



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
LABORATORIO NACIONAL EN SALUD: DIAGNÓSTICO MOLECULAR Y
EFFECTO AMBIENTAL EN ENFERMEDADES CRÓNICO-DEGENERATIVAS.

ANÁLISIS DE CÉLULAS T REGULADORAS EN AUSENCIA DEL IFN γ DURANTE EL
DESARROLLO DE CÁNCER DE COLON ASOCIADO A COLITIS EN UN MODELO
MURINO. GENERACIÓN DE UNA NUEVA CEPA DE RATÓN DOBLE-TRANSGÉNICO.

TESIS

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

P R E S E N T A

Guadalupe Rodríguez Santos

DIRECTOR DE TESIS

Luis Ignacio Terrazas Valdés



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. De México, 2019



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.

El presente trabajo fue financiado por el siguiente proyecto:

DGAPA-PAPIIT IN226519

DEDICATORIA

A mi querida mamá, quien siempre me ha apoyado a cumplir todas mis metas en la vida a pesar de las dificultades que puedan existir, ha estado conmigo en los momentos más felices y tristes de mi vida, siempre mostrando su cariño incondicional de madre, porque sé que éste logro no solo es mío, también es suyo, has sido y serás un verdadero ejemplo a seguir para mí, te amo querida mami. A mi hermanita pequeña Yiya, quien es mi inspiración y motivación a ser una mejor persona día con día, porque sé que ella está observando cada paso que doy, te adoro con todo mi corazón. A mi tío Güino, que, aunque ya no está presente físicamente siempre está acompañándome en mi corazón, me enseñaste la bondad, humildad, respeto y muchísimas cosas más que puede llegar ser una persona.

Agradecimientos

Hoy en día la vida es muy compleja y agitada, las personas no se detienen a pensar lo hermosa que puede llegar a ser y por supuesto, nadie sabe que nos depara el futuro, pero hay veces que cuando menos te lo esperas estas en el lugar y momento correcto, sí hace unos años me hubieran dicho que estudiaría biología y en mi transcurso encontraría maravillosas personas, simplemente no lo hubiera creído. Recuerdo cuando decía que estudiaba biología, la primera impresión de las personas era: “animalitos y plantitas”, pero la biología es más que eso, con la biología aprendes lo maravilloso y complejo que es la vida, lo que menudo pasa desapercibido antes las demás personas para los ojos de un biólogo es una forma de recordar lo grandioso que llega a ser nuestro planeta y para eso solo necesitas un poco de pasión y curiosidad. Otra rama de la biología, es la investigación científica que a pesar de lo frustrante o cansado que llega a ser los experimentos en laboratorio sabes que amas lo que haces. Por eso y más agradezco a mi universidad, la UNAM/FESI, que me dio la oportunidad de llegar hasta este momento.

A mi mejor amiga que ahora es como mi segunda hermana, Liz, que pese de no vernos tan seguido sabemos que podemos contar la una con la otra, me has enseñado lo que es la verdadera amistad, pensar que todo empezó con el miedo a los porros y con un peso, gracias por todo.

La FESI también me dio una segunda mejor amiga, confidente, Vale, quién me enseñado a disfrutar de los pequeños momentos de la vida, de la empatía hacia las personas, con quien siempre puedo bromear, platicar, jugar y ser yo misma, te quiero muchísimo.

Agradezco a mi querida amiga Gala, quien me mostró que el bullying y la amistad pueden ir de la mano, gracias por escuchar mis quejas y alegrías. A Inna, la amiga más dramática que he tenido, pero también alguien con un gran corazón que no le cabe en el pecho. A mis amigas Nati, Adri, Iskra, Dianiwis, por todas sus enseñanzas, por las tardes de frappés, pizzas, y risas, fue un enorme placer coincidir con ustedes, gracias por todo niñas.

Agradezco a mis compañeros y amigos de laboratorio, Fanny Luu, Eli y Alonso, con quienes el trabajo de laboratorio siempre es más divertido. A la Dra. Itzel por todas las enseñanzas y consejos.

Agradezco al Dr. Efraín, quien ha sido un gran maestro y ejemplo a seguir para mí, me ha ayudado a alcanzar esta gran meta, y aunque el camino fue largo y lleno de multas se logró, muchísimas gracias doctor.

