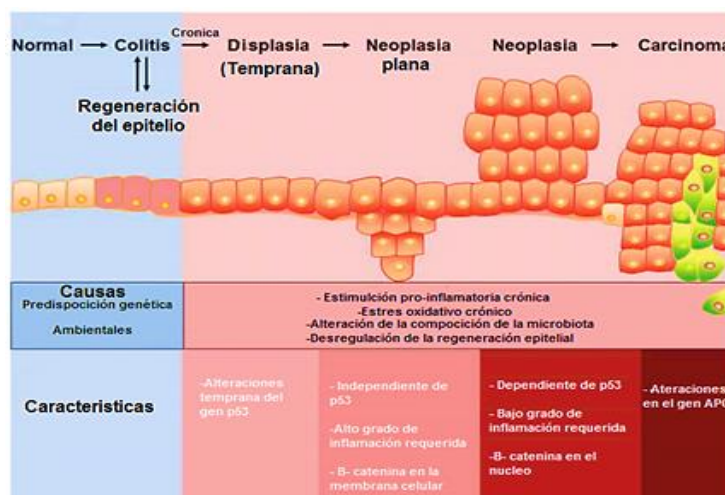


Figura 2. Secuencia de inflamación-displasia-carcinoma durante el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis.

Si bien los datos no sugieren que UC y CD sean los únicos componentes involucrados en el inicio del cáncer, sí se ha reportado que la respuesta inflamatoria crónica puede preceder al inicio del tumor, por lo que el CAC se relaciona directamente con la gravedad y duración de la enfermedad activa (Mantovani, Allavena et al. 2008).

3.3. Patogénesis y formas de CAC

Hanahan y Weinberg (2011) han realizado una aportación relevante respecto de una clasificación que sintetiza el desarrollo de las marcas del cáncer, en este sentido ambos autores describen la participación de los diversos factores y mecanismos implicados en la iniciación y progresión de un tumor, así mismo discuten las características que adquieren las células tumorales mismas que les permiten adquirir un fenotipo funcional de malignidad tumorigénica. A este respecto los autores no se refieren al tumor como una masa celular cancerosa proliferante, sino como una masa tisular de alta complejidad en su composición de diversos tipos celulares de alta especialización en continua comunicación con el microambiente del estroma circundante del tumor (Hanahan and Weinberg 2011).

Bajo este contexto teórico es importante destacar que una de las características que distinguen el surgimiento y evolución de un tumor, es el estado inflamatorio; el cual se manifiesta de manera evidente en las primeras etapas de la progresión neoplásica en el colon y desarrollo de neoplasias como el CAC (**Figura 3**; (Qian and Pollard 2010).

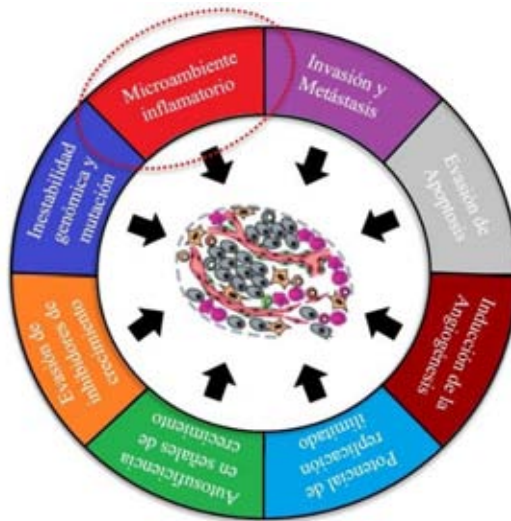


Figura 3 Marcas distintivas del cáncer; el microambiente inflamatorio se considera una característica indispensable en el desarrollo de las células cancerosas.

Dentro del modelo de Hanahan y Weinberg (2011), la inflamación contribuye al microambiente del tumor mediante el suministro de moléculas bioactivas incluyendo factores de crecimiento, factores de supervivencia, factores proangiogénicos, entre otros; los cuales facilitan la invasión, proliferación y metástasis de células neoplásicas. Las células inflamatorias en el colon también son capaces de liberar sustancias químicas, como

especies reactivas de oxígeno (ROS) los cuales constituyen biomutagénicos activos para el cambio de células cancerosas, promoviendo cambios genéticos hacia estados de malignidad mayor (Grivennikov, Greten et al. 2010). Se sabe que en la curación de una herida causada a nivel de intestino grueso o colon, normalmente se genera una lucha del sistema inmune contra las infecciones causadas por la microflora intestinal que pueden penetrar por este tipo de lesiones. Estos eventos se consideran normales puesto que permanecen constantes, ya que están presentes de forma transitoria. No obstante, en la colitis crónica o inflamación crónica existe una permanencia duradera de esta lucha que genera cambios e irregularidades morfológicas constantes en el tejido, lo que también puede producir un daño a nivel genético y promover así la tumorigénesis intestinal.

En los últimos años, debido al mejoramiento del reconocimiento de las poblaciones celulares, se sabe que en esas alteraciones constantes en el colon, participan distintos tipos de células inmunes y que las lesiones neoplásicas concentran una gran actividad de éstas (DeNardo, Andreu et al. 2010). De este modo, se ha demostrado que la presencia de un estado inflamatorio activa el reclutamiento de células, entre las cuales destacan células promotoras de tumor como: macrófagos, mastocitos, neutrófilos, linfocitos T y B, así como factores de crecimiento tumoral y pro-angiogénicos, (factores de crecimiento epidérmico [EGF] y factor de crecimiento endotelial vascular [VEGF] respectivamente) quimiocinas y diversas citocinas (Coffelt, Lewis et al. 2010).

3.4. Respuesta inmune durante el cáncer de colon asociado a colitis (CAC)

La respuesta inmune conlleva a procesos inflamatorios crónicos durante los cuales se produce el reclutamiento de macrófagos, mastocitos, neutrófilos, linfocitos T y B, mediadores solubles inflamatorios (ROS, RNS), EGF, VEGF, quimiocinas y citocinas que amplifican el estado inflamatorio (Lu Y, Zhou J et al. 2008).

Se ha demostrado que las citocinas proinflamatorias como $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ o $IL-6$, promueven el desarrollo de tumores en el colon y recto (Peng, LI et al. 2013), mientras que las citocinas anti-inflamatorias, entre otros como $IL-10$ y/o $TGF-\beta$ favorecen la disminución de este tipo de tumores Ver Tabla 1 (Becker, Fantini et al. 2004).

Por ejemplo $TNF\alpha$ se produce durante la respuesta inflamatoria inicial favoreciendo la producción de otras citocinas y quimiocinas, que pueden aumentar la permeabilidad vascular que conduce al reclutamiento de leucocitos activados en el sitio de la infección o lesión (Kruglov, Kuchmiy et al. 2008). Estas propiedades hacen de $TNF\alpha$ un promotor de la inflamación, angiogénesis y propagación del tumor; por lo que, debe considerarse como un factor de promoción tumoral.

Por otro lado, $TGF-\beta$ es una citocina con un papel paradójico en el desarrollo del cáncer. Se ha mostrado que tiene efectos antitumorales mediante la inhibición de la proliferación, la estimulación de la apoptosis, y por la supresión de la expresión de citocinas protumorigénicas. Sin embargo, mutaciones en la vía de $TGF-\beta$ en células epiteliales, predispone al desarrollo de tumores del colon y su crecimiento (Yuan, Li et al. 2009).

Una mayoría de citocinas que promueven el desarrollo de tumores son generadas por macrófagos de la lámina propia durante los estados tempranos de desarrollo del CAC, o bien por las células T durante la progresión del tumor en etapas tardías. En ratones APC^{\min} que desarrollan tumores colorrectales, $IL-6$ estimula la proliferación de enterocitos pre-malignos de manera similar a lo observado en modelos experimentales de CAC (Fenton, Hursting et al. 2006).

Por lo tanto, se conoce que la $IL-6$ posee un papel de protección en la mucosa gastrointestinal y tejido de regeneración después de una lesión, aunque también se ha demostrado que es un potente estimulador de la proliferación de células cancerosas y del

crecimiento tumoral. La IL-6 es el ligando importante para la vía de activación STAT3 que protege al epitelio intestinal y estimula su regeneración e inducción de genes antiapoptóticos, proliferativos y de crecimiento endotelial vascular (Grivennikov, Karin et al. 2009).

Citocinas	Productores importantes	Principales efectos en CAC
TNF-α	Monocitos y macrófagos, células B y T, fibroblastos, etc.	<ul style="list-style-type: none"> • Está involucrada en la regulación de casi todas las fases de respuestas inmunes e inflamatorias. • Su producción es esencial para la producción de Th1. • Potencia los efectos antivirales y anti-tumorales de IFNα/β. • Activación de NF-$\kappa\beta$.
IFN-γ	Células T (Th1 y CD8), NKT, células mieloides, células dendríticas y neutrófilos.	<ul style="list-style-type: none"> • Es un mediador de la inflamación y funciones inmunes. • Mejora la inmuno-supervivencia del tumor a células T citotóxicas. • Regula el crecimiento y diferenciación de varios tipos celulares. • Lidera necrosis e induce sarcomas.
IL-17	Células Th17.	<ul style="list-style-type: none"> • Inflamación crónica exacerbada y producción de citocinas proinflamatorias.
IL-6	Células B y T, macrófagos, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales.	<ul style="list-style-type: none"> • Iniciación del tumor, promueve la proliferación y supervivencia a través de la activación de STAT3. • Regula funciones de células B y T. • Regula reacciones de fases agudas.
IL-10	Células T y B, monocitos, macrófagos y células Tregs.	<ul style="list-style-type: none"> • Induce la activación de β-Catenina por PI3K-Akt. • Suprime la activación de NF-$\kappa\beta$ y la producción de citocinas proinflamatorias. • Citocina secretada por Th0 y Th2. • Bloquea la síntesis de Th1. • Cooperación con TGF-β para estimular la producción de Inmunoglobulinas A (IgA) por células B.

Tabla 1. Efectos de algunas citocinas en el CAC.

3.5. Janus quinasa (JAK) /Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción (STATs)

Las proteínas JAK/STATs son vías de señalización implicadas en la respuesta inmune, el crecimiento y la diferenciación celular (Lu Y, Zhou J et al. 2008). Éstas, se activan por medio de citocinas, las proteínas JAKs que sirven como sitios de “ataque” para otras moléculas de señalización, mientras que las STATs activadas se translocan desde el citoplasma al núcleo, donde aumentan la tasa de transcripción de genes blanco (Xiong H, Zhang ZG et al. 2008).

Por ejemplo, las vías de señalización STAT1 y STAT2 se identificaron por primera vez, mediante estudios de activación de la respuesta inmune (Shea-Donohue, Fasano et al. 2010). Posteriormente se identificaron cinco STATs adicionales: STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6 (Slattery, Lundgreen et al. 2013).

Las citocinas por otro lado, participan en una vía que puede retroalimentarse indefinidamente hasta la participación de sus reguladores que son llamados “supresores de la señalización de citocinas” (SOCS), los cuales, tienen la función de inhibir la actividad de JAK y STAT (Xiong H, Zhang ZG et al. 2008). Varios estudios han señalado la presencia de los componentes de la vía de señalización JAK/STAT/SOCS en adenomas y cáncer colorrectal.

La cascada de señalización canónica de la vía JAK/STAT se inicia por el acoplamiento de ligandos “citocinas” a sus receptores. Esto conduce a la activación de moléculas JAKs, asociados a colas citoplasmáticas de los receptores. Una vez activadas, las moléculas JAKs fosforilan ciertos residuos de tirosina en las cadenas del receptor, lo cual modifica sitios de unión para monómeros STAT, que después de unirse a fosfotirosinas del receptor, se convierten en STATs fosforilados, permitiéndoles formar dímeros. Posteriormente los dímeros STAT activos, poseen la capacidad de translocarse rápidamente al núcleo, donde activan o reprimen la expresión de genes blanco específicos (**Figura 4**).

La investigación en el campo de JAK/STAT ha aclarado sus participación en diversos procesos celulares, tales como la proliferación, apoptosis y migración celular, así mismo se han descrito aberraciones frecuentes de la vía JAK / STAT en diversos tipos de cáncer (Dutta and Li 2001).

Al respecto Slattery et al. (2013) describieron la vía de señalización JAK/STAT/SOCS asociada al riesgo a desarrollar cáncer de colon. Durante su estudio analizaron una base de datos de pacientes con diagnóstico confirmado de cáncer colorrectal, y demostraron su importancia en la regulación de la inflamación, así como su relación con la supervivencia posterior al diagnóstico oncológico (Slattery, Lundgreen et al. 2013).

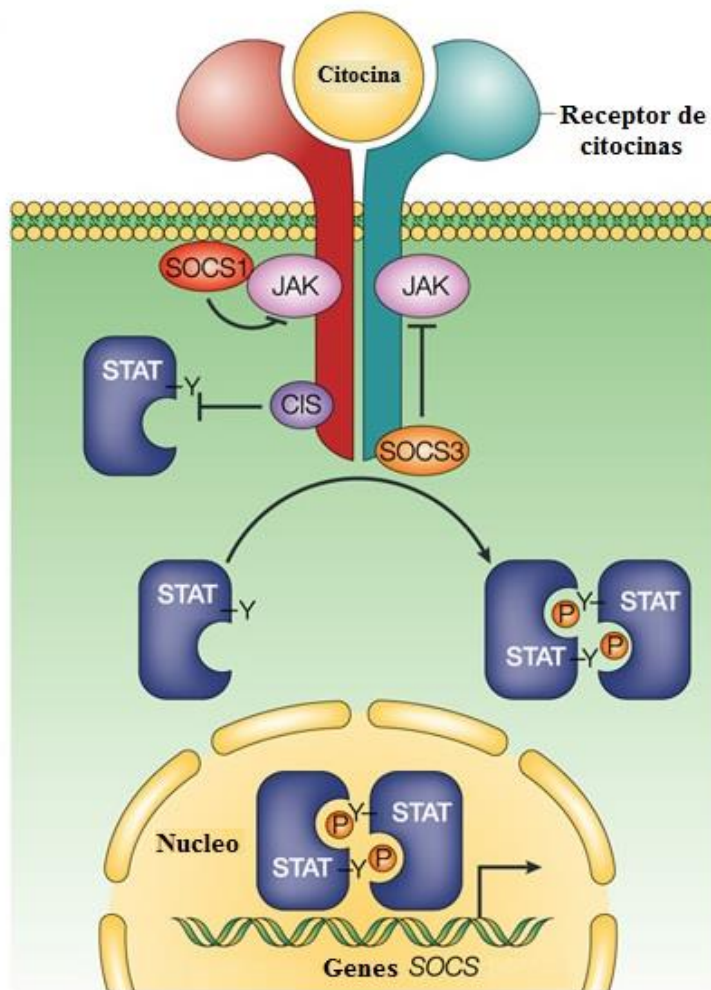


Figura 4. Vía de señalización JAK/STAT. La cascada se inicia por el acoplamiento de receptores de citocinas. Esto conduce a la activación de moléculas JAK's que fosforilan ciertos residuos de tirosina en las cadenas de receptor, lo que genera sitios de atracción para monómeros STAT, que se convierten en STAT's fosforilados (STAT-Y-P), lo que les permite formar dímeros con la capacidad de translocar al núcleo, donde activan o reprimen la expresión de genes diana específicos.

3.6. IL-4 e IL-13

Diversas citocinas inducen la activación de las vías STAT's, entre ellos STAT6 la cual se activa en respuesta en presencia de IL-4 e IL-13 (Todaro 2008).

IL-4 se activa a través de una cascada de interacciones entre moléculas asociadas como IL-4R α , cadena c, Jak1, Jak3, y Stat6. Varios estudios sugieren que IL-4, IL-13 y el receptor IL-4R α pueden estar involucrados en funciones de proliferación, supervivencia y actividades promigratorias en varios tipos de cáncer (Hull, Ingram et al. 2013). La mayoría de estos estudios se han realizado en líneas celulares, en animales deficientes en IL-4 o deficientes del receptor IL-4R α indicando que esta vía de señalización, es un componente importante que contribuye a la formación de tumores (Li, Yang et al. 2008).

Mientras que, por una parte existen estudios que evalúan el desarrollo de cáncer colorrectal (CCR) en ratones deficientes en IL-4, y/o deficientes del receptor IL-4R α , al respecto los resultados no son concluyentes, ya que algunos reportan disminución en el desarrollo tumoral (Hull et al. 2006); mientras que, otros reportan únicamente crecimiento de criptas aberrantes respectivamente (Fingleton et al. 2012).

Los estudios actuales, solo se centran en el impacto de IL-4 e IL-4R α sobre el desarrollo de CCR, sin embargo, la dificultad en estos estudios radica en que la vía STAT6 puede activarse por diferentes moléculas o receptores entre ellos, IL-13 e IL-13R α . Esta brecha en el conocimiento puede ser debido a la complejidad del sistema de señalización de IL-13. IL-13 puede señalizar a través del receptor de tipo II de IL-4R (IL-4R α y IL-13R α 1) o a través de IL-13R α 2 (Todaro 2008). Anteriormente se creía que la vía de IL-13 únicamente servía como receptor señuelo, no obstante, en la actualidad se han detectado niveles elevados de IL-13 en tejido tumoral del cáncer de mama primario y sangre periférica, mediante el estudio de 131 pacientes con cáncer de páncreas, esófago y gástrico, en comparación de controles clínicamente sanos (Srabovici N, Mujagic Z, et al. 2011).

3.7. STAT6

Al igual que otros miembros de la familia de las proteínas, transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT), STAT6 es una molécula con una función dual capaz de señalar la transcripción y transducción de genes inducibles como IL-4 e IL-13 (Hebenstreit, Wirnsberger et al. 2006).

Los siete miembros de la familia STAT's son activados predominantemente por factores de crecimiento y citocinas. Al respecto STAT6 es principalmente activado por IL-4 e IL-13 (J Hou, U Schindler et al. 1994). Una vez que estas citocinas se unen a receptores afines las Janus quinasas asociadas (JAK) se activan y fosforilan residuos de tirosina conservadas en el receptor. Una vez fosforilada, STAT6 lleva a cabo dimerización por medio de su dominio SH2, requisito para su translocación a núcleo (**Figura 5**) (Mikita T, Campbell D et al. 1996). En núcleo, STAT6 tiene la capacidad de unirse directamente al DNA a través de un único dominio de unión capaz de regular la transcripción. STAT6 destaca porque a diferencia de otras moléculas de la familia STAT's, ésta posee preferencia por un único sitio de unión al DNA (Schindler, Wu et al. 1995; Binfeng Lu, Martin Reichel et al. 1997). La porción carboxilo-terminal de STAT6, es responsable de su función de activación de la transcripción y desempeña un papel clave en la polarización de la respuesta inmune Th2. Estudios han demostrado que STAT6 es tanto un regulador negativo como positivo de la transcripción genética (Schroder AJ, Pavlidis P et al. 2002).