Agradezco al Dr. Terrazas, por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y por su apoyo. Así como agradezco a mis sinodales de tesis por su paciencia y tiempo para el presente trabajo.

Índice

Resumen	9
Abreviaturas	10
1. Introducción	13
1.1. Definición cáncer.....	13
1.2. Cáncer colorrectal.....	13
1.2.1. Epidemiología.	13
1.2.2. Factores involucrados en el desarrollo del CRC.....	15
1.2.3. Asociación de la inflamación y la respuesta inmune durante el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis (CAC)	16
1.3. Células T reguladoras (Tregs).....	19
1.3.1. Células Tregs naturales e inducidas	20
1.3.2. Mecanismos de supresión de las Tregs	21
1.4. Interferón gamma	25
1.4.1. Vía de señalización del IFN γ	25
1.5. Cruza de ratón Foxp3 Knock-in/CD124 Knock-out	27
1.5.1. Ratones transgénicos y su importancia	28
1.5.2. Gen CD124.....	29
1.5.3. Vía de Señalización de IL-4.....	30
2. Antecedentes directos.....	32
3. Justificación.....	33
4. Hipótesis.....	33
5. Objetivos	34
6. Materiales y Métodos	35
6.1. Ratones	35
6.1.1. Material biológico para el estudio del CAC	35
6.1.2. Cruzas de ratones knock-in de FOXP3 y knock-out CD124.	35

6.2.	Inducción del cáncer de colon asociado a colitis (CAC)	36
6.3.	Obtención de muestras biológicas.....	36
6.4.	Obtención de células del bazo y nódulos mesentéricos (NM)	37
6.4.1.	Estimulación de células con α -CD3.....	38
6.5.	Citometría de flujo.....	38
6.5.1.	Inmunofluorescencia en células de sangre.....	38
6.5.2.	Inmunofluorescencia en células de bazo y nódulos mesentéricos	39
6.5.3.	Cuantificación de citocinas Biolegend LegendPlex	39
6.5.4.	Citómetros de flujo.....	40
6.5.5.	Programas utilizados	40
6.5.6.	Anticuerpos	41
6.6.	Histología.....	41
6.7.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	42
6.7.1.	Extracción de DNA de cola de ratón	42
6.7.2.	Reacción en Cadena Polimerasa (PCR).....	43
6.7.3.	Geles de agarosa.....	44
7.	Resultados	45
7.1.	La ausencia del IFN γ en ratones BALB/c promueve el desarrollo de CAC	45
7.2.	Ratones IFN γ KO con CAC presentan mayor daño histológico.....	46
7.3.	Las células Tregs no participan en la vía de señalización de IFN γ durante el CAC.....	48
7.4.	La ausencia de citocinas inflamatorias puede ser la causa del aumento de tumores	53
7.5.	Generación de ratones Foxp3 knock-in/ CD124 KO	54
7.5.1.	Se observan ratones dobles a partir de la tercera generación	54
7.5.2.	Detección del genotipo CD124	56
7.5.3.	Detección de la proteína verde fluorescente.	57
8.	Discusión	58

9. Conclusión.....	68
10. Referencias.....	69
Anexo 1	81

Resumen

El cáncer de colorrectal (CRC) es la tercera patología oncológica más frecuente en hombres y segundo en mujeres a nivel mundial, ocupa el cuarto lugar en hombres y el tercero en mujeres en mortalidad. El CRC se ha asociado con factores ambientales y genéticos, siendo las respuestas inflamatorias en el colon una de las principales causas. Las células T reguladoras (Tregs) tienen la capacidad de suprimir activamente la respuesta inmune y contribuyen en la homeostasis intestinal, mientras que el IFN γ promueve la producción de citocina proinflamatorias, e incluyen moléculas de señalización apoptosis, genes reguladores del ciclo celular y activadores transcripcionales. Por lo tanto, mediante el modelo de cáncer de colon asociado a colitis (CAC) inducido por azoximetano (AOM) y dextran sulfato de sodio (DSS), analizamos el papel de las células Tregs durante el desarrollo del CAC en ausencia del IFN γ en ratones hembras y machos. Los resultados obtenidos en el presente proyecto, mostraron que los ratones deficientes de IFN γ presentaron mayor reducción del colon, así como mayor número de tumores y daño histológico en el colon. Las células Tregs y sus marcadores de superficie TIM-3 y PD-1 provenientes de bazo y nódulos mesentéricos aumentan en los grupos experimentales con CAC. Sin embargo, los ratones silvestres (WT) con CAC y los ratones deficientes de IFN γ presentaron porcentajes muy similares de las Tregs y sus marcadores de superficies entre sí, lo cual nos sugiere que las células Tregs en ausencia del IFN γ no participan durante el desarrollo de CAC. Finalmente, se observó una participación relevante de las células Th17 en el modelo IFN γ KO.