3.7.1. Actividad de STAT6 durante el cáncer colorrectal

STAT6 es una molécula crítica en la homeostasis de la respuesta inmune inflamatoria, también, es necesaria para la respuesta eficiente contra helmintos-parásitos y alergias como resultado de una respuesta deficiente Th2. En ratones STAT6^{-/-} hay una mayor respuesta inflamatoria por un aumento en las células Th1 y Th17, por lo que, se presenta mayor inflamación (Homann D, Holz A et al. 1999). La vía de señalización STAT6, se ha disecado en animales deficientes (STAT6^{-/-}) demostrando deficiencias en el desarrollo de la respuesta inmune tipo Th2 (Hebenstreit, Wirnsberger et al. 2006), ya que son incapaces de inducir la diferenciación de linfocitos Th0 a Th2 y por tanto, no pueden montar la respuesta inmune contra parásitos-helmintos (Kaplan, Schindler et al. 1996), así como la respuesta frente al asma o alergias (Akimoto, Numata et al. 1998). Asimismo, ratones

STAT6^{-/-} en respuesta a IL-4 son incapaces de regular MHC clase II, CD23 e IL4R. Mientras que linfocitos B STAT6^{-/-} son incapaces de llevar a cabo el cambio de isotipo de IgG a IgE igualmente en respuesta a IL-4 (Linehan, Warren et al. 1998).

La noción de que STAT6 puede ser un importante regulador de la mitogénesis cuando las células responden normalmente a IL-4, conduce a la pregunta: la activación de STAT6 estará implicada en el crecimiento descontrolado de células en procesos tumorigénicos.

Se ha señalado por ejemplo, que la sobre-activación de STAT6 está asociada a varios tipos de cáncer, entre ellos próstata (Ni Z, Lou W et al. 2002), linfoma cutáneo y linfoma de Hodgkin (Skinnider BF, Elia AJ et al. 2002). Adicionalmente durante el crecimiento de cáncer de mama de alto grado de malignidad y metastásicos se ve disminuido como respuesta a la ausencia de STAT6, sugiriendo que este factor está involucrado en el control del crecimiento tumoral (Ostrand-Rosenberg S, Grusby MJ et al. 2000).

Basado en lo anterior, IL-4 activa la señalización de STAT6, como respuesta a diversos estímulos provenientes del estroma celular circundante y juega un papel en la proliferación y resistencia celular a la apoptosis, por lo que la actividad de STAT6 puede ser un biomarcador involucrado en la capacidad invasiva y metastásica del cáncer, asociado a inflamación.

Un análisis de la actividad y la expresión de STAT6 utilizando líneas celulares de cáncer colorrectal mostró que la línea celular HT-29 con fenotipo activo de STAT6, coincide con la sobre expresión de citocinas tipo Th2, aumento en la expresión y activación de genes anti-apoptóticos y pro-metastásicos. Por el contrario, el modelo celular Caco-2 con fenotipo de menor actividad de STAT6 resulta con sobre expresión de citocinas tipo Th1 y Th17, así como disminución del ciclo celular, tasa elevada de células en apoptosis temprana por Anexina V, la cual se mantiene progresiva hasta el día 6. Proponiendo, que la susceptibilidad a la apoptosis está relacionada con la actividad de STAT6, y que esta propiedad puede reproducirse en diferentes tipos celulares, siempre y cuando estas lleven un fenotipo STAT6^{null} (Li, Yang et al. 2008).

Adicionalmente, mediante el uso de trasplantes de carcinomas mamarios a ratones Balb/C, Ostrand-Rosenberg et al. (2000) demostraron la generación de tumores macroscópicos de tamaño considerable, sin embargo al hacer lo mismo en ratones STAT6^{-/-}, observaron que el crecimiento de los tumores primarios y la metástasis disminuyeron, comparados con ratones Balb/C. Lo cual sugiere que esta proteína puede desempeñar un papel en el control del desarrollo tumoral.

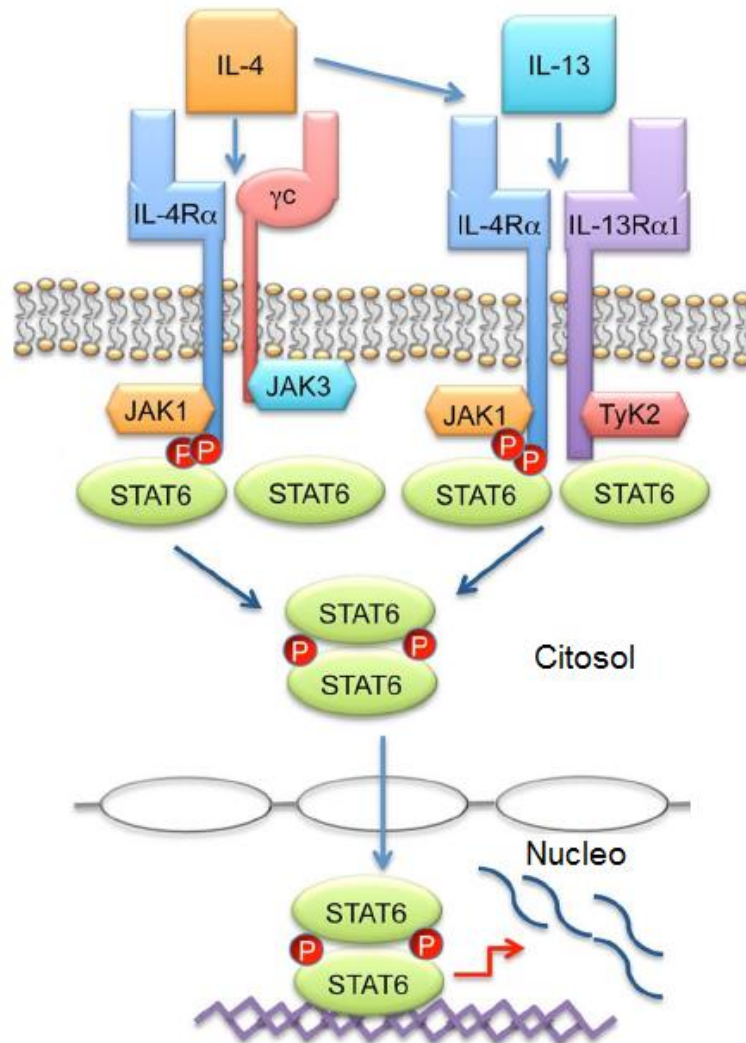


Figura 5. La vía STAT6 se asocia con IL-4 e IL-13. En la vía de STAT6 existen cuatro subunidades diferentes, IL4Rα, cadena gamma (γ) IL13Rα1 e IL13Rα2. IL-4 e IL-13 pueden unirse y señalizar por ambos receptores de tipo II. Tipo II IL4R e IL13Rα2 están presentes en las células tumorales. En respuesta a esta señalización fosforilan a STAT6 que conduce a un aumento en la expresión de genes anti-apoptóticos.

3.8. Modelo experimental de Cáncer colorrectal

Para investigar el desarrollo complejo de la patogénesis del CCR, así como para comprender cambios en la transformación celular, la biología del tumor y mecanismos relacionados con este padecimiento se necesitan herramientas que ayuden a entender y dar respuesta a estas interrogantes.

El cáncer colorrectal en roedores inducidos por carcinógenos pueden recapitular de una manera altamente fiable las fases de inicio y la progresión de tumores que se producen en los seres humanos.

Para esto, hay numerosos modelos animales de CCR, actualmente el más utilizado sobre carcinogénesis de colon inducida químicamente, es el modelo de azoximetano / dextran sulfato de sodio (AOM/DSS) propuesto previamente por Tanaka (2003), siendo el primer modelo *in vivo* establecido (Tanaka T, Kohno H et al. 2003) .

El modelo AOM/DSS es un agente con efectos tóxicos directos en el epitelio del colon. Este puede ser suministrado en el agua para beber de ratones en diferentes ciclos para crear un estado inflamatorio crónico, de suficiente duración (algunos de esos ratones desarrollaran tumores) (Okayasu, Yamada et al. 2002). El desarrollo de tumores puede ser inducido al administrar un factor pro-cancerígeno, esto incluye ratones pre-tratados con agentes genotóxicos como AOM, ó 1,2 dimetil-hidracina (DMH) (Kanneganti, et al., 2011). La Combinación de DSS con AOM ha sido empleado como un modelo de cáncer asociado a colitis, ampliamente reconocido como un modelo de alta reproducibilidad, potencia, bajo costo, y sobre todo, fácil uso.

Durante el desarrollo de este modelo, hay diversas moléculas que pueden verse modificadas por la inducción de CAC, entre estas, se distinguen por su actividad Cox-2, β -catenina y Ki-67.

La ciclooxigenasa 2 (Cox-2) es una enzima que permite al organismo producir sustancias llamadas prostaglandinas (PG) a partir del ácido araquidónico en condiciones de normalidad fisiológica. Sin embargo, cuando nuestro cuerpo sufre alguna lesión o inducción inflamatoria, Cox-2 induce su expresión promoviendo moléculas proinflamatorias. Por lo que, su principal función consiste en mediar los procesos de

inflamación y señalización por prostanoïdes. Su expresión es provocada por diversos mediadores inflamatorios (IFN- γ , TNF- α , IL-1, etc.) en diversas células (monocitos, macrófagos, células endoteliales, condrocitos y osteoblastos) y tejidos (ciertos tejidos afectados por procesos neoplásicos (Ristimäki A, Sivula A et al. 2002).

Un importante número de tumores sobreexpresan Cox-2, mientras que, esto no sucede en tejidos histológicamente normales de los cuales proceden. En este sentido existen sólidas pruebas que sugieren que a nivel celular Cox-2 contribuye a la transformación neoplásica y comportamiento maligno de un tumor, aumentando su capacidad invasiva y metastásica. Al respecto se ha demostrado que Cox-2 induce tumorigénesis de mama en ratones transgénicos. Mientras que la expresión de Cox-2 no es detectable en tejido sano, pero su inducción se enciende en respuesta a la activación celular por citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento y promotores tumorales, y su papel ha sido conectado con inflamación y carcinogénesis (Gupta RA and RN. 2001).

β -catenina es una subunidad de la cadherina (un complejo de proteínas) y actúa como un transductor de señal intracelular en la ruta de Wnt. La desregulación de Wnt/ β -catenina de señalización juega un papel importante en la patogénesis de cáncer colorrectal (Morin PJ, Sparks AB et al. 1997).

β -catenina está regulado por la proteína poliposis adenomatosa coli (APC) que es un gen supresor de tumor y por lo tanto la mutación del gen APC está estrechamente relacionada a cáncer, en particular cáncer colorrectal posterior al desarrollo de la poliposis adenomatosa familiar (FAP), desarrollados en el intestino grueso, no obstante la mayoría de estos pólipos son benignos, tienen el potencial de transformarse en cáncer a medida que avanza el tiempo. β -catenina y APC se encuentran entre los genes clave (junto con K-Ras y SMAD) en el desarrollo del cáncer colorrectal. Por lo tanto, la regulación de β -catenina es fundamental para el efecto supresor de tumor de APC, ya que esta regulación puede eludirse fácilmente mediante mutaciones en APC o β -catenina. (Kabátková M, Zapletal O et al. 2015).

Ki-67 es una proteína nuclear asociada con la replicación y proliferación celular. Además, se asocia con la transcripción del RNAm. La inactivación del antígeno Ki-67 conduce a la inhibición de la síntesis de RNA ribosomal. El crecimiento de tumores es muy variable, no obstante probablemente refleja el curso clínico de tumores. Al respecto el

anticuerpo monoclonal Ki-67, reconoce un antígeno presente en núcleos de células en todas las fases del ciclo celular, excepto G0. De esta manera la fracción de células tumorales Ki-67-positivas se reconocen como el índice de etiquetado Ki-67, a menudo en correlación con el curso clínico oncológico (Oshima CT, Iriya K et al. 2005).

4. Hipótesis

En ausencia de STAT6 no se desarrollarán tumores en un modelo experimental de CAC, debido a cambios en la expresión de citocinas y proteínas involucradas con la tumorigénesis, así como alteraciones en la proliferación y apoptosis a nivel intestinal.

5. Objetivos

5.1. General

- I. Determinar la participación de STAT6 durante el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis en un modelo experimental

5.2. Particulares

- I. Estandarizar el modelo experimental que utiliza AOM/DSS como inductor de cáncer colorrectal en ratones BALB/C y animales deficientes en STAT6.
- II. Evaluar cambios en el peso corporal y signos asociados al desarrollo del CAC en ratones BALB/C y animales deficientes en STAT6.
- III. Identificar cambios en el desarrollo tumoral durante el transcurso del CAC experimental en ausencia de STAT6.
- IV. Estudiar si la deficiencia en STAT6 repercute en la expresión de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias a nivel intestinal.
- V. Analizar cambios en la expresión de las proteínas involucradas con la tumorigénesis del cáncer colorrectal: β -catenina y COX-2 a nivel intestinal en dependencia de STAT6.
- VI. Analizar cambios en la proliferación y apoptosis intestinal durante el desarrollo del CAC en ausencia de STAT6.

7. Materiales y Métodos

7.1. Material Biológico

Para este trabajo, se utilizaron 24 ratones en total, divididos en dos grupos de trabajo, el primer grupo (grupo control), estaba formado por 12 ratones pertenecientes a la cepa BALB/c (Wild Type), el segundo grupo, (grupo experimental), estaba formado por 12 ratones que deficientes del gen que codifica para STAT6 (STAT6^{-/-}). Ambos grupos de ratones, tenían de 6 a 8 semanas de edad aproximadamente y fueron obtenidos en el Bioterio de la FESI.

Antes de iniciar el tratamiento, los ratones fueron marcados individualmente en la oreja derecha, que indicaba el número de individuo, esto con el fin de llevar un registro fiel de los cambios en cada ratón. Los ratones permanecieron durante todo el tratamiento en condiciones de esterilidad, manteniéndose siempre en cajas con un sistema de ventilación controlado y con alimento y agua estériles *at libitum*.

7.2. Inducción del CAC

Para inducir el cáncer colorrectal/asociado a colitis, los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal al día cero 12.5 mg/kg de azoximetano (AOM; SIGMA). Posteriormente se preparó una solución al 2% de Dextrán Sulfato de Sodio (DSS) diluida en agua potable. Al día 5 se administró la solución DSS en el agua para beber. Se utilizaron bebederos de 250ml, para cajas con un máximo de 5 ratones. El DSS se administró durante siete días, posteriormente se cambió de nuevo a agua potable estándar por dos semanas, y nuevamente se repitió el ciclo de solución DSS al día 20 y 40, para proporcionar un segundo y tercer ciclo de DSS (**Figura 6**).

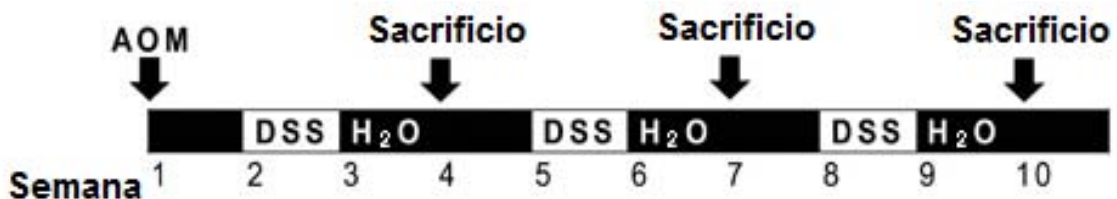


Figura 6. Esquema de administración de AOM/DSS en ratones BALB/c y STAT6^{-/-}. Los ciclos consisten en una semana de DSS en el agua para beber, seguido de dos semanas de agua regular (estéril).

7.3. Valoración de colitis y progresión tumoral

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

Se monitoreó diariamente el progreso del cáncer asociado a la colitis (CAC), registrando la pérdida o ganancia de peso por ratón de cada uno de los grupos, y registrando observaciones de sangrado y heces, finalmente se calculó el índice de la actividad de la enfermedad (IAE) utilizando los siguientes criterios:

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

Figura 7. La puntuación clínica de un índice de actividad de la enfermedad (IAE) para la colitis inducida por DSS se basó en la pérdida de peso, consistencia de las heces, y sangrado.

7.4. Sacrificio

A los días 20, 40 y 68, (una semana después del fin de cada ciclo de DSS) se realizó el sacrificio de los animales. Primeramente, se tomó una muestra de sangre de la cola de cada ratón, con el fin de obtener el suero presente en circulación. Una vez hecho esto, se cubrió el ratón con etanol al 70%, para prevenir que el pelo contaminara el contenido abdominal durante la extracción del colon.

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

7.5. Análisis macroscópico

El colon obtenido se mantuvo en hielo en todo el proceso de examinación macroscópica. Se hizo un lavado con buffer fosfato salino (PBS). Se registró la longitud y el peso de cada uno e inmediatamente después, cada colon se abrió longitudinalmente y se analizó cuidadosamente para examinar la presencia o ausencia de tumores; en el caso donde estuvieron presentes se realizó una evaluación del número y tamaño de los mismos.

Se cortó una muestra de 1cm de región distal de la cola de cada ratón para obtener genotipo por PCR a tiempo final descrito posteriormente (Polymerase Chain Reaction).

Finalmente se obtuvieron disecciones de 1cm aproximadamente de la parte más distal del colon (**Figura 8**), el cual fue fijado en etanol al 100% para procesamiento histológico, una porción más fue almacenada en TRIZOL (Tiocianato de Guanidinio y Fenol) para extracción de RNA y en buffer RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) que es un buffer que permite la lisis celular eficiente y solubilización de proteínas.