Abreviaturas

AOM	Azoximetano (azoxymethane)
APCs	Células presentadoras de antígeno (antigen-presenting cells)
CAC	Cáncer de colon asociado a colitis (colitis-associated colon cancer)
CBA	Ensayo de perlas por citometría (cytometric bead array)
CD	Enfermedad de Crohn (crohn's disease)
CRC	Cáncer colorrectal (colorectal cancer)
CTLA-4	Antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos 4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4)
DCs	Células dendríticas (dendritic cells)
DSS	Dextran sulfato de sodio (dextran sodium sulfate)
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (epidermal growth factor receptor)
IBD	Enfermedades inflamatorias del intestino (inflammatory bowel disease)
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular (extracellular signal-regulated kinases)
GAS	Secuencias activadas por gamma (gamma activated sequence)
JAK	Cinasas Activadas de Janus (Janus family kinases)
IDO	Indoleamina 2-3-dioxigenasa (indoleamine 2-3-dioxygenase)

IFN- γ	Interferón gamma (gamma interferon)
IMS	Inestabilidad de microsatélites (microsatellite instability)
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible (nitric oxide synthase)
IRF	Factor de transcripción interferón (interferon regulatory factor1)
KRAS	Oncogén Kristen Ras (Kristen Ras oncogene)
LAG3	Gen de activación de linfocitos 3 (lymphocyte-activation gene 3)
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (major histocompatibility complex)
NK	Células asesinas naturales (natural killer cells)
NM	Nódulos mesentéricos (mesenteric nodes)
PAF	Poliposis adenomatosa familiar (familial adenomatous polyposis)
PD-1	Molécula de muerte programada 1 (programmed death-1)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
STAT	Transductores de señal y activadores de transcripción (signal transducer and activator of transcription)
TAMs	Macrófagos asociados a tumores (tumor-associated macrophages)
Teff	Células T efectoras (T-cell effector)
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta (transforming growth factor- β)

TIM-3	Inmunoglobulina 3 de células T (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3)
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa (tumor necrosis factor- α)
Tregs	Células T reguladoras (regulatory T cells)
UC	Colitis ulcerosa (ulcerative colitis)
VEFG	Factor de crecimiento endotelial vascular (vascular endothelial growth factor)

1. Introducción

1.1. Definición cáncer

El cuerpo humano está formado por trillones de células, las cuales se dividen para formar nuevas células a medida que el cuerpo las necesita. En condiciones normales, las células entran en apoptosis una vez que cumplen su función (ACS, 2018). El inicio del cáncer es causado porque algunas células del cuerpo empiezan a dividirse sin control, se transforman en células no funcionales y se diseminan a los tejidos más próximos. Cuando las células cancerosas siguen dividiéndose sin control, empiezan a desplazar a las células normales y pueden formar cúmulos de células llamados tumores (NIH, 2015; ACS, 2018).

Los tumores cancerosos son malignos, lo que significa que al crecer pueden extenderse e invadir tejidos, mientras que los tumores benignos no se extienden a los tejidos cercanos y por lo tanto no los invaden (NIH, 2005).

1.2. Cáncer colorrectal.

1.2.1. Epidemiología.

El cáncer colorrectal (CRC), es el tercer tipo de cáncer más frecuente en hombres y el segundo en mujeres a nivel mundial, mientras que ocupa el cuarto lugar en hombres y tercero en mujeres en mortalidad (Fig. 1 y 2) (Globocan, 2018). El 42% de las muertes en hombres y 62% en mujeres ocurren en los países más desarrollados (Burbano et al., 2016). En México el CRC ocupa el tercer lugar en incidencia y cuarto lugar en mortalidad en mujeres, mientras que para hombres ocupa el segundo lugar en incidencia y tercer lugar en mortalidad (Globocan, 2018).

Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, worldwide, males, all ages

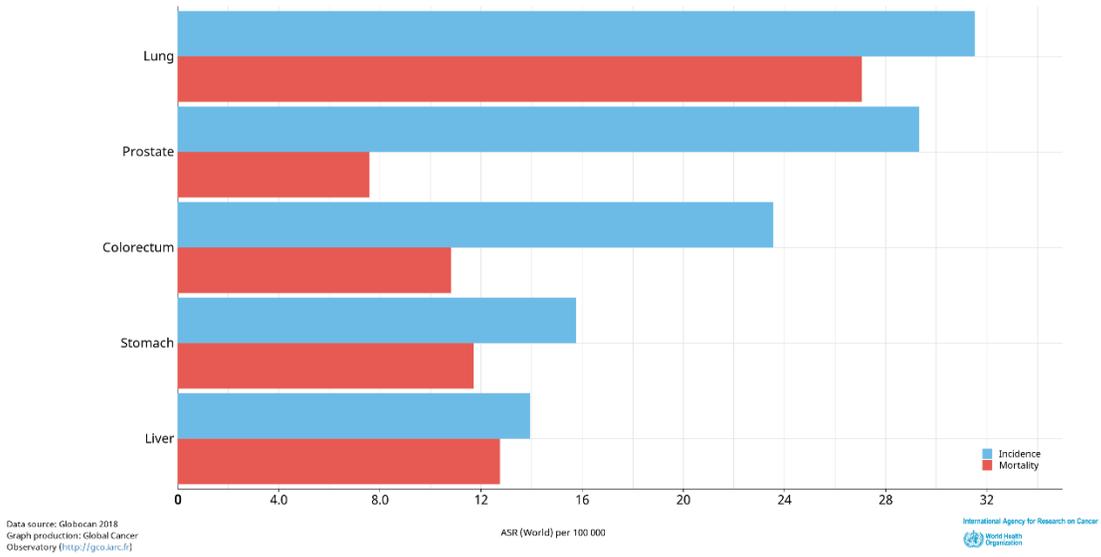


Figura 1. Incidencia y mortalidad de los primeros cinco tipos de cáncer en hombres, a nivel mundial.

Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, worldwide, females, all ages

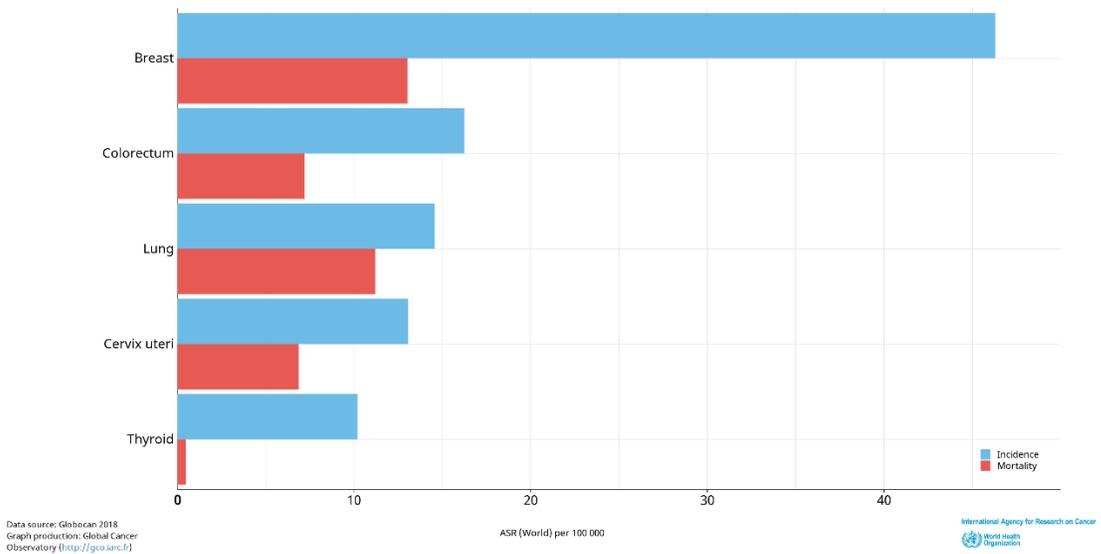


Figura 2. Incidencia y mortalidad de los primeros cinco tipos de cáncer en mujeres, a nivel mundial.