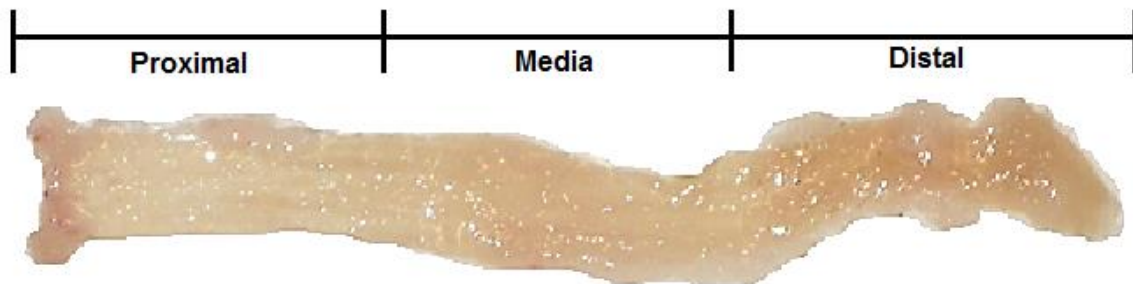


Figura 8. Representación del colon de un ratón, señalando las secciones: proximal (más lejana al ano, pegada al ciego) media y distal (más próxima al ano).

7.6. Técnica histológica

Para valorar el desarrollo de la enfermedad, se llevó a cabo el procesamiento de los tejidos mediante una inclusión en parafina, tinción de hematoxilina y eosina (H&E) y tinción de azul alcian para células caliciformes, de acuerdo con la técnica estandarizada en el laboratorio para preparar y preservar los tejidos.

Primero se llevó a cabo la toma de muestra que como se explicó anteriormente, se realizó seccionando el colon y tomando 1 cm aproximadamente del colon. Después se llevó a cabo la fijación de la muestra, cuya finalidad es mantener la estructura morfológica de las células y los tejidos sin que ocurran cambios notables en ellos mediante fijadores, que en este caso fue alcohol etílico absoluto (etanol al 100%) durante 24 h. Al concluir la fijación, el fijador fue eliminado de las muestras, mediante un lavado de los tejidos con alcohol para continuar posteriormente con la inclusión en parafina.

Los pasos a seguir, una vez terminado el lavado del tejido, para la inclusión en parafina fueron: deshidratación, aclaración o diafanización, inclusión y formación del bloque de parafina.

Se llevó a cabo una deshidratación del tejido con alcohol absoluto mediante tres baños del tejido en este líquido (1 h c/u), sin embargo al no ser miscibles el alcohol y la parafina, fue necesario utilizar un líquido apolar, en este caso xilol, de la misma manera por medio de tres baños del tejido en él (1 h c/u), que sirve como aclarador, para finalmente ser incluida por infiltración en parafina por medio de 2 baños de ésta (1 hh c/u), y una última para la inclusión en un bloque final por molde.

Una vez obtenidos los bloques de los tejidos, se pasó a la siguiente etapa de corte mediante un micrótopo. En este caso se realizaron cortes de 3 micras de grueso, los cortes obtenidos, aislados o en forma de cintas, generalmente se presentaron arrugados y mostraron un área menor que la que poseen en la inclusión, por lo que fue necesario extenderlos mediante un baño de flotación y luego adherirlos a las láminas o portaobjetos y continuar así con la tinción de H&E.

En la tinción H&E se utilizó hematoxilina que tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como el núcleo que contiene DNA y eosina que tiñe componentes

básicos (acidófilas) en tonos de color rosa como el citoplasma y demás orgánulos eosinófilos de la célula. Los pasos a seguir para el proceso de tinción mediante H&E fueron: desparafinar, hidratar, colorear con hematoxilina, lavar, diferenciar, virar, colorear con eosina, deshidratar y diafanizar o aclarar.

Inicialmente se desparafinaron los cortes por medio de 2 baños de xilol (5 min c/u). Posteriormente se hidrataron los cortes en baños decrecientes de alcohol (100%, 90%, 80% y 70%, 3 min c/u). Inmediatamente se colorearon con la solución de hematoxilina (3 min), y se lavaron los tejidos con agua corriente (2 min). Para eliminar el exceso de colorante y realizar la viración, se utilizó alcohol ácido, hasta que los núcleos y los componentes basófilos de las células fueron los únicos que permanecieron teñidos y se lavaron de nuevo con agua corriente. Después se colorearon con la solución de eosina (3 min), y se lavaron los tejidos con agua corriente (2 min). Posteriormente, se deshidrataron los tejidos en baños crecientes de alcohol (70%, 80%, 90% y 100%, 3 min c/u). Por último se aclaró empleando xilol (5 min). En este punto se realizó el último procedimiento que fue hacer el montaje de los tejidos, colocando resina y un cubreobjetos sobre ellos.

En la tinción para células caliciformes con azul alcian, se realizó el mismo procedimiento de inclusión y corte, la variante en este protocolo fue la tinción. Inicialmente se desparafinaron los cortes por medio de 1 baño de xilol (10 min) y alcohol-xilol (3 min). Posteriormente se hidrataron los cortes en baños decrecientes de alcohol (100%, 90%, 80% y 70%, 2 min c/u). Se llevó a cabo un lavado con agua corriente para inmediatamente colorear con la solución de azul alcian (30 seg), se lavaron nuevamente los tejidos con agua corriente y se colorearon con la solución de hematoxilina (3.30 min), posteriormente se lavaron para eliminar el exceso de colorante y realizar la viración donde se empleó el ácido clorhídrico, hasta que los núcleos y los componentes basófilos de las células fueron los únicos que permanecieron teñidos, se lavaron nuevamente mediante una secuencia de agua corriente-agua amoniacal-agua corriente. Después se comenzó con la deshidratación de los tejidos con alcohol al 70%, sin embargo en este punto fue necesario intervenir con una coloración con la solución de eosina (3 min) para poder continuar con baños crecientes de alcohol (80%, 90% y 100%, 3 min c/u). Por último se llevó a cabo el aclaramiento empleando xilol (5 min). En este punto se procedió a realizar el último procedimiento que fue hacer el montaje de los tejidos, colocando resina y un cubreobjetos sobre ellos.

7.7. Inmunohistoquímica

Se llevó a cabo también la técnica de inmunohistoquímica (IHQ), que es un procedimiento histopatológico, que corresponde a una inmunotinción, la cual, permitió demostrar una variedad de antígenos presentes en los tejidos utilizando anticuerpos marcados (COX-2, β -Catenina y Ki67). Esta técnica se basa en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a sus antígenos correspondientes, la reacción es visible mediante una técnica de inmunoperoxidasa donde se utiliza como marcador una enzima que es capaz de hacer cambiar de color el sustrato incoloro, en este caso el colon de los ratones.

Esta técnica se llevó a cabo de acuerdo con la técnica estandarizada en el laboratorio. En la Inmunohistoquímica, básicamente es el mismo procedimiento de inclusión y corte que se ha explicado anteriormente (apartado 7.6).

Inicialmente se desparafinaron los cortes por medio de 2 baños de xilol (3 min c/u). Posteriormente se hidrataron los cortes en baños decrecientes de alcohol (100% y 96%, 3 min c/u) y se lavaron los tejidos con agua destilada (3 min).

Consecutivamente se llevó a cabo la recuperación antigénica en una olla de presión pre calentada, y en un vaso se agregó buffer de citratos (DIVA) con las láminas a tratar (30min), una vez que paso el tiempo de recuperación antigénica se sacó el vaso y se dejó enfriar el buffer de citratos a temperatura ambiente para evitar el choque térmico y el daño al tejido.

Nuevamente se lavaron, cambiando la solución por PBS-Tween, se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3 % en metanol (10 minutos), se lavaron con PBS-Tween, y se llevaron a bloqueo con PBS-BSA 2% (1 hora) para lavar de nuevo con PBS-Tween.

Posteriormente se agregó el anticuerpo primario (1:100 / 200 ml por lámina), disuelto en buffer de bloqueo BioCare Medicals Background Sniper (toda la noche) cubiertos con Parafilm para evitar la desecación de la muestra, para volver a lavar con PBS-Tween y agregar el anticuerpo secundario (1:1000) (30 minutos) y de nuevo un lavado con PBS-Tween.

Para el revelado se utilizó diaminobencidina, 1 gota de reactivo/ml de buffer y un lavado con PBS-Tween, se colocaron en agua destilada para poder contrateñir con hematoxilina (1-2 min), se lavó con agua corriente y se realizó un vire de tinción con agua amoniacal al 3% (15 seg). Al cabo se deshidrataron los tejidos en baños crecientes de alcohol (96% y 100%, 3 min c/u).

Por último se aclaró empleando xilol (5 min). En este punto se realizó el último procedimiento que es hacer el montaje de los tejidos, colocando resina y un cubreobjetos sobre ellos.

7.8. Genotipo

Para confirmar la ausencia de STAT6 en los animales con fondo BALB/c se extrajo el DNA por medio de una digestión enzimática.

Con las muestras de 1 cm obtenidas de la región distal de la cola de cada ratón, se llevó a cabo la técnica de digestión enzimática. Para ello se agregó a cada muestra 500 µl de buffer de lisis con 10 µg de proteinasa K (Colagenasa) y se mantuvo a 65° durante 2 horas. Posteriormente se obtuvo el sobrenadante de la digestión, eliminando los restos celulares por centrifugación a 12 000 rpm por 10min. A continuación se llevó a cabo una precipitación de todo el material genético con 500 µl de isopropanol frío y se centrifugó a 12 000 rpm por 10 min. Para precipitar solamente el DNA, se utilizó 1 ml de etanol al 75% para resuspender la pastilla y se centrifugó la muestra a 12 000 rpm por 10 min. Finalmente se dejó secar la pastilla para eliminar los restos de etanol. Al final se resuspendió en 200 µl de agua Milli-Q. Para este punto ya se obtuvo el DNA, para poder ser secuenciado por medio de una reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). (Más adelante 7.10)

7.9. Extracción de RNA

Con la biopsia obtenida y conservada en TRIZOL a -70°C, se llevó a cabo la extracción de RNA. El tejido se homogeneizó con un Bullet Blender (10 min). Posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo y se centrifugaron los tejidos a 13 500 rpm durante 15 min a 2°C para separar lípidos, carbohidratos y material extracelular. Se recuperó el material genético en un tubo nuevo para agregarle 500 µl de isopropanol frío, y centrifugar nuevamente a 13 500 rpm por 15 min a 2°C con el fin de precipitar el material genético y obtener la “pastilla”. Se utilizó 1 ml de etanol al 75% para resuspender la pastilla y se centrifugó la muestra por última vez a 13 500 rpm x 10 min a 2°C. Por último se dejó secar la pastilla para eliminar restos del etanol y se resuspendió en 20 µl de H₂O estéril (Agua Milli-Q).

Finalmente se llevó a cabo la electroforesis, utilizando un gel de agarosa al 8% teñido con BrEt (bromuro de etidio) para analizar la integridad del RNA, y una cuantificación en un espectrofotómetro de microplacas (Epoch) a una absorbancia de 260 nm.

7.10. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Para evaluar cambios en la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF α , IFN γ e IL-17 y antiinflamatorias como IL-10 e IL-6 durante cada uno de los ciclos de administración de AOM/DSS, se llevó a cabo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en punto final (PCR). Las secuencias específicas de cada gen utilizado en el PCR se listan en la **Tabla 2**.

Genes	Secuencia	Condiciones de PCR
GAPDH	F* 5'-CTCATG ACC ACA GTC CAT GC-3' R* 5'-CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC-3'	56°C (35)
TNFα	F 5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG-3' R 5'-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TGC G-3'	59°C (30)
IFNγ	F 5'-AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG-3' R 5'-GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG-3'	57°C (30)
IL-17	F 5'-AAC ATG AGT CCA GGG AGA GC-3' R 5'-AGT TTC CCA GAT CAC AGA GG-3'	59.5°C (35)
IL-10	F 5'-TGC TGC CTG CTC TTA CTG AC-3' R 5'-GGG GCA TCA CTT CTA CCA GG -3'	60°C (30)
IL-6	F 5'-GAC CAC AGT GAG GAA TGT CCA-3' R 5'-GGA GTC ACA GGA GGA GTG GC-3'	59.5°C (35)

Tabla 2. Secuencias específicas de cada primer usadas en el análisis de PCR. (* F, primer forward; R, primer reverse).

La amplificación se llevó a cabo mediante el kit KAPATaq DNA Polymerase, siguiendo el protocolo del mismo, en el que se utilizó el DNA para la genotipificación (apartado 7.8) y el RNA para el perfil de citocinas circulantes (apartado 7.9).

La PCR se realizó en 4 etapas (desnaturalización, anillamiento, extensión, y extensión final) que en este caso se llevaron a cabo en un termociclador (ascenso y descenso rápido de la temperatura) durante 30-35 ciclos de repetición y con una T_m (melting temperature/temperatura de fusión) específica dependiendo del Primer que se desea usar. Como gen constitutivo se utilizó el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control interno se utilizó agua. Se llevó a cabo PCR, mediante una mezcla de reacción, con un volumen final de 20 μ l que contenía 1 μ l de cDNA (2 μ g) (**Tabla 3**). Siguiendo las instrucciones de las condiciones de cada ciclo (**Tabla 4**).

20 µl por rxn	
Agua	20 µl
Buffer con Mg²⁺	2 µl
dNTPs	0.4 µl
Fwd Primer	0.8 µl
Rev Primer	0.8 µl
cDNA	1 µl
KapaTaq	0.08 µl

Tabla 3. Mezcla de reacción de PCR en punto final, para 20 µl por reacción

Desnaturalización inicial	94°C	1 min
Desnaturalización	95°C	30 seg
Anillamiento	Tm específica por primer	30 seg
Extensión	72°C	30 seg
Extensión Final	72°C	7 min

Tabla 4. Instrucciones de ciclos para PCR.

Después de que termino la PCR se separaron los productos en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio y las bandas visualizadas fueron escaneadas utilizando BioSense Imager. Cada gen fue probado independientemente al menos 2 veces por PCR antes de realizar el análisis.

7.11. Ensayo de apoptosis por TUNEL

Para saber si hubo cambios en la apoptosis durante el desarrollo de CAC, fue necesario evaluar el nivel de apoptosis celular en los diferentes ciclos de tratamiento (al día 20, 40, y 68) con AOM/DSS en cada grupo de ratones (BALB/c Control, BALB/c AOM, STAT6^{-/-} Control y STAT6^{-/-} AOM).

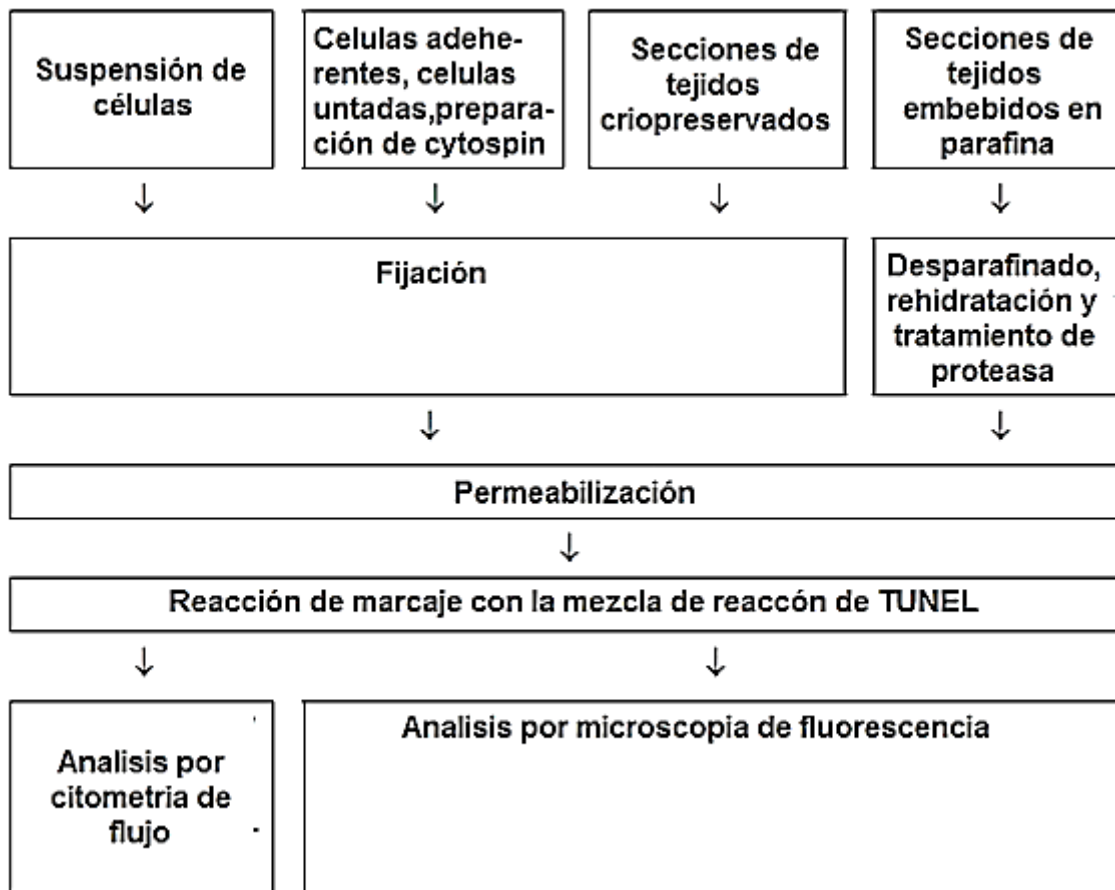
La degradación del DNA es una de las características más importantes de la apoptosis y por ello se han desarrollado diferentes métodos que permiten analizar individualmente cada célula en busca de esta degradación, entre estos se encuentra el ensayo de TUNEL (transferase-mediated dUTP nick endlabeling).

El ensayo enzimático TUNEL se utilizó para evaluar el índice de apoptosis (o muerte celular programada) en células individuales basándose en la tecnología de deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick-end-labeling. Esta técnica permitió determinar la presencia de fragmentos de DNA en células individuales, por lo que es posible conocer la proporción de células que están en apoptosis en un determinado momento.

En resumen, en el ensayo propuesto se incorporó la desoxiuridina biotinilada al 3'OH de las cadenas de ADN rotas en células apoptóticas utilizando la enzima TdT. La biotina actuó como señal y se detectó con estreptavidina marcada con la enzima HRP que se une a los nucleótios biotinilados, y se visualizó utilizando el sustrato de la HRP, 3,3-diaminobenzidina (DAB). Su fundamento está en la detección de la ruptura del DNA internucleosomal, típica de la apoptosis en secciones de tejido fijadas en parafina.

Este trabajo utilizó el kit para la detección y cuantificación de la apoptosis a nivel de una sola célula basado en el marcaje de la ruptura de la cadena del DNA (In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein) de Roche, siguiendo las especificaciones del proveedor.