1.2.2. Factores involucrados en el desarrollo del CRC

En la actualidad se sabe que el CRC puede ser causado por diversos factores de riesgo genéticos (herencia) y ambientales (el abuso de consumo de alcohol, tabaco, estrés, sedentarismo, obesidad) (Burbano et al., 2016 y Juárez-Vázquez y Rosales-Reynoso., 2014). Aproximadamente el 20% de los casos de CRC son hereditarios, con síndromes bien definidos, donde se incluye: el síndrome de Lynch o cáncer colorrectal no asociado a poliposis, la poliposis adenomatosa familiar (PAF), la PAF atenuada y el síndrome de Peutz-Jegher. Por otro lado, el 80% de los casos restantes de CRC son de origen esporádico, entre las cuales la mayor parte son causadas por mutaciones somáticas, cuya incidencia aumenta después de los 50 años (Terzic et al., 2010; Terán et al., 2012; Pointet y Taieb., 2017).

Las enfermedades inflamatorias del intestino (IBD), como colitis ulcerosa (UC) y enfermedad de Crohn's (CD) pueden aumentar el riesgo de padecer Cáncer Asociado a Colitis (CAC). Algunos estudios sugieren que la probabilidad para desarrollar CAC después de diagnosticar UC es de 2%, 8% y 18%, mientras que para CD la probabilidad es de 2.9%, 5.6% y 8.3%; estas probabilidades se asocian con edades de 10, 20 y 30 años respectivamente para ambos padecimientos (Shawki et al., 2017; Feagins et al., 2009). Algunos pacientes con CD en el intestino delgado, tienen un incremento probabilístico del 33.2% de padecer adenocarcinoma, en comparación con la población general (Feagins et al., 2009).

1.2.3. Asociación de la inflamación y la respuesta inmune durante el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis (CAC)

La respuesta inmune inflamatoria tiene el propósito de proteger al cuerpo contra agentes infecciosos, y posteriormente se induce una respuesta antiinflamatoria encargada de la reparación de los tejidos lesionados por la inflamación. El desarrollo de la respuesta inmune comienza con el reclutamiento de células inmunes provenientes del torrente sanguíneo, hacia el sitio de lesión; el reclutamiento es mediado por citocinas y quimiocinas (Chen y Huan, 2014). Las células inmunes salen de la vasculatura con la ayuda de moléculas de adhesión expresadas por células endoteliales (Coussens y Werb, 2002). Las proteinasas del estroma rompen la matriz extracelular lo que permite la infiltración de neutrófilos, células asesinas naturales (NK), macrófagos y linfocitos (Chen y Huang, 2014; Terzic et al., 2010). La inflamación está asociada con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que, si es exacerbada, produce daño celular, el cual puede llegar a ser oncológico (Rogler, 2014). En el CAC, se sabe que la inflamación crónica conduce a cambios genéticos que aumenta el riesgo de su desarrollo (Terzic et al., 2010). Entre las mutaciones principales causadas por la inflamación que inducen CAC, se encuentran las mutaciones del gen P53 las cuales a menudo se detectan en áreas con displasias y no displasias en IBD, la inestabilidad de microsatélites (IMS) característicos del síndrome de Lynch, y finalmente la hipermetilación de las islas CpG en varios genes (Terzic et al., 2010; Juárez-Vázquez y Rosales-Reynoso., 2014; Terán et a., 2012). En etapas tardías del CAC se presenta la activación del oncogén Kristen Ras (KRAS) y la activación de la ruta WNT mediante la inactivación mutacional del gen Poliposis Adenomatosa Coli

(APC) (Terán et al., 2012; Juárez-Vázquez y Rosales-Reynoso., 2014; Yaeger et al., 2016).

En los últimos años se han observado similitudes y diferencias entre el CAC y el CRC esporádico. Entre las semejanzas se encuentran la formación de focos de criptas aberrantes, pólipos, adenomas y la generación del carcinoma. Sin embargo, la secuencia de eventos moleculares a nivel celular entre el CAC y el CRC es diferente (Fig. 3) (Rogler, 2014).

Otro factor importante para el desarrollo del CAC, es la interacción del microbioma y el microentorno celular, en el cual tiene una gran influencia las células inmunes inflamatorias como los neutrófilos, macrófagos, células T con sus quimiocinas y citocinas secretadas por la activación de las cascadas inflamatorias y proliferativas (Shawki et al., 2017). Durante el CAC, las células inmunes reconocen antígenos específicos de tumores en la superficie de células del cáncer de manera similar al reconocimiento de patógenos no propios (Markman y Shiao, 2015). Las células inmunes como las NK, son capaces de reconocer la pérdida de moléculas de superficie como el complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC I) en células cancerígenas induciendo su destrucción y, en consecuencia, el reclutamiento de otras citocinas inflamatorias como Interferón gamma ($IFN\gamma$) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa ($TNF-\alpha$) (Wu y Lanier, 2003). El reclutamiento de macrófagos y células dendríticas (DCs) induce su activación y la posterior presentación de antígeno hacia las células T citotóxicas específicas contra el tumor. Sin embargo, las células cancerígenas pueden evadir al sistema inmune mediante la adquisición de ciertas propiedades, como la expresión de un microambiente altamente inmunosupresor y rico en factores que apoyan la angiogénesis (Markman y Shiao, 2015). Bajo este contexto, la inmunovigilancia mediada por células T

CD4+, T CD8+ y NK puede mediar la detección temprana, la eliminación de células transformadas y la eliminación de focos de criptas aberrantes, así como mantener formaciones pequeñas de tumores en estado latente (Terzic et al., 2010). Las células T reguladoras (Tregs), tienen funciones inmunosupresoras que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis inmunológica y auto-tolerancia producidas por ciertas citocinas, sin embargo, en el cáncer colorectal se han visto varios infiltrados celulares de Tregs con resultados contrastantes sobre el papel que desempeñan (Zhuo et al., 2015).