El procedimiento del ensayo se explica en el siguiente diagrama de flujo



7.12. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba de ANOVA de dos vías y una prueba de comparación múltiple de Tukey para ver diferencias significativas ($\alpha < 0.05$, 95%) con GraphPad Prisma 6 (San Diego, CA). El análisis y procesamiento digital de las imágenes se realizó mediante Image J (National Institutes of Health).

8. Resultados

8.1. Genotipo de animales STAT6

Todos los animales obtenidos del Bioterio de la Fes Iztacala, fueron genotipados para comprobar su estado Knock out (K.O) donde se obtuvo una población del 100% de ratones (K.O) para STAT6 (**Figura 9**) y como control se utilizó un animal BALB/c (Wild Type).

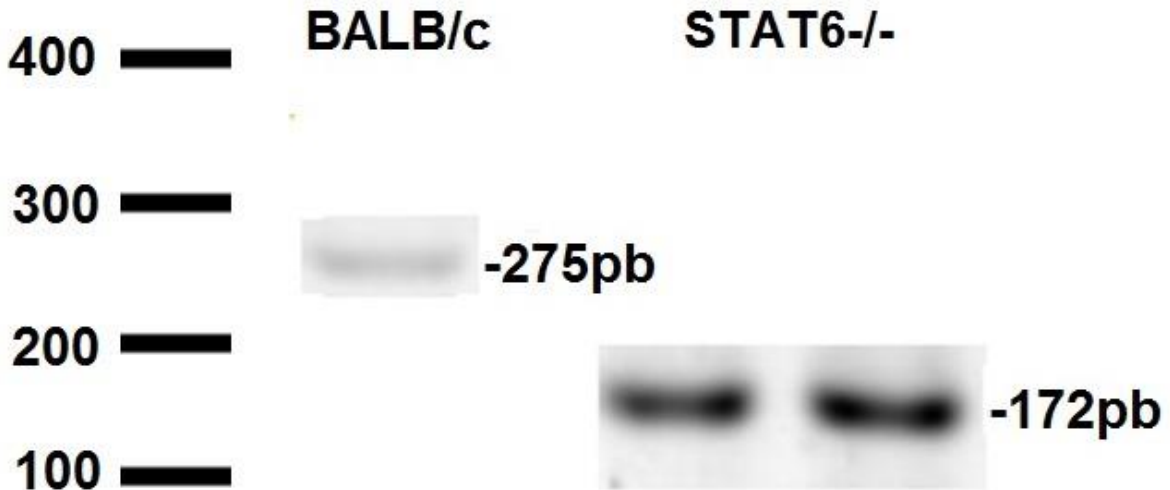


Figura 9. Electroforesis de muestra de genotipo para animales STAT6 (-/-).

8.2. Síntomas de la enfermedad y Análisis de cambios del peso corporal en animales BALB/c (WT) y STAT6 (Knock-out) durante tratamiento con AOM/DSS.

Durante las diez semanas bajo tratamiento con AOM/DSS para la inducción de CCR, se registraron sangrado en recto y diarrea considerados como síntomas asociados al CCR, en los 4 grupos (Control, BALB/c Control, BALB/c AOM, STAT6^{-/-} Control y STAT6^{-/-} AOM).

Durante la administración del tratamiento, el grupo de los animales BALB/c AOM presentó sangrado, diarrea, piloerección y disminución en el peso corporal, a partir del primer ciclo de DSS. Sin embargo, en los ratones STAT6^{-/-} AOM que recibieron el tratamiento no se observaron estos cambios excepto en un par de animales hasta la última semana (**Figura 10a**).

Se registró el porcentaje de cambio de peso en los cuatro grupos de animales, donde se observó que desde el día 20 que corresponde a una semana después del primer ciclo de DSS, los ratones BALB/c AOM presentaron una disminución considerable en la ganancia de peso, esto mismo se observó al día 40 y durante los días siguientes del tratamiento. Sin embargo, en los ratones STAT6^{-/-}AOM no tuvieron pérdida significativa en el peso corporal y al contrario ganaron más peso que los animales del grupo control (**Figura 10b**).

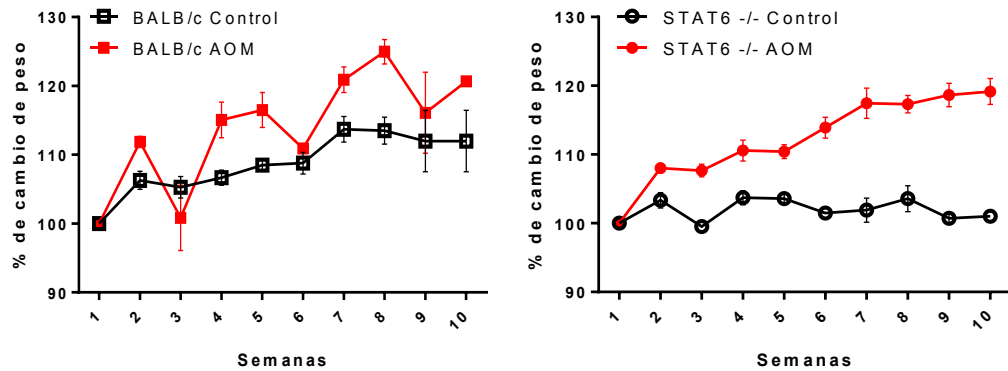
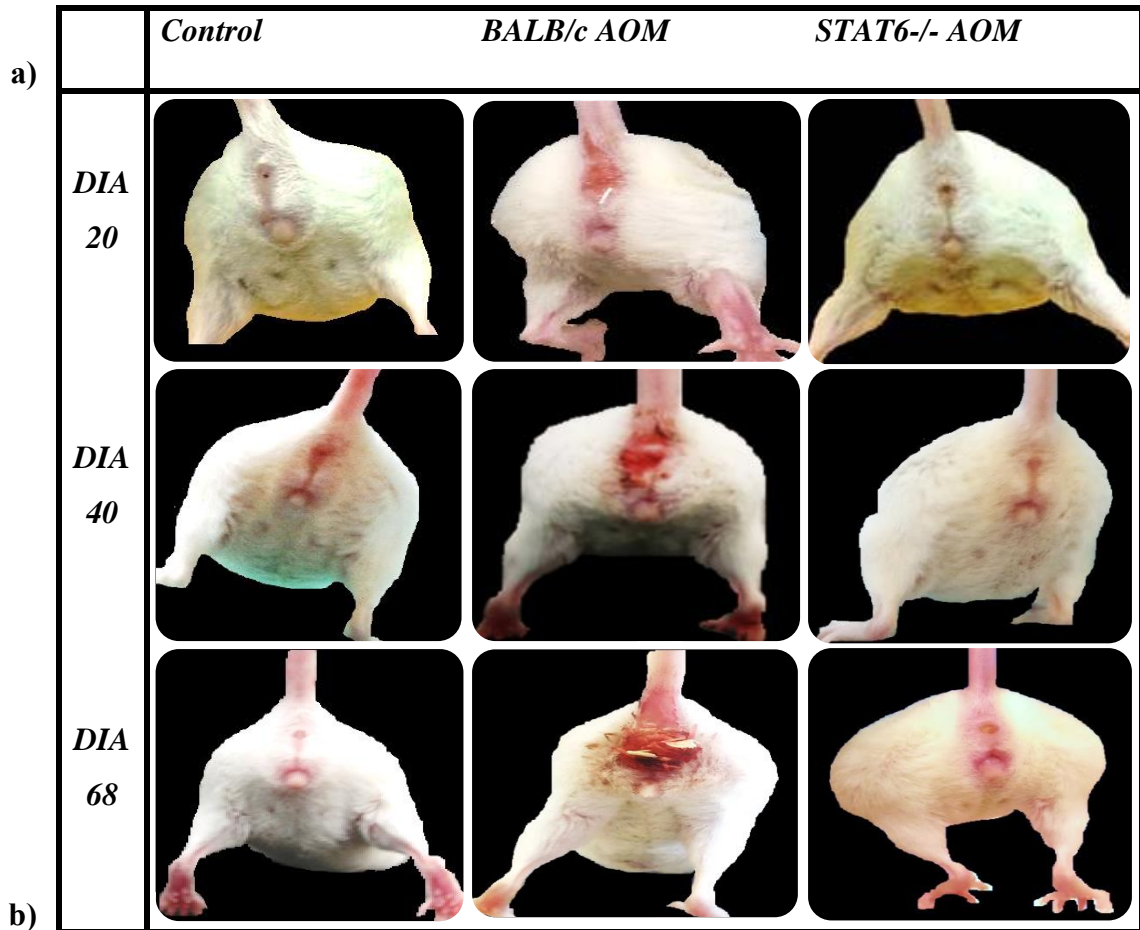


Figura 10. Cambios anatómicos-morfométricos y de ganancia de peso asociados al desarrollo del CAC durante la administración de AOM/DSS a animales BALB/c y STAT6^{-/-}. a) Síntomas de diarrea y sangrado de los ratones BALB/c AOM y STAT6^{-/-} AOM a lo largo del tratamiento (Días 20, 40 y 68 desde la inducción). b) Cambios en el peso corporal expresado en porcentaje de los ratones a partir de la primera semana de inducción del tratamiento. Los datos corresponden a 6 animales por grupo y representan el promedio \pm DS. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Se muestran resultados obtenidos de tres experimentos independientes.

8.3. Análisis del índice de daño de la enfermedad (IAE)

Durante la inducción del CAC se registraron diversos signos para determinar el IAE como se describe en materiales y métodos. A partir de la primer semana y hasta finalizado el tratamiento, los ratones del grupo BALB/c presentaron signos característicos de la enfermedad, como sangrado rectal, diarrea, y disminución en la ganancia de peso corporal. No obstante los ratones del grupo STAT6 ^{-/-} AOM no experimentaron signos considerables, durante toda la administración del DSS (**Figura 11**).

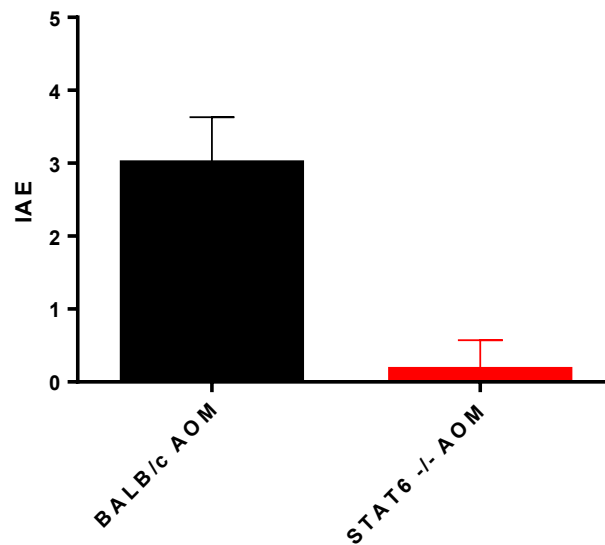


Figura 11. Índice de daño a la enfermedad (IAE) en grupo control y grupo con tratamiento AOM. El daño fue menor en el grupo STAT6^{-/-}. Los datos corresponden a 6 animales por grupo y representan el promedio ±DS. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Se muestran resultados obtenidos de tres experimentos independientes.

8.4. Análisis de desarrollo tumoral

Los animales se sacrificaron al día 20,40 y 68 después del inicio del tratamiento. Estos días correspondieron a una semana después de la administración de cada ciclo de DSS. En la **figura 12**, se observa el porcentaje de ratones libres de tumores a los días 20, 40 y 68. Al día 20, ninguno de los animales de los grupos BALB/c AOM y STAT6^{-/-} AOM había desarrollado tumores a nivel macroscópico. Sin embargo, en el colon de los ratones del grupo BALB/c AOM a partir del día 40, el 70% de los ratones del grupo mostraron desarrollo tumoral, que generalmente estuvo acompañado de un sangrado importante y diarrea. Al día 68 el 100% de los animales BALB/c desarrolló tumores. Por el contrario, el grupo STAT6^{-/-} AOM al día 40 ninguno de los animales presentaba signos de la enfermedad ni desarrollo tumoral. Además, al día 68 cuando finalizó el tratamiento, el 70% de los ratones STAT6^{-/-} estuvieron libres de tumores.

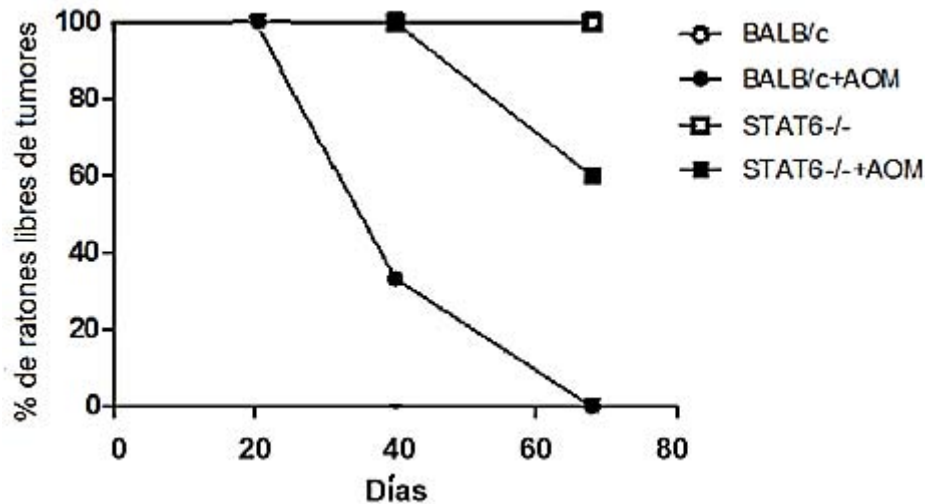


Figura 12. Porcentaje de ratones libres de tumor en grupos control y grupos con tratamiento-AOM, durante la inducción de DSS/AOM. El 100% del grupo BALB/c AOM desarrolló tumores mientras que solo el 30% del grupo STAT6^{-/-} AOM desarrolló tumores. Los datos son representativos de 6 animales por grupo.

8.5. Análisis de cambios morfométricos en el intestino

Al concluir el tratamiento AOM/DSS al día 68, todos los grupos fueron sacrificados y el colon fue extraído para observar los cambios macroscópicos presentes directamente. Se observó que el grupo BALB/c AOM desarrolló un número importante de tumores que inició desde la zona media hasta la zona distal del colon, a diferencia del grupo STAT6^{-/-} AOM donde generalmente no se encontraron tumores (**Figura 13a y 13b**).

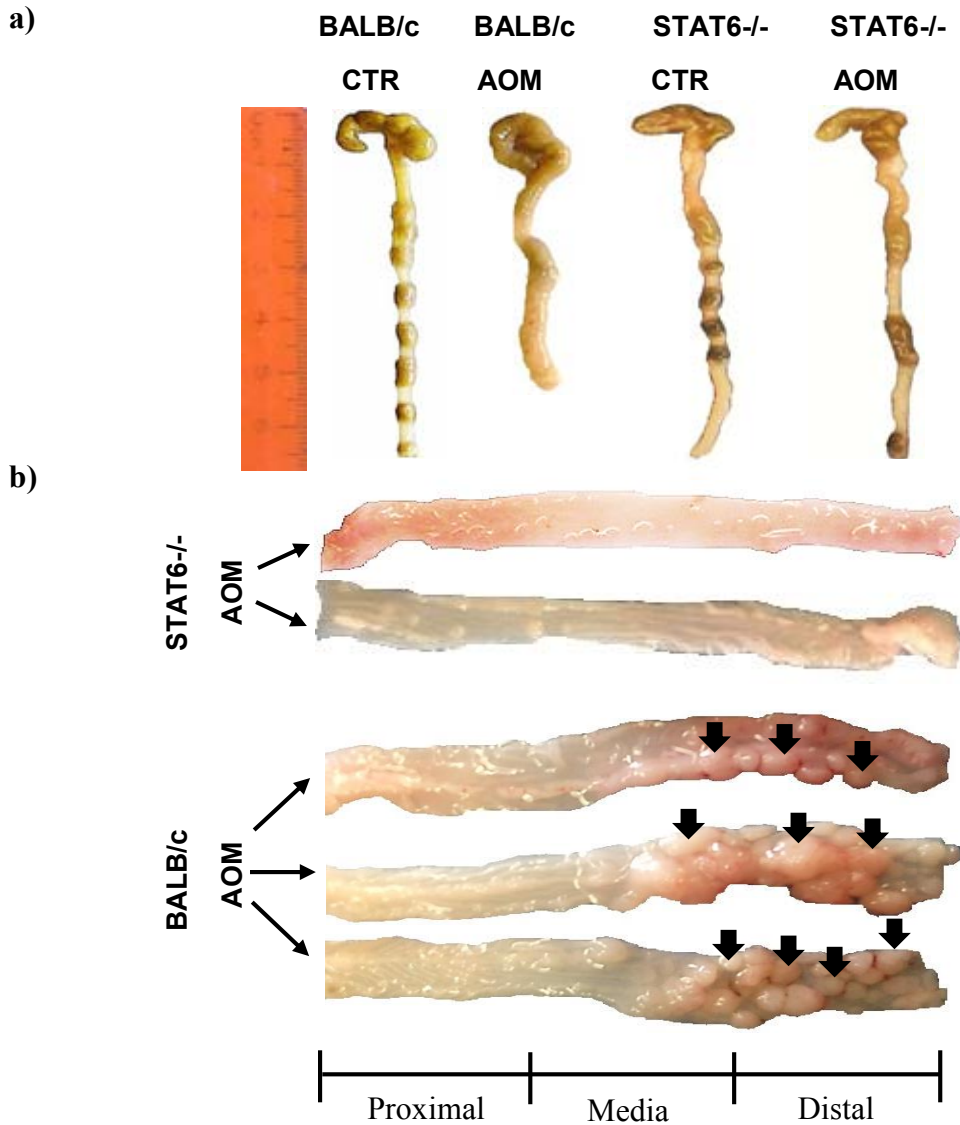


Figura 13. Colon de ratones de los grupos BALB/c AOM y STAT6^{-/-} AOM al día 68 del tratamiento de AOM/DSS. a) Colon y ciego de los 4 grupos. b) Colon abierto, donde se muestra la presencia de tumores en el grupo BALB/c AOM a diferencia del grupo de STAT6^{-/-} AOM. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

Como una medida alternativa para evaluar cambios en el desarrollo tumoral, se registró el peso del intestino. El peso registrado en el grupo BALB/c AOM varió de 0.5 a 0.7 gr más que el grupo control, lo que indica que el tratamiento AOM/DSS indujo un aumento significativo en el peso del colon que pudo deberse al desarrollo tumoral de este grupo. Sin embargo, los ratones STAT6^{-/-} AOM no presentaron cambios en el peso del colon respecto al grupo control probablemente porque no desarrollaron tumores después de la inducción del tratamiento (**Figura 14**).