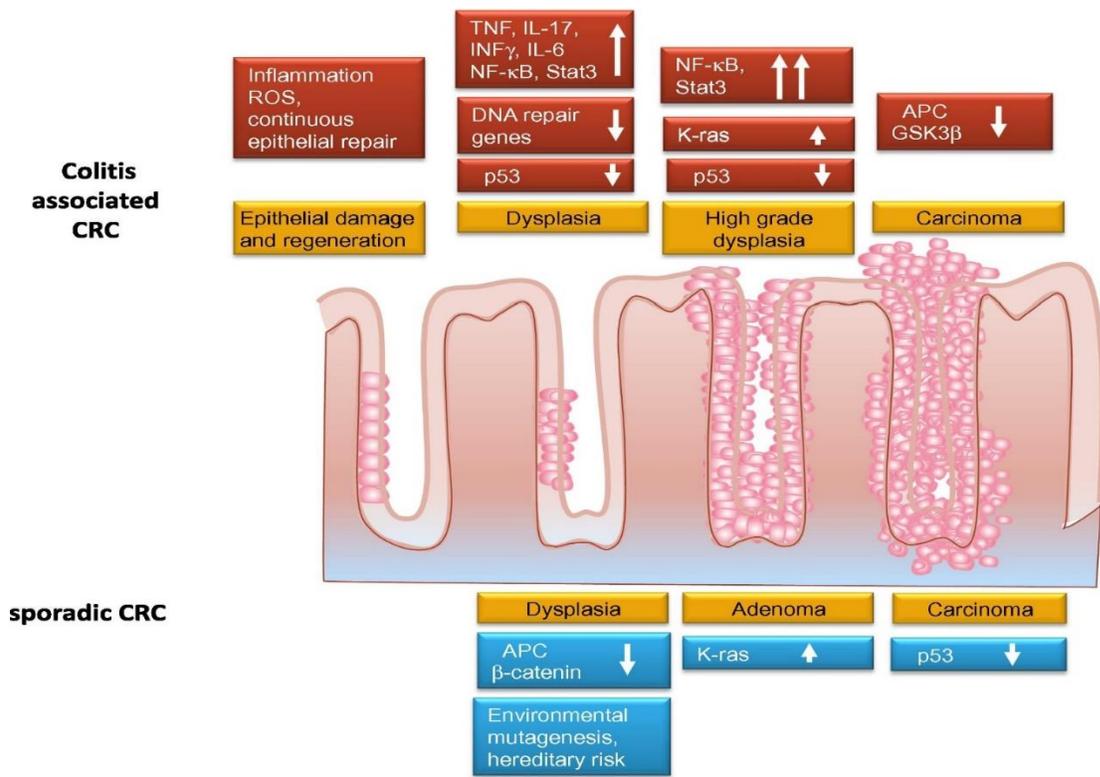


Figura 3. Vías de convergencia entre el CAC y el CRC esporádico. La secuencia de eventos moleculares difiere entre el CRC y el CAC, ya que, durante el CRC esporádico la pérdida del gen APC se da en eventos tempranos (displasia), en el CAC se da en eventos tardío (carcinoma). Algo similar ocurre con la mutación del gen P53 durante el CRC esporádico, en donde su presencia se asocia con el carcinoma bien desarrollado, mientras que en el CAC se asocia en áreas con displasia o inclusive en la mucosa del colon con inflamación crónica sin displasia. Imagen tomada de Rogler, 2014.

1.3. Células T reguladoras (Tregs).

Las células Tregs son una subpoblación de linfocitos T CD4⁺ y comprenden aproximadamente entre el 5-10 % de las células T CD4⁺ en la periferia (Broere et al., 2011). Las células Tregs suprimen activamente las respuestas inmunológicas y fisiológicas, contribuyendo a la regulación del sistema inmune (Zhuo et al., 2015). Se caracterizan por la expresión constitutiva de la molécula CD25 (cadena α del receptor de IL-2) y el factor de transcripción Foxp3, el cual es necesario para el desarrollo, mantenimiento y función de las Tregs (Mookerjee-Basu et al., 2017). Foxp3 ha sido mapeado en el cromosoma X de ratón y humano (González et al., 2010). Las células Tregs requieren una expresión estable y alta de Foxp3 para su función supresora, la pérdida de la expresión Foxp3 mediante cultivos a largo plazo disminuye la capacidad supresora de las Tregs (Sakaguchi et al., 2010). En condiciones inflamatorias las células T-Foxp3⁺ pueden perder la expresión de Foxp3 y adquirir funciones de células Th efectoras, produciendo citocinas como IFN γ , IL-2 e IL-17 (Li et al., 2015).

El papel de Foxp3 en el mantenimiento de la tolerancia a lo propio, se demostró por primera vez en ratones “scurfy”, los cuales poseen una mutación espontánea en el cromosoma X. Los machos afectados por esta mutación presentan descamación cutánea, diarrea, mala absorción, infiltrado de linfocitos en diferentes órganos, lo cual les conduce a la muerte en la tercera o cuarta semana después de nacidos. En la actualidad, se conoce que la causa de la muerte de los ratones “scurfy” es la ausencia de células Tregs CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺, lo que induce un aumento de células efectoras (Teff) CD4⁺CD25⁺ que son causantes de autoinmunidad (González et al., 2010). El fenómeno observado en los ratones scurfy es comparable con lo ocurrido en pacientes con el síndrome de

desregulación inmunitaria, poliendocrinopatía, enteropatía ligada al cromosoma X (IPEX), que se caracteriza por autoinmunidad agresiva y alergias, y es causado por mutaciones en el gen *Foxp3* (Sakaguchi et al., 2010).

Se ha demostrado que las células Teff específicas de antígeno, pueden eliminar agentes infecciosos y destruir células tumorales. Sin embargo, la respuesta Teff no controlada o excesiva, puede provocar la destrucción de los tejidos, como se observa en las enfermedades inflamatorias. En contraste a lo anterior, las células Tregs pueden prevenir o atenuar respuestas inflamatorias de las células Teff y ayudar a mantener la homeostasis (Kumar et al., 2018). Asimismo, mientras que, las células Teff pueden diferenciarse en varias subpoblaciones de células T cooperadoras (Th1, Th2, Th17) en respuestas a un amplio rango de patógenos y citocinas en un ambiente inflamatorio, las células Tregs también muestran un nivel de plasticidad funcional para la expresión de ciertas citocinas en su medio, lo que, en consecuencia, las hace más eficientes para suprimir la respuesta inmune. La plasticidad funcional tanto de las células Th como de las Tregs, es de vital importancia para una correcta activación y una correcta regulación de la respuesta inmune (Li y Zheng, 2015).