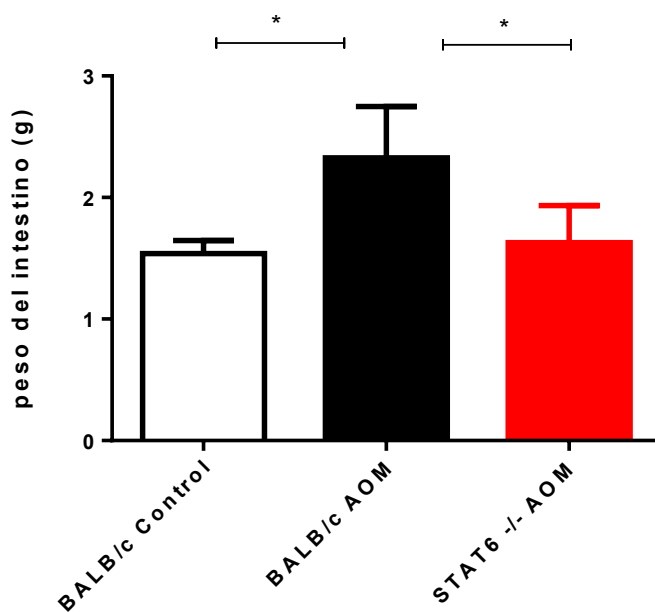


Figura 14. Peso del intestino, en los grupos control y el grupo con tratamiento, al día 68 de la inducción de DSS/AOM. El peso en el grupo BALB/c fue mayor. Los datos corresponden a 6 animales por grupo y representan el promedio \pm DS. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Se muestran resultados obtenidos de tres experimentos independientes.

8.6. Análisis del número y tamaño de tumores en modelos WT y STAT6^{-/-}

Al día 68 el colon de los ratones del grupo BALB/c AOM presentó en promedio 8 ± 5 tumores, 6 ± 4 tumores fueron menores a 2mm y 3 ± 1 tumores mayores a 2mm. Por el contrario, los animales en los que se encontraron tumores de los ratones del grupo STAT6^{-/-} AOM, presentaron en promedio 2 ± 1 tumores en la región distal del colon de tamaño pequeño (menores a 2mm) (Fig. 15a y 15b).

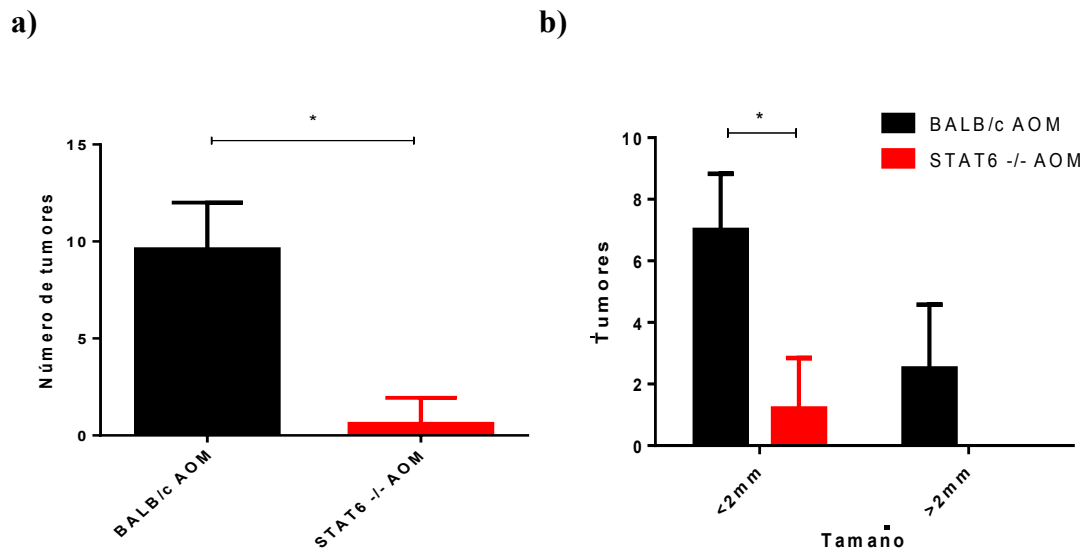


Figura 15. Análisis del número y tamaño de tumores en modelos WT y STAT6^{-/-}. a) Número y b) tamaño de tumores presentes en los grupos BALB/c AOM y STAT6^{-/-}AOM. El grupo BALB/c presentó un mayor número de tumores menores de 2mm que de tumores de más de 2mm. Mientras que el grupo STAT6^{-/-} AOM solo presentó tumores menores de 2mm. Los datos corresponden a 6 animales por grupo y representan el promedio \pm DS. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Se muestra el promedio representativo de resultados obtenidos de tres experimentos independientes.

8.7. Análisis histopatológico de colon (H&E).

El cáncer colorrectal asociado a la colitis (CAC), presenta características de infiltrado inflamatorio, y pérdida de la estructura epitelial. Para determinar si los grupos de animales después del tratamiento de AOM/DSS presentaban estas características se realizaron cortes histológicos y tinciones de Hematoxilina & Eosina (H&E). En el grupo control se observa la mucosa (M) con apariencia normal del colon, los bordes de esta capa no presentaron deformaciones, ni engrosamientos, tampoco mostraron infiltrado inflamatorio, ni lesiones polipoides (**Figura 16**).

En el grupo BALB/c AOM al día 20 se empezó a observar un infiltrado inflamatorio leve con un engrosamiento mínimo de la capa de la mucosa y submucosa (SM), lo que causó alteraciones y lesiones pequeñas, mientras que al día 40 se observó la agrupación de glándulas anormales en forma de tubo en la capa de la mucosa [formación de focos de criptas aberrantes (FCA)] con indicios de inflamación, numerosas glándulas displásicas y pequeñas lesiones polipoides constituidas por epitelio hiperplásico. Finalmente al día 68 se observó una extensa inflamación crónica localizada en la capa de la mucosa y submucosa, reflejada en un engrosamiento exacerbado, así como lesiones displásicas graves, y numerosos tumores polipoides, constituidos por glándulas cubiertas por células epiteliales atípicas y numerosas figuras mitóticas, que corresponden a adenocarcinomas polipoides (APC) bien diferenciados, todo esto conllevó a la pérdida completa en la morfología del intestino.

Por el contrario, al analizar el grupo STAT6^{-/-}-AOM durante los 3 periodos de tratamiento AOM/DSS, no se observaron grandes infiltrados celulares, alteraciones o lesiones, en cambio se observó que la estructura del colon permaneció casi intacta, pudiéndose observar fácilmente la definición de las capas de la mucosa, submucosa y muscular (Mu) propias de un colon sin lesiones.

8.8. Análisis morfo-histológico de células caliciformes en colon

Las células caliciformes son células glandulares productoras de moco presentes en el revestimiento intestinal del colon. Al existir un daño por medio de la inducción de CCR, la estructura del colon se va perdiendo así como la distribución de algunos grupos celulares, por lo que se utilizó la tinción de Alcian Blue que tiñe las células caliciformes de color azul. En el grupo control se notó la presencia de estas células en todo el revestimiento de la capa de la mucosa. Mientras que en el grupo BALB/c AOM al día 20 existió una disminución leve en estas células que se mantiene de manera gradual en los ciclos siguientes de AOM/DSS en este grupo. Probablemente debido a la deformación del intestino por el daño y las lesiones presentes.

No obstante, al analizar las células caliciformes presentes en el grupo STAT6^{-/-} AOM, se observó que estas células no disminuyen y que se mantienen presentes durante todos los ciclos del tratamiento, lo que coincide con lo mostrado en la tinción de H&E donde la arquitectura del epitelio se mantiene **(Figura 17)**.

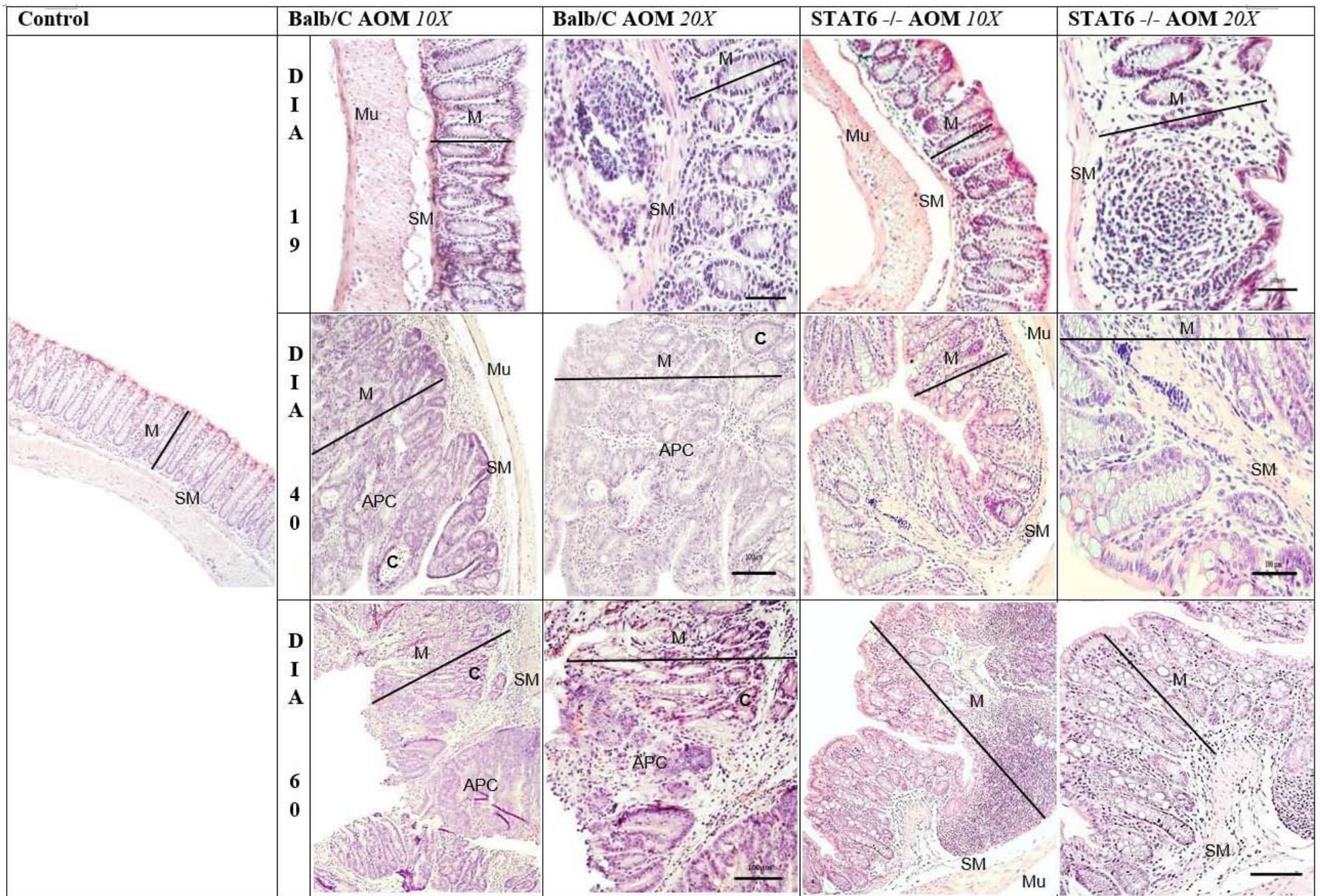


Figura 16 Cortes histológicos del colon con tinción H&E. Pérdida de la morfología del colon en el grupo Balb/C AOM, respecto al grupo STAT6^{-/-} AOM, observado en un aumento 10X y 20X. Se puede observar la estructura de un colon sano en el control, que se compone de la mucosa (M) y en ella las criptas aberrantes (C), la submucosa (SM) y la capa muscular (Mu). En el grupo BALB/c AOM se observa daño por adenocarcinoma polipoide (APC). En el grupo STAT6^{-/-} AOM se observa un leve engrosamiento de la capa de la mucosa, pero se conserva la estructura del colon.

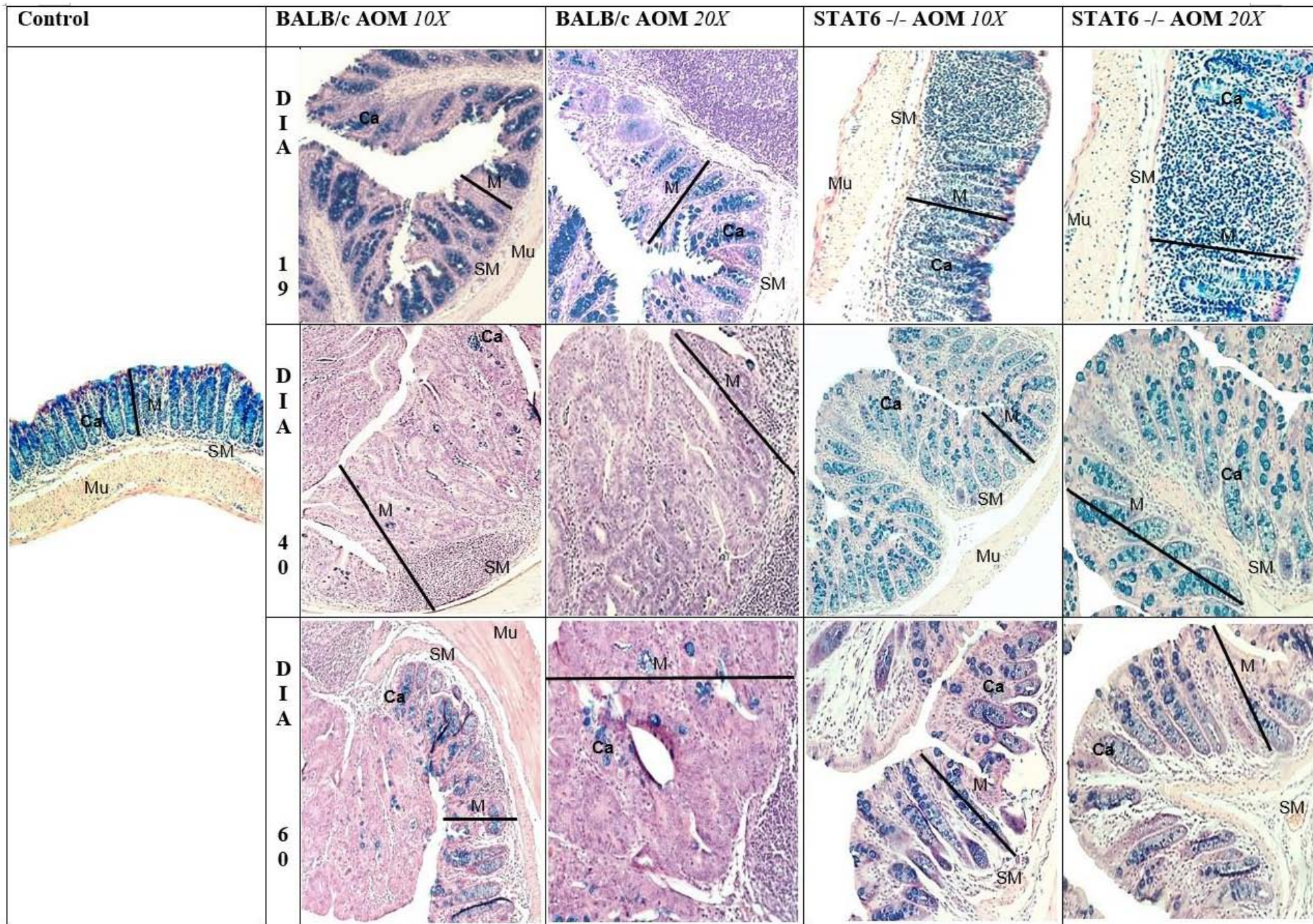


Figura 17. Tinción de Alcian Blue donde las células caliciformes se tiñen de azul. Se observa que en el grupo BALB/c AOM no hay tinción de azul, indicando la pérdida de las células caliciformes, en contraste con STAT6 -/- AOM, donde estas células se mantienen. Se observa la mucosa (M) y en ella las criptas aberrantes (C), la submucosa (SM) y la capa muscular (Mu) células caliciformes (Ca).

8.9. Análisis en la expresión de marcadores Cox-2, β -Catenina por inmunohistoquímica

En el microambiente tumoral, existen diversos infiltrados celulares, que modifican las condiciones, favoreciendo o no, al desarrollo tumoral. Para determinar qué tipo de infiltrado estaba presente en el colon de los animales después del tratamiento de AOM/DSS se realizaron cortes histológicos y una Inmunohistoquímica donde se utilizaron diferentes anticuerpos: COX-2, F4/80, Ki67 y β -Catenina.

Se realizó una tinción con el anticuerpo de COX-2, y se observó que al día 20 hay un ligero marcaje de entre la mucosa del intestino del grupo BALB/c AOM. Al día 40, mientras la estructura del intestino se va perdiendo gradualmente en el grupo BALB/c AOM, el marcaje de COX-2 aumenta y se presenta de manera uniforme en los núcleos celulares, mientras que en el grupo STAT6^{-/-} AOM donde no se presenta la deformación típica de la estructura del intestino, hay un ligero marcaje en las células de COX-2, que aún sigue siendo menor que en el grupo BALB/c AOM (**Figura 18**).

Finalmente al terminar el tratamiento de DSS al día 68 observamos un aumento considerable en la expresión de COX-2 en la capa de la mucosa del grupo BALB/c AOM, que coincide con las alteraciones de la mucosa. Por otra parte, la expresión de COX-2 en el grupo STAT6^{-/-} AOM se mantiene en las bordes de la capa mucosa del intestino, sin presentarse alteraciones en la estructura de las capas.

Al analizar la expresión de Ki67, un marcador relacionado con la proliferación celular, se observó que al día 20 la expresión de Ki67 se mantiene constante en todos los grupos. En el grupo BALB/c la expresión de esta molécula aumentó gradualmente durante los siguientes ciclos de administración de AOM/DSS (Día 40 y 68). En el grupo STAT6^{-/-} AOM la expresión parece mantenerse constante, aunque hubo una disminución al día 68 de administración de AOM/DSS (**Figura 19**).

El grupo BALB/c AOM, presentó una marca positiva de β - Catenina sugiriendo una acumulación ligera en la mucosa del intestino a partir del día 20 de administración. Sin embargo, a partir del segundo ciclo (día 40), donde se generan células displásicas, se determinó una acumulación mayor de β -Catenina, que se mantiene al día 68 en donde

observamos un aumento considerable en la expresión de β -Catenina que se transloca de la membrana celular al citoplasma o núcleo (**Figura 20**).

Los animales del grupo STAT6^{-/-} AOM resultaron negativos para la expresión de β -Catenina en cada uno de los ciclos de administración de AOM/DSS.

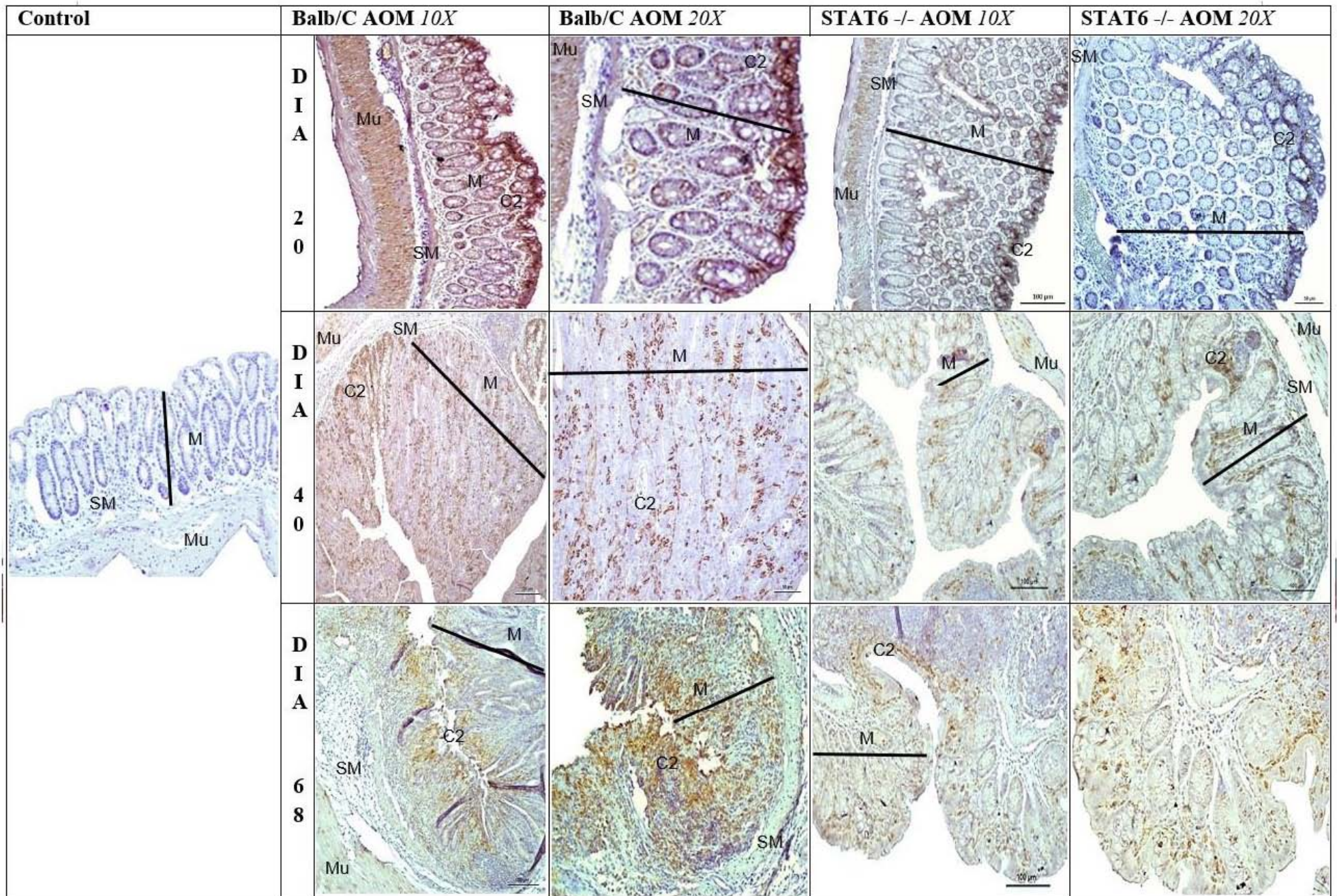


Figura 18. Inmunohistoquímica donde se muestra la expresión de COX-2 en CCR donde se tiñe de café. Se observa que en el grupo BALB/c AOM presenta una expresión mayor en contraste con el grupo STAT6^{-/-}. Mucosa (M) y en ella las criptas aberrantes (C), la submucosa (SM) y la capa muscular (Mu) COX-2 (C2).

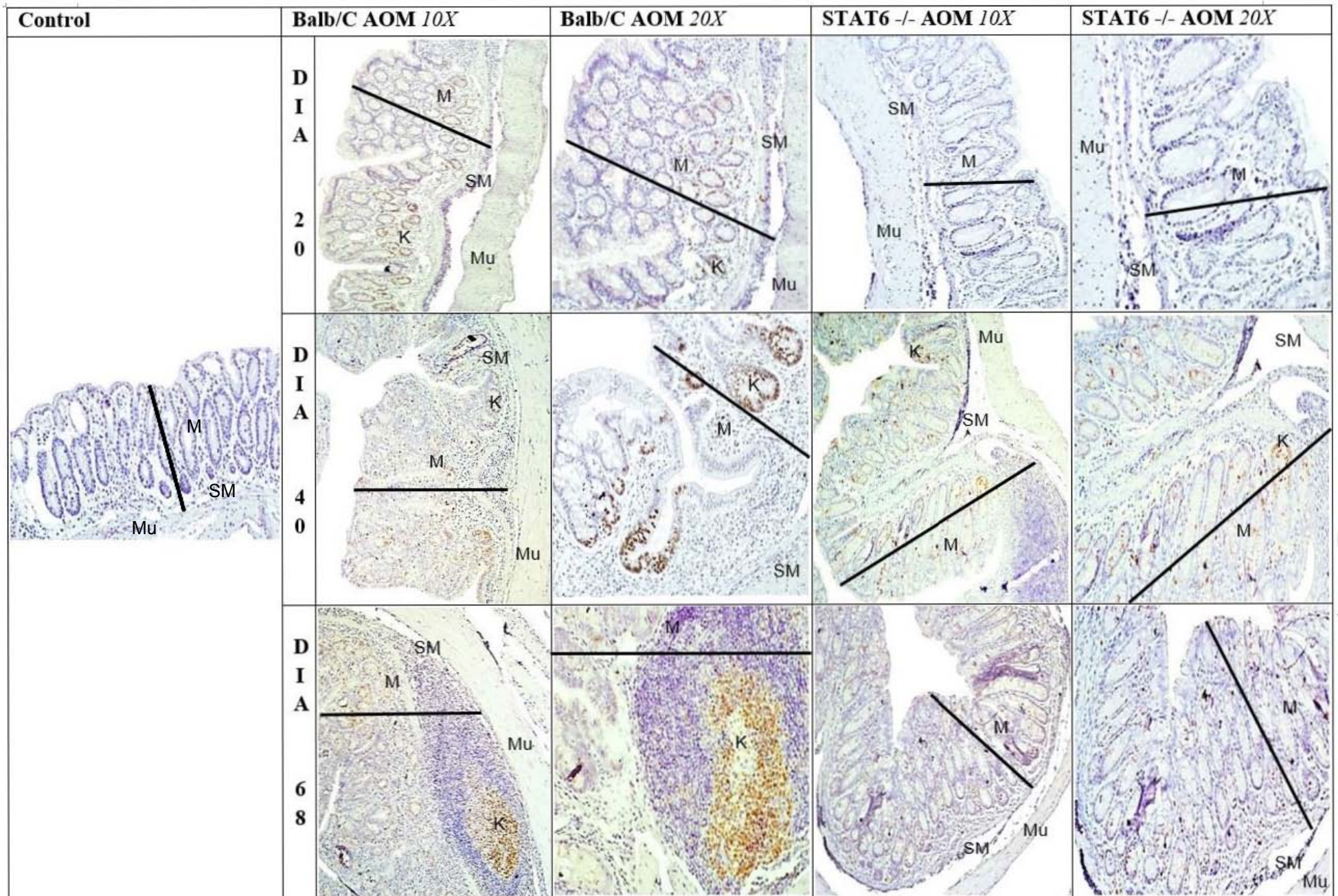


Figura 19. Inmunohistoquímica donde se muestra la expresión de Ki67 en CCR donde se tiñe de [cafecafé](#). Se observa que en el grupo BALB/c AOM presenta una expresión mayor en contraste con el grupo STAT6^{-/-}. Mucosa (M) y en ella las criptas aberrantes (C), la submucosa (SM) y la capa muscular (Mu) Ki67 (K).

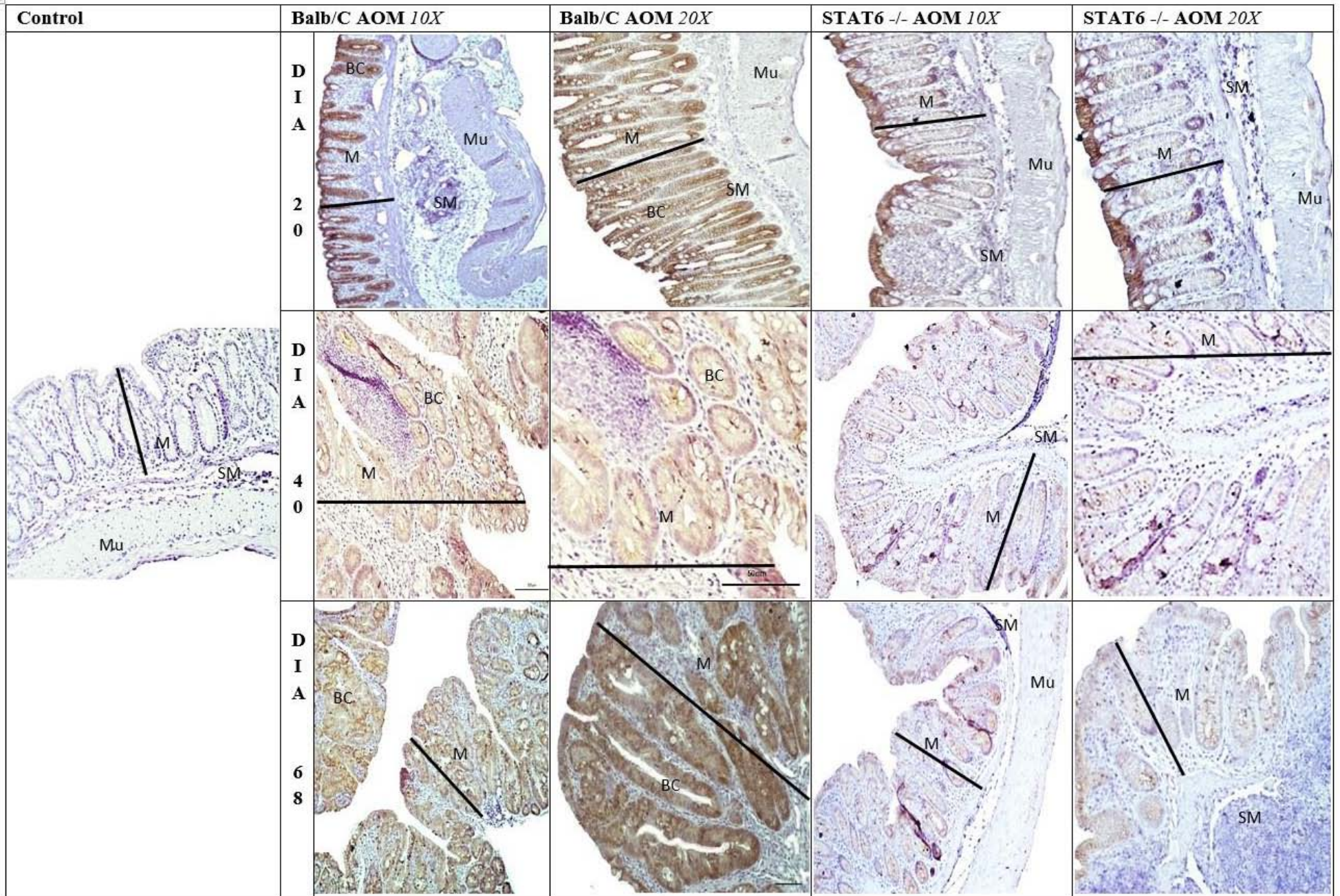


Figura 20. Inmunohistoquímica donde se muestra la expresión de β -Catenina en CCR donde se tiñe de café. Se observa que en el grupo BALB/c AOM hay un marcaje positivo, considerable, mientras que en el grupo STAT6^{-/-}-AOM el marcaje permanece negativo o ligero. Se observa la mucosa (M) y en ella las criptas aberrantes (C), la submucosa (SM) y la capa muscular (Mu) β -Catenina (BC).

8.10. Análisis en los cambios y la expresión de citocinas

Al término de cada ciclo de administración de DSS, se analizó el nivel de expresión de las citocinas a nivel de RNAm presentes en el intestino, para obtener el perfil de citocinas circulantes en todos los grupos. Se midieron las citocinas proinflamatorias TNF- α , IFN- γ , IL-17 e IL-6; y la citocina antiinflamatoria IL-10.

En la figura 19, se observan los cambios en la expresión de las citocinas en los diferentes grupos y a diferentes tiempos. Como se ha reportado con anterioridad, el grupo de animales BALB/c AOM presentó un incremento en la expresión de TNF- α a lo largo del tratamiento. Además, la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-6 e IL-17, se incrementaron al inicio de la inducción del CAC (20 días). Sin embargo, no se observaron diferencias importantes en la expresión de IFN- γ e IL-10 en este grupo respecto a los animales control.

Por el contrario, aunque el grupo de animales STAT6^{-/-}-AOM presentó un aumento en la expresión de TNF- α a lo largo del tratamiento, este cambio fue menor al observado en el grupo BALB/c AOM. Al analizar IL-6 en el grupo STAT6^{-/-}-AOM, se determinó un incremento en la expresión de esta citocina a partir del día 20 del tratamiento y se elevó aún más en el día 68. Vale la pena resaltar que en este mismo grupo de animales, la expresión de IL-17 disminuyó a menos de la mitad respecto al grupo control a lo largo de todo el tratamiento. Por el contrario, la expresión de IL-10, una citocina reconocida por su acción antiinflamatoria, se sobreexpresó de manera significativa al día 68 únicamente en el grupo STAT6^{-/-}-AOM, mientras que los animales BALB/c AOM no presentaron cambios.

Finalmente, los niveles de expresión de IFN- γ no presentaron cambios significativos en ninguno de los grupos, durante todo el tratamiento (**Figura 21**).

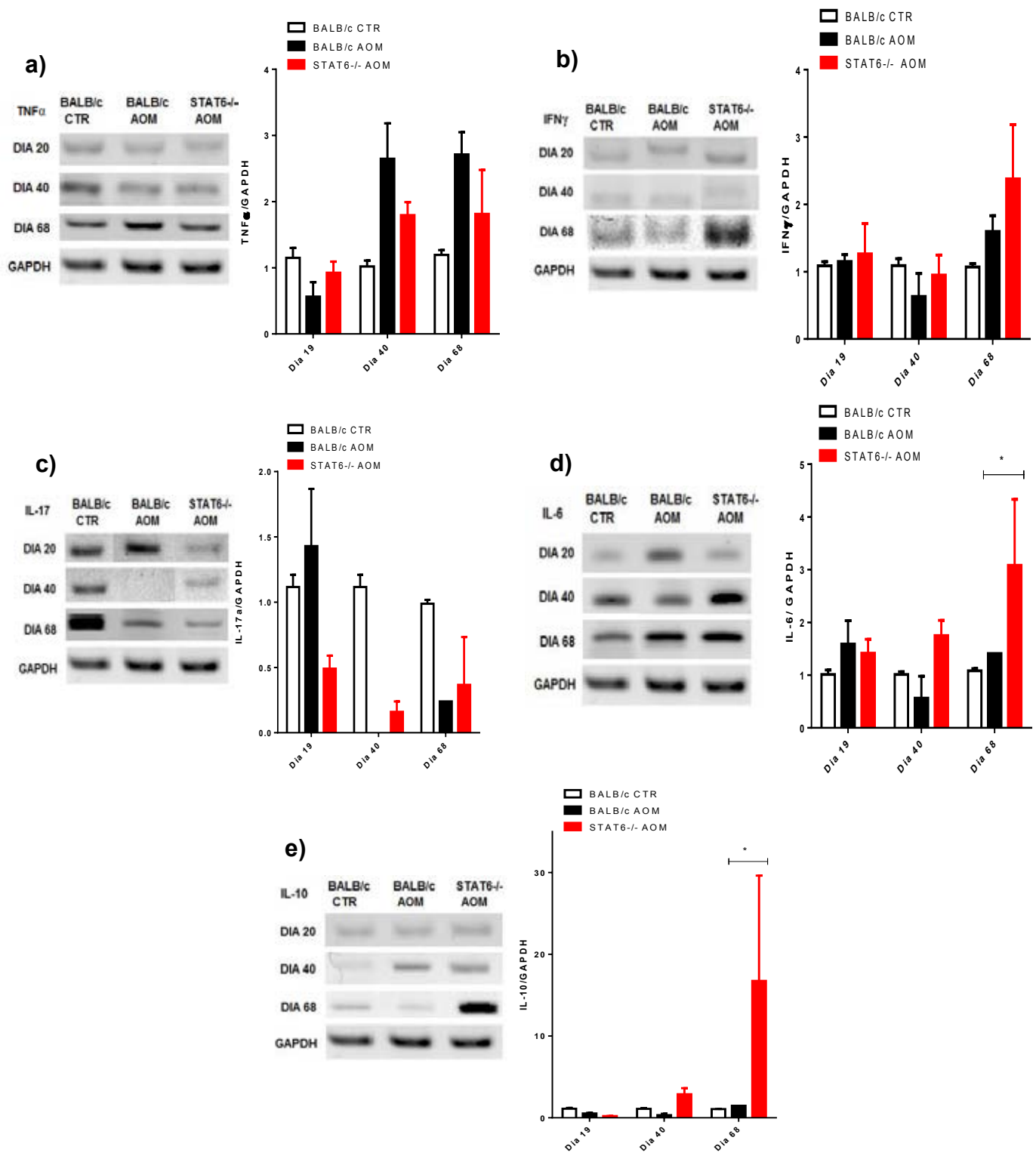


Figura 21. Cambios en la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF, IFN, IL-17) y antiinflamatorias (IL-6, IL-10) en los grupos BALB/c AOM y STAT6 $^{-/-}$ AOM. Los datos corresponden a 6 animales por grupo y representan el promedio \pm DS. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Se muestran resultados obtenidos de tres experimentos independientes.

8.11. Apoptosis

Al término de cada ciclo de administración de DSS se realizó un ensayo de TUNEL para medir el nivel de apoptosis existente en las células del colon. Al día 20 de este ensayo se observó un aumento significativo en la apoptosis de ambos grupos: STAT6^{-/-} AOM y BALB/c AOM, ya que ambos presentaron niveles elevados de apoptosis con diferencias significativas, esto es con respecto al grupo control. Sin embargo, el grupo STAT6^{-/-} AOM presentó un aumento significativo en la fluorescencia relativa respecto al grupo control y BALB/c AOM, sugiriendo un número mayor de células que se encuentran en proceso de apoptosis.

No obstante, el incremento en la apoptosis el colon del grupo STAT6^{-/-} AOM al parecer solo ocurre después del primer ciclo (día 20) ya que después no se observaron cambios en estos niveles o incluso llegaron a ser menores que en el grupo control (**Figura 22**).

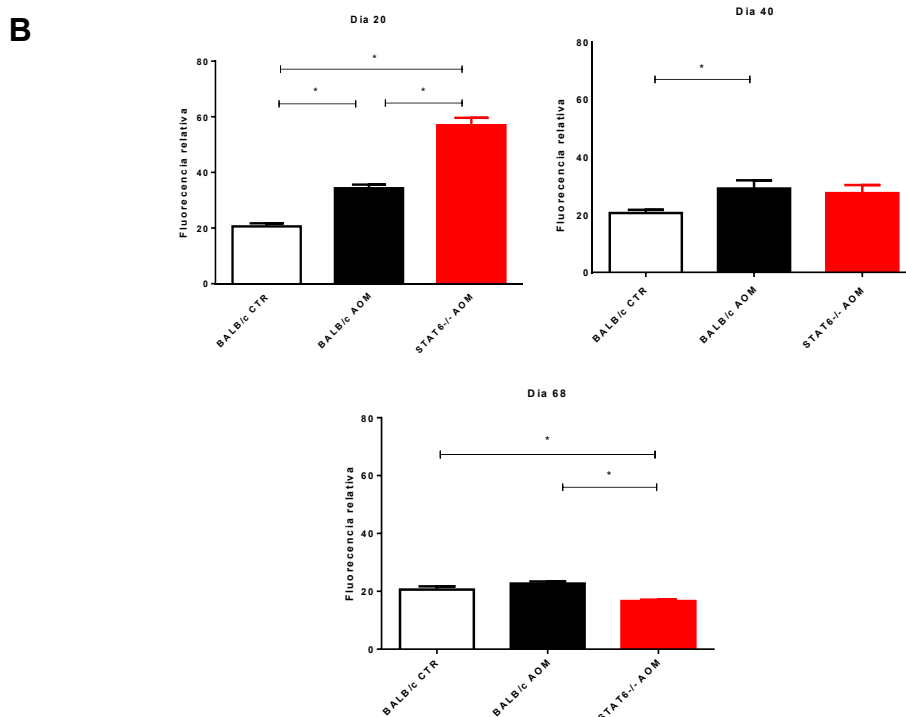
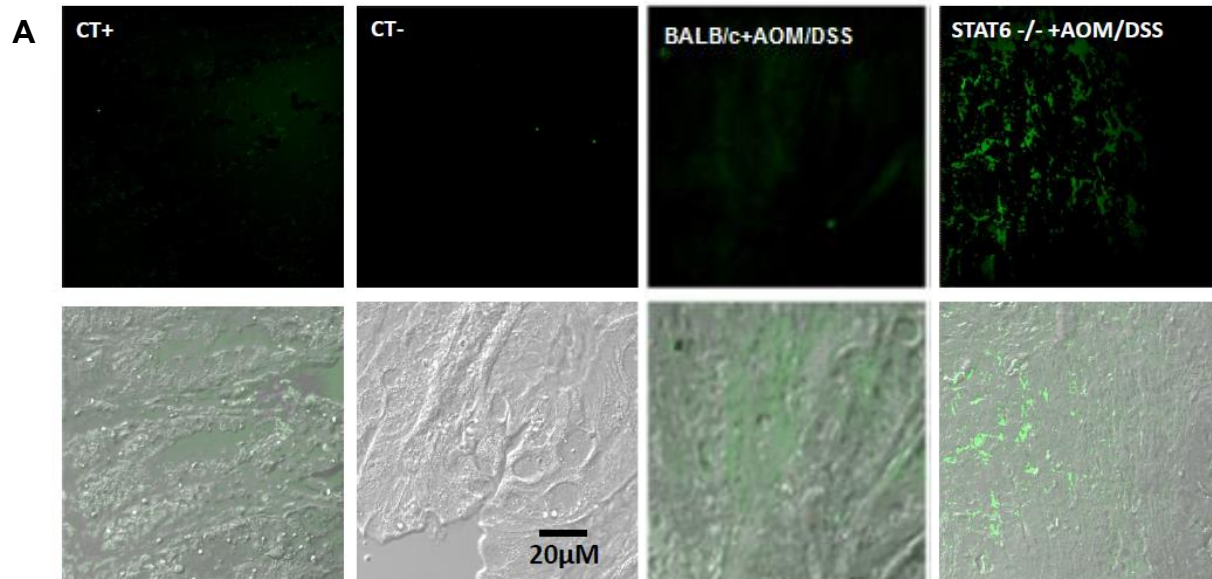


Figura 22. Ensayo de apoptosis por TUNEL de los grupos BALB/c Control, BALB/c AOM y STAT6^{-/-} AOM durante todo el tratamiento de AOM/DSS. Los datos corresponden a 6 animales por grupo y representan el promedio \pm DS. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$. Se muestran resultados obtenidos de tres experimentos independientes.

9. Discusión

Se ha reportado que STAT6, se encuentra sobre expresado en varios tipos de cáncer como el de próstata (Ni Z, Lou W et al. 2002), de mama (Li, Yang et al. 2008) y el linfoma de Hodgkin (Skinnider BF, Elia AJ et al. 2002), asimismo, que los ratones deficientes en este gen mejoran la inmunidad ante el crecimiento de tumores primarios (Ostrand-Rosenberg S, Grusby MJ et al. 2000).

EN este trabajo utilizamos el modelo de cáncer de colon asociado a colitis inducido por AOM y DSS, se demostró que el 70% de los animales con una deficiencia en STAT6 no desarrollan tumores. Además, el 30% restante desarrolla tumores pequeños (<2 mm) en comparación a los animales control. La disminución en el número y en el tamaño de los tumores en los ratones STAT6^{-/-}, se correlacionó positivamente en la apoptosis durante las fases tempranas de administración del tratamiento y negativamente en la expresión de los marcadores β -Catenina, Cox2 y proliferación medida por Ki67.

Varios estudios sugieren que las citocinas IL-4, IL-13 y el receptor IL-4R α pueden estar involucrados en funciones de proliferación, supervivencia y actividades promigratorias en varios tipos de cáncer (Hull, Ingram et al. 2013). La mayoría de estos estudios se han realizado en líneas celulares, en animales deficientes en IL-4 o en el receptor IL-4R α indicando que esta vía de señalización es un componente importante que contribuye a la formación de tumores (Li, Yang et al. 2008). Sin embargo, estos estudios presentan ciertas dificultades ya que una deficiencia en IL-4 e IL-4R α descarta la señalización por STAT6 a través de otra vía. Esta vía podría estar activándose alternamente mediante IL-13R α 2 o por factores como IL-15, platelet-derived growth factor (PDGF) que es un mitógeno e IL-3, que pueden activar de manera alterna a STAT6, activando a su vez la transcripción de genes que pueden estar involucrados en el desarrollo tumoral. Por lo tanto, resulta importante evaluar el papel de STAT6 en el desarrollo del cáncer colorrectal.

Así, durante el curso de los experimentos se observaron a los ratones con el modelo AOM/DSS, esto con el fin de comprobar si el protocolo de inducción de cáncer colorrectal funcionaba y para llevar un control del estado de cada animal; para esto se realizó un seguimiento de los signos asociados al CAC y el estado físico de los ratones durante todas las semanas que duró el tratamiento. Como se muestra en los resultados, desde el día 20 los

ratones BALB/c tratados con DSS, presentaron una manifestación de la colitis, esto significa que presentaron una disminución en la ganancia del peso corporal, diarrea, sangre en las heces y piloerección.

La disminución en la ganancia del peso probablemente estuvo relacionada con la diarrea presente en estos animales. Cuando existe un daño o inflamación en el colon, líquidos no se reabsorben, lo que se refleja en una baja absorción de nutrientes que finalmente, culmina en una pérdida del peso.

El daño y la inflamación en el colon, se asoció con la actividad del DSS administrado, el DSS tiene la capacidad para afectar la arquitectura de la pared intestinal causando lesiones y sangrado rectal. El primer informe sobre el uso de DSS se remonta al año 1985, cuando Ohkusa et al. (1985) publicó su investigación sobre la colitis inducida por DSS en hámsters, demostrando que el DSS tiene una gran facilidad para penetrar la mucosa del intestino, lo que causa un deterioro en la barrera epitelial.

Se ha demostrado, por ejemplo, que daños en la pared intestinal y alteraciones en la microflora están implicados en la patogénesis de la colitis inducida por DSS en ratones y por lo tanto también en el CAC. Hudcovic et al. (2001) señaló el papel de la microflora y la inmunidad innata en la inflamación intestinal, utilizando un tratamiento de DSS en ratones BALB/c, estos animales mostraron una pérdida completa de la superficie del epitelio y una infiltración severa de células inflamatorias, explicando que la presencia de la microflora facilita la inflamación inducida por DSS.

Estas evidencias coinciden con lo registrado en este estudio, ya que durante los días 40 y 68 del tratamiento, los ratones BALB/c pierden peso corporal y tienen un índice mayor de la actividad global de la enfermedad.

Por el contrario, los animales deficientes en STAT6, no mostraron estos signos y no presentaron cambios relacionados a daños asociados al CAC. Esto concuerda con lo reportado por Rosen et al. (2011) donde demostró que la UC se asocia con una mayor activación de STAT6 y que gracias al suberoilánilida ácido hidroxámico (SAHA) que es un inhibidor de STAT6, demostraron que protege a las células epiteliales de colon y la disfunción de la barrera epitelial.

Estos datos sugieren que la presencia de STAT6, podría tener un efecto en el mantenimiento de la barrera epitelial del colon. Una vez valorado el daño asociado a la enfermedad en cada grupo de ratones, fue necesario comprobar si efectivamente, los daños observados durante todo el tratamiento de AOM/DSS eran resultado de un desarrollo de CAC, para eso fue necesario saber si los animales que estaban bajo la administración del DSS presentaban desarrollo tumoral durante cada uno de los ciclos, por ello se realizaron disecciones de cada uno de los animales por grupo a diferentes tiempos con el fin de observar la progresión del daño del CAC. Los animales del grupo BALB/c AOM presentaron numerosos adenocarcinomas de diferente tamaño en toda la región media-distal del colon.

El estudio histológico del colon de los ratones BALB/c AOM reveló que desde etapas muy tempranas de CAC existe un aumento en el infiltrado inflamatorio en la mucosa del intestino, así como lesiones que aumentan de manera gradual hasta la alteración de la estructura epitelial, la pérdida de las criptas y la disminución de las células caliciformes. El conjunto de todos estos factores dan como resultado la formación de tumores polipoides bien formados y numerosas figuras mitóticas que corresponden con adenocarcinomas bien diferenciados. Se ha reportado, que esta inflamación puede deberse a la infiltración masiva de células del sistema inmune en la submucosa y mucosa del colon, que desencadena su engrosamiento y la pérdida de la estructura de las criptas (Perse and Cerar 2012).

Por otro lado, se registró el peso del intestino obtenido desde el ciego hasta el recto, que en comparación con el grupo control, tuvo una variación de 0.5 a 0.7 gr más, esto es probablemente debido al desarrollo de tumores.

Al analizar la presencia de tumores en el grupo STAT6 AOM, se encontró que estos animales no presentaban desarrollo tumoral en las etapas tempranas de inducción del tratamiento de AOM/DSS. Solo hasta el día 68 del tratamiento un par de animales del grupo presentaron pocos tumores en comparación con el grupo BALB/c AOM, mientras que el resto de los animales del grupo estaban libres de tumores en todo el colon. No se observó daño macroscópico o alteraciones patológicas evidentes; esto se comprobó por medio de histología en el colon. La estructura del colon se mantiene y el número y distribución de las células caliciformes permanece constante; también, se registró el peso

del intestino obtenido desde el ciego hasta el recto, que comparado con el grupo control, no presentaba diferencias significativas, esto es probablemente porque no hubo un desarrollo de tumores, y en cuanto a los ratones en los que si se encontraron tumores, estos tumores eran de tamaño muy pequeño en comparación a los tumores encontrados en el grupo BALB/c AOM.

Esto nos indica que la presencia de STAT6 podría estar jugando un papel en el desarrollo y progresión tumoral en el colon de los ratones durante el tratamiento de AOM/DSS. Sin embargo, aún no existen reportes que expliquen los mecanismos por los cuales STAT6 favorecería el desarrollo tumoral.

Mediante la técnica de RT-PCR se midió la expresión de las citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-17 α , IL-10 e IL-6 en el colon y se encontró que en comparación con el grupo control, los ratones BALB/c AOM expresaron niveles más elevados de TNF- α que se conoce por ser una citocina mediadora de la inflamación y funciones de respuesta inmune ya que su producción es esencial para la diferenciación de la respuesta Th1; también es un potente activador de la vía de NF κ B, que como se sabe está fuertemente vinculado a la progresión del cáncer e induce diversos efectos proinflamatorios que son los precursores inmediatos de la fisiopatología de la UC (N, S et al. 2011). TNF α se produce durante la respuesta inflamatoria inicial favoreciendo la producción de otras citocinas y quimiocinas, que pueden aumentar la permeabilidad vascular que conduce al reclutamiento de leucocitos activados en el sitio de la lesión (Kruglov, Kuchmiy et al. 2008). Estas propiedades hacen de TNF- α un promotor de la inflamación, angiogénesis, necrosis y propagación del tumor; por lo que se considera como un factor de promoción tumoral.

Por otra parte, se ha reportado que el IFN- γ también tiene una función proinflamatoria, sin embargo nuestros resultados no muestran un aumento en su expresión, esto puede ser debido a que el DSS rompe el balance de la respuesta inmune Th1/Th2 y ocasiona disminución de IFN- γ en la mucosa del colon (Peng, LI et al. 2013).

De la misma forma los niveles de expresión de IL-17 solo se incrementaron durante el primer ciclo de DSS en los animales BALB/c, Hyun et al. (2012), demostró que la IL-17 α se asocia con la fase de iniciación del tumor en el desarrollo de CAC, lo que explica la elevada expresión al primer ciclo y su disminución en ciclos posteriores (Hyun, Han et al.

2012). En el presente estudio no se pudo detectar la expresión de IL-10 en los animales BALB/c, lo que puede deberse a que la sobreexpresión de TNF- α promueve la constante activación de la vía de señalización de MYD88 que regula negativamente el proceso de transcripción en este caso de IL-10 (Hoshi, Schenten et al. 2012).

Por su parte, encontramos que los ratones deficientes en STAT6 no mostraron una sobreexpresión de TNF- α , IFN- γ o IL-17 α , lo que sugiere que probablemente no se está desarrollando un ambiente proinflamatorio de tipo Th1. El incremento en la expresión de la citocinas antiinflamatorias IL-10 al día 68 en los animales deficientes en STAT6 sugiere que esta citocina podría inhibir la liberación de citocinas proinflamatorias y mantener en buen estado la mucosa del colon para regular los procesos inflamatorios (Gooch, Christy et al. 2002). En este sentido hay evidencias de modelos experimentales que sugieren que la IL-10 es importante en la regulación inmune ya que tiene la capacidad de bloquear la diferenciación de Th1. En un modelo de colitis inducida en ratones deficientes en IL-10, estos desarrollaron espontáneamente inflamación severa en el colon (Tarjan and Karp 2005). Esto es consistente con las propiedades antiinflamatorias de esta citocina y con los resultados de este trabajo, por lo que se puede suponer que niveles elevados de IL-10 pueden tener un efecto inhibitor del proceso inflamatorio asociado a CAC.

De igual forma, la citocina IL-6 también tiene una mayor expresión en ratones STAT6-/- AOM comparada con el grupo control al día 68. Esta citocina es multifuncional, ya que por un lado es un potente estimulador de la proliferación de células de cáncer de colon y del crecimiento tumoral, y por el otro tiene un papel diferente: el de proteger el tejido de la mucosa gastrointestinal y tejido de regeneración después de una lesión, también es importante para la vía de STAT3 que tiene la función de proteger al epitelio intestinal y estimular su regeneración (Grivennikov, Karin et al. 2009).

En resumen la ausencia de STAT6 puede estar inhibiendo la polarización de la respuesta proinflamatoria Th1 mediante la actividad de citocinas como IL-6 o IL-10 y por ello podría regular a su vez la progresión tumoral inhibiendo el desarrollo de CAC. Sin embargo, es importante señalar que este perfil de citocinas es parcial ya que es necesario evaluar también las poblaciones celulares implicadas que pudieran estar secretando estas citocinas en ausencia de una respuesta Th2.

La vía de señalización de STAT6^{-/-} posee otros mecanismos además de las citocinas que podrían estar participando en la regulación del desarrollo tumoral en CAC, como son los procesos apoptóticos y de proliferación, y de la cual se sabe que están involucrados con la progresión de CAC. Dados los antecedentes se identificaron diferentes moléculas mediante una técnica de inmunohistoquímica, como Cox-2, β -Catenina y Ki-67.

COX-2 cataliza la conversión del ácido araquidónico en prostaglandina H₂ libre, el precursor de otras prostaglandinas y tromboxanos. Estos compuestos son fundamentales en la regulación de la proliferación celular, la angiogénesis, la función inmune y la inflamación, que pueden contribuir al desarrollo y la progresión de neoplasias (Chandrasekharan NV and DL 2004).

La expresión de Cox-2 se ha asociado con diversas lesiones premalignas y malignas de origen epitelial, en particular en los órganos del tracto gastrointestinal; su expresión puede estar influenciada por estímulos pro-inflamatorias y mitogénicos como las citocinas y factores de crecimiento (Chandrasekharan NV, Dai H et al. 2002).

Esto coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, en el que la expresión de Cox-2 se eleva de manera gradual durante cada ciclo de administración de AOM/DSS, su activación puede deberse a la alta expresión de TNF α en los ratones del grupo BALB/c AOM. Ristimäki et al. (2002), demostró que la expresión elevada de Cox-2 en cáncer está asociada con un incremento en el tamaño de los tumores, así como un alto grado histológico, una alta expresión de p53 y metástasis, lo que nos indica que en ratones BALB/c AOM Cox-2 está participando en el crecimiento tumoral, ya que contribuye a la transformación neoplásica y al comportamiento maligno de un tumor, aumentando su capacidad invasiva.

Por otro lado, como se muestra en los resultados, al comparar la expresión de Cox-2 en el grupo BALB/c AOM con el grupo STAT6^{-/-} AOM estos últimos presentaron una disminución en la expresión de este marcador. Esto puede deberse a que en estos animales no existe un daño particular en mucosa del intestino, así mismo, como se mencionó anteriormente, los niveles de las citocinas proinflamatorias se mantienen sin cambios aparentes.

Por otra parte Ristimäki también describe que la expresión de Cox-2 está relacionada con una alta expresión de Ki67, que es una proteína asociada con la proliferación celular y la transcripción de RNA ribosomal. Los resultados obtenidos en este trabajo se correlacionan con esto ya que el marcaje de Ki67 en los ratones BALB/c AOM, sugieren que en este grupo hay una mayor proliferación celular, los datos aquí mostrados, solo dan una idea de la proliferación celular, no indican de manera cuantitativa el progreso de la misma, por lo que podemos suponer solamente que en los ratones BALB/c existe un aumento en la expresión de genes relacionados con la proliferación, lo que induce a un crecimiento descontrolado del tumor inducido con el tratamiento de AOM/DSS en CAC.

Por el contrario, en el grupo STAT6^{-/-} AOM no se muestra un cambio característico en el marcaje de Ki67, si no que se mantiene de manera constante, lo que se explica por el nivel de proliferación normal presente en el intestino, esto está en acuerdo con los resultados discutidos anteriormente, donde los ratones del grupo STAT6^{-/-}AOM se mantienen en condiciones normales durante todo el tratamiento.

β -Catenina está regulado por la proteína poliposis adenomatosa coli (APC) que es un gen supresor de tumor y por lo tanto la mutación genética del gen APC está estrechamente relacionada con el cáncer colorrectal. En el análisis de inmunohistoquímica para β -Catenina, se reveló que a partir del segundo ciclo se generan células displásicas y una acumulación de β -Catenina; se observó también una translocación de β -Catenina de la membrana celular al citoplasma o núcleo en todas las neoplasias. Se ha demostrado que la pérdida de la función de APC en el tejido colorrectal desencadena una serie de cambios histológicos moleculares y que permiten la expansión clonal de las células neoplásicas, generando inestabilidad genética (Fodde 2002), lo que podría explicar la presencia y desarrollo de pólipos en el intestino grueso o colon de los ratones de este grupo. Se sabe que la disminución en la expresión de APC es suficiente para mantener activa a β -Catenina (Volochnanenko, Erdmann et al. 2013).

Existen diferentes modelos murinos en donde evaluaron mutaciones en APC y en ellos se observó que en algunos animales se indujo el desarrollo de gran cantidad de adenomas en el intestino delgado y disminuciones significativas en el tiempo de vida (Kucherlapati, Yang et al. 2013).

Al contrario de lo observado en los animales del grupo BALB/c, los ratones del grupo STAT6^{-/-} AOM resultaron negativos para la expresión de β -Catenina, esto puede significar que no se están desarrollando mutaciones que afecten a la actividad del gen APC, lo que induce que su actividad supresora del tumor se mantenga estable y funcional, esto ayuda en la protección del colon frente al tratamiento de DSS/AOM al desarrollo de pólipos colorrectales.

Sin embargo, es necesario profundizar en la explicación de estos procesos ya que la actividad de STAT6 no solo se limita a estos mecanismos que son necesarios para la iniciación, progresión y desarrollo de CAC, si no que el nivel de compromiso de este gen podría estar relacionado con funciones río abajo en estas vías, por lo que es necesario explicar que poblaciones y señalizaciones se ven afectadas cuando se expresa o no STAT6.

En concordancia con los hallazgos anteriores, se sabe que existen mecanismos implicados que están involucrados en el desarrollo de CAC. Se ha demostrado que STAT6 juega un papel en la resistencia a la apoptosis y transformación de células. Estas observaciones coinciden con nuestros resultados obtenidos mediante un ensayo de TUNEL. Esta técnica reveló que las células del colon de los ratones STAT6^{-/-} AOM son susceptibles a la apoptosis temprana, ya que en el primer ciclo de inducción del tratamiento con AOM/DSS se observó un mayor número de células apoptóticas en este tejido. Por el contrario, en los ratones del grupo BALB/c no se observó un aumento considerable en el número de células apoptóticas. Esto nos habla de que durante el proceso de inducción de CAC, las células entran a apoptosis, como normalmente se ha reportado en distintos tipos de cáncer, y que aunque este proceso se mantiene constante, no es suficiente para frenar la progresión del crecimiento tumoral.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Li (2008) donde analizaron el estado de la activación de la vía de STAT6 en relación con la resistencia o susceptibilidad de las células de cáncer de colon a la apoptosis y la metástasis, por medio de líneas celulares de cáncer de mama con un fenotipo activo de STAT6 (STAT6^{high}) HT-29 y un fenotipo defectuoso de STAT6 (STAT6^{null}) Caco-2, y encontraron que en la línea celular STAT6^{null} aumenta la muerte celular apoptótica pero disminuye la metástasis en contraste con la línea HT-29, en donde se presenta a la inversa (Li, Yang et al. 2008).

La actividad de STAT6 podría inducir la expresión de diversos genes que juegan un papel importante en la diferenciación celular y la apoptosis, entre otros. Por lo que los ratones que carecen de STAT6 manifiestan inmunidad tumoral mejorada para carcinomas colorrectales primarios.

En resumen, STAT6 puede estar involucrado en el desarrollo del CAC, ya que en su ausencia se previene el crecimiento tumoral, lo cual podría estar relacionado con una menor expresión de citocinas proinflamatorias y marcadores relacionados con el progreso tumoral como beta-catenina y COX2 , además de un aumento en la apoptosis a nivel del colon.

10. Conclusiones

- Durante la inducción del CAC los ratones deficientes de STAT6 presentaron una disminución en los signos relacionados con la enfermedad en comparación con los animales BALB/c.
- El 100% de los animales BALB/c AOM desarrolló tumores al día 68 después del inicio del tratamiento, por el contrario, en los animales deficientes de STAT6 el 70% estaban libres de tumores.
- Al finalizar el tratamiento los ratones BALB/c presentaron destrucción de la arquitectura epitelial, infiltrado inflamatorio, formación de criptas aberrantes y una disminución en el número de las células caliciformes. Los animales STAT6 -/-AOM mantuvieron la arquitectura epitelial, presentando un escaso infiltrado inflamatorio, y no se observó una disminución en el número de células caliciformes.
- En los animales BALB/c AOM, hay una mayor expresión en el colon de β -Catenina, así como una translocación hacia el núcleo, también presentan una mayor expresión de Cox-2 y de la proliferación medida por Ki67. Por su parte los animales STAT6-/- AOM no presentaron cambios en la expresión de β -Catenina, Cox-2 o un incremento en la proliferación.
- Los animales STAT6-/-AOM no presentaron cambios en la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IFN- γ e IL-17 α , sin embargo se presentó un incremento en las citocinas IL-6 e IL-10 a diferencia del grupo BALB/c donde se presentó una sobre expresión de citocinas proinflamatorias.
- La deficiencia de STAT6 ocasiona un aumento en la actividad apoptótica en las células de colon.

11.Literatura citada

1. Akimoto, T., F. Numata, et al. (1998). "Abrogation of Bronchial Eosinophilic Inflammation and Airway Hyperreactivity in Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)6-deficient Mice." The Journal of Experimental Medicine 187(9): 1537-1542.
2. Becker, C., M. C. Fantini, et al. (2004). "TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling." Immunity 21(4): 491-501.
3. Binfeng Lu, Martin Reichel, et al. (1997). "Identification of a STAT6 Domain Required for IL-4 Induced Activation of Transcription.pdf." The journal of Immunology 159: 10.
4. Coffelt, S. B., C. E. Lewis, et al. (2010). "Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors." Am J Pathol 176(4): 1564-1576.
5. Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature 420(6917): 860-867.
6. Chandrasekharan NV, Dai H, et al. (2002). "COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression." Proc Natl Acad Sci 99: 5.
7. Chandrasekharan NV and S. DL (2004). "The cyclooxygenases." Genome Biol 5(241): 6.
8. Cho KR and V. B. (1992). "Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence." Cancer
9. Dae-Sung, L., J. Won-Kyo, et al. (2013). "Ixeris dentata NAKAI Reduces Clinical Score and HIF-1 Expression in Experimental Colitis in Mice." Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013: 9.
10. DeNardo, D. G., P. Andreu, et al. (2010). "Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity." Cancer Metastasis Rev 29(2): 309-316.
11. Dutta, P. and W. X. Li (2001). Role of the JAK-STAT Signalling Pathway in Cancer. eLS, John Wiley & Sons, Ltd.

12. Eaden, J., K. Abrams, et al. (2001). "The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis." Gut 48(4): 526-535.
13. Fenton, J. I., S. D. Hursting, et al. (2006). "Interleukin-6 production induced by leptin treatment promotes cell proliferation in an Apc (Min/+) colon epithelial cell line." Carcinogenesis 27(7): 1507-1515.
14. Fodde, R. (2002). "The APC gene in colorectal cancer." Cancer 38(19): 4.
15. Foersch, S. and M. F. Neurath (2014). "Colitis-associated neoplasia: molecular basis and clinical translation." Cell Mol Life Sci 71(18): 3523-3535.
16. Globocan. (2012). "Estimate Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012." Retrieved December 22, 2014, from <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
17. Gooch, J. L., B. Christy, et al. (2002). "Mediates Interleukin-4 Growth Inhibition in Human Breast Cancer Cells." Neoplasia 4(4): 7.
18. Grivennikov, S., E. Karin, et al. (2009). "IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer." Cancer Cell 15(2): 103-113.
19. Grivennikov, S. I., F. R. Greten, et al. (2010). "Immunity, inflammation, and cancer." Cell 140(6): 883-899.
20. Gupta RA and D. RN. (2001). "Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2." Nat Rev Cancer 1(1): 10.
21. Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell 144(5): 646-674.
22. Hebenstreit, D., G. Wirnsberger, et al. (2006). "Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6." Cytokine Growth Factor Rev 17(3): 173-188.
23. Homann D, Holz A, et al. (1999). "Autoreactive CD41 T Cells Protect from Autoimmune Diabetes via Bystander Suppression Using the IL-4 Stat6 Pathway." Immunity 11(4): 10.
24. Hoshi, N., D. Schenten, et al. (2012). "My88 signalling in colonic mononuclear phagocytes drives colitis in IL-10 deficient mice." Nat Commun 3.
25. Hull, M. A., N. Ingram, et al. (2013). "Reduced type II interleukin-4 receptor signalling drives initiation, but not progression, of colorectal carcinogenesis:

- evidence from transgenic mouse models and human case-control epidemiological observations." Carcinogenesis 34(10): 2341-2349.
26. Hyun, Y. S., D. S. Han, et al. (2012). "Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer." Carcinogenesis 33(4): 931-936.
27. J Hou, U Schindler, et al. (1994). "An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat." Science 265(5179): 6.
28. Kabátková M, Zapletal O, et al. (2015). "Inhibition of β -catenin signalling promotes DNA damage elicited by benzo[a]pyrene in a model of human colon cancer cells via CYP1 deregulation." Mutagenesis.
29. Kaplan, M. H., U. Schindler, et al. (1996). "Stat6 Is Required for Mediating Responses to IL-4 and for the Development of Th2 Cells." Immunity 4(3): 313-319.
30. Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from Hereditary Colorectal Cancer." Cell 87(2): 159-170.
31. Kruglov, A. A., A. Kuchmiy, et al. (2008). "Physiological functions of tumor necrosis factor and the consequences of its pathologic overexpression or blockade: mouse models." Cytokine Growth Factor Rev 19(3-4): 231-244.
32. Kucherlapati, M. H., . , K. Yang, et al. (2013). "Loss of Rb1 in the gastrointestinal tract of Apc1638N mice promotes tumors of the cecum and proximal colon." Proc Natl Acad Sci 105(200): 5.
33. Lakatos and Peter-Laszlo (2008). "Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: Changes, causes and management strategies." World Journal of Gastroenterology 14(25): 3937.
34. Li, B. H., X. Z. Yang, et al. (2008). "IL-4/Stat6 activities correlate with apoptosis and metastasis in colon cancer cells." Biochem Biophys Res Commun 369(2): 554-560.
35. Linehan, L. A., W. D. Warren, et al. (1998). "STAT6 Is Required for IL-4-Induced Germline Ig Gene Transcription and Switch Recombination." The journal of Immunology 161(1): 8.
36. Lu Y, Zhou J, et al. (2008). "JAK STAT and PI3K AKT Pathways Form a Mutual Transactivation Loop and Afford Resistance to Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Cardiomyocytes." Cell Physiol Biochem 21(4): 10.

37. Mantovani, A., P. Allavena, et al. (2008). "Cancer-related inflammation." Nature 454(7203): 436-444.
38. Mikita T, Campbell D, et al. (1996). "Requirements for Interleukin-4-Induced Gene Expression and Functional Characterization of Stat6." Mol Cell Biol 16(10): 10.
39. Morin PJ, Sparks AB, et al. (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." Science 21(275): 8.
40. N, M., S. S, et al. (2011). "Tumor Necrosis Factor (TNF) and Chemokines in Colitis-Associated Cancer." Cancers 3(10): 16.
41. Ni Z, Lou W, et al. (2002). "Selective Activation of Members of the Signal Transducers and Activators of Transcription Family in Prostate Carcinoma." J Urol 167(4): 4.
42. Okayasu, I., M. Yamada, et al. (2002). "Dysplasia and Carcinoma Development in Experimental Colitis." Journal of Gastroenterology and Hepatology 17: 6.
43. Oshima CT, Iriya K, et al. (2005). "Ki-67 as a prognostic marker in colorectal cancer but not in gastric cancer." Neoplasma 52(5): 4.
44. Ostrand-Rosenberg S, Grusby MJ, et al. (2000). "STAT6-deficient mice have enhanced tumor immunity to primary and metastatic mammary carcinoma." J Immunol 165(11): 5.
45. Peng, X., X. LI, et al. (2013). "Expression of Th1/Th2 inflammatory cytokines in rat treatment model of ulcerative colitis." Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 38: 8.
46. Perse, M. and A. Cerar (2012). "Dextran Sodium Sulphate Colitis Mouse Model: Traps and Tricks." BioMed Research International 2012(89): 13.
47. Powell, S. M., N. Zilz, et al. (1992). "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis." Nature 359(6392): 235-237.
48. Qian, B. Z. and J. W. Pollard (2010). "Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis." Cell 141(1): 39-51.
49. Ristimäki A, Sivula A, et al. (2002). "Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer." Cancer Res 62(3): 632.
50. Rustgi, A. K. (2007). "The genetics of hereditary colon cancer." Genes Dev 21(20): 2525-2538.

51. Rutter, M. D., B. P. Saunders, et al. (2006). "Thirty-year analysis of a colonoscopic surveillance program for neoplasia in ulcerative colitis." Gastroenterology 130(4): 1030-1038.
52. Srabovici N, Mujagic Z, Mujanovic-Mustedanagic J, Muminovic Z, Softic A, Begic L. Interleukin 13 expression in the primary breast cancer tumour tissue. Biochem Med (Zagreb). 2011; 21:131–8.
53. Schindler, U., P. Wu, et al. (1995). "Components of a stat recognition code: Evidence for two layers of molecular selectivity." Immunity 2(6): 689-697.
54. Schroder AJ, Pavlidis P, et al. (2002). "Cutting Edge STAT6 Serves as a Positive and Negative Regulator of Gene Expression in IL-4- Stimulated B Lymphocytes." J Immunol 168(3): 4.
55. Shea-Donohue, T., A. Fasano, et al. (2010). "Enteric pathogens and gut function: Role of cytokines and STATs." Gut Microbes 1(5): 316-324.
56. Skinnider BF, Elia AJ, et al. (2002). "Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma." Blood 99(2): 9.
57. Slattery, M. L., A. Lundgreen, et al. (2013). "JAK/STAT/SOCS-signaling pathway and colon and rectal cancer." Mol Carcinog 52(2): 155-166.
58. Soetikno, R. M., O. S. Lin, et al. (2002). "Increased risk of colorectal neoplasia in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis: A meta-analysis." Gastrointestinal Endoscopy 56(1): 48-54.
59. Tanaka T, Kohno H, et al. (2003). "A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate." Cancer Sci 94(11): 9.
60. Tarjan, S. R. and C. L. Karp (2005). "Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis." Immunological Reviews 206: 296-305.
61. Tenesa, A. and M. G. Dunlop (2009). "New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies." Nat Rev Genet 10(6): 353-358.
62. Todaro M, Lombardo Y, Francipane MG, Alea MP, Cammareri P, Iovino F, et al. Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. Cell Death Differ. 2008; 15:762–72.

63. Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (2004). "Cancer genes and the pathways they control." Nat Med 10(8): 789-799.
64. Volochanenko, O., G. Erdmann, et al. (2013). "Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells." Nat. Commun. 4: 6.
65. Xiong H, Zhang ZG, et al. (2008). "Inhibition of JAK1, 2/STAT3 Signaling Induces Apoptosis, Cell Cycle Arrest, and Reduces Tumor Cell Invasion in Colorectal Cancer Cells." Neoplasia 10(3): 11.
66. Yuan, Q., P. D. Li, et al. (2009). "Differential IL-4/Stat6 activities correlate with differential expression of regulatory genes SOCS-1, SHP-1, and PP2A in colon cancer cells." J Cancer Res Clin Oncol 135(1): 131-140.