1.3.1. Células Tregs naturales e inducidas

Las células Treg naturales $CD4^+Foxp3^+CD25^+$ se originan en el timo (nTregs), mientras que las células Tregs inducibles (iTregs) se originan en la periferia en respuesta a estímulos antigénicos. La diferencia de ambas poblaciones depende de señales mediadas por citocinas y de la activación de factores de transcripción (Chávez et al., 2017). Las células nTregs expresan constitutivamente distintos marcadores de superficie como CTLA-4, CD25, GITR y LAG-3, sin embargo,

estos marcadores no son exclusivos de las nTregs, ya que también se expresan en otras células inmunes (Miyara y Sakaguchi, 2007).

El desarrollo de las células iTregs está impulsado por condiciones de tolerancia tales como la estimulación antigénica o la presencia de citocinas inmunosupresoras como IL-10 y Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Becker et al., 2006). Las DCs no solo participan en la activación de las células T, sino también puede inducir la actividad supresora de las células iTregs (Becker et al., 2006). Las DCs pueden volverse tolerogénicas mediante citocinas anti-inflamatorias como: IL-10, IL-13 y TGF- β (Jonuleit et al., 2004). Las poblaciones de las iTregs están conformadas por: las células Tr1 que secretan IL-10 y se inducen mediante IL-10, anti-CD3 y anti-CD46, y células Th3 que secretan TGF- β y se inducen mediante cultivo de células T convencionales estimuladas con TGF- β , IL-4, IL-10 y en ausencia de IL-12 (Becker et al., 2006).

1.3.2. Mecanismos de supresión de las Tregs

Las células Tregs tienen la capacidad de suprimir una gran variedad de células del sistema inmune como: linfocitos B, NKT, T CD4⁺ y CD8⁺, DC's y monocitos (Miyara y Sakaguchi, 2007). Existen distintos mecanismos de supresión de las Tregs, los cuales se abordaran de manera breve a continuación.

1.3.2.1. Supresión dependiente de contacto célula-célula

Este mecanismo de supresión es mediado por ciertas moléculas accesorias de las células T como: el antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4)

(CD152) y el gen de activación de linfocitos 3 (LAG3 o CD223); ambas moléculas son expresadas por las células Tregs; mientras que sus moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86) son expresadas por células presentadoras de antígeno (APCs) (Miyara y Sakaguchi, 2007) (Fig. 4). CTLA-4 se expresa en las células Tregs naturales en el timo y en la periferia, y la expresión aumenta tras la estimulación de las Tregs por alguna citocina como IL-10, mientras que las células T naïve expresan esta molécula solo después de la activación. La interacción entre CTLA-4 y CD80/CD86 induce la expresión de la enzima indoleamina 2-3-dioxigenasa (IDO), que es una molécula reguladora potente que cataliza el triptófano en metabolitos proapoptóticos, lo cual suprime la activación de células Teff (Fig. 4).

Estudios *in vivo* en ratones que fueron inyectados con anti-CTLA-4, muestran que se reduce la supresión mediada por células Tregs en un modelo de IBD (Miyara y Sakaguchi, 2007; Shevach, 2009). LAG3 se expresa en células T CD4 y es una molécula de adhesión que se une al complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC II). MHC II se expresa en células APC, monocitos, macrófagos, DCs y células B, lo cual podría expandir el rango de supresión de las células Tregs sobre diferentes poblaciones celulares de la respuesta inmune (Miyara y Sakaguchi, 2007).

Existen otras moléculas de superficie que juegan un rol importante en la supresión mediada por células Tregs. Las células Tregs expresan en su membrana CD39, una ectoenzima que hidroliza ATP a ADP, y ADP a AMP, lo que posteriormente se convierte en adenosina por medio de la molécula CD73 (Deaglio et al., 2007). La acumulación de ATP extracelular puede ser un indicador de daño en el tejido y cuando se libera durante el estrés inflamatorio, la molécula CD39 controla los niveles de ATP extracelulares (Shevach, 2009;

Ohta y Sitkovsky, 2014). CD39 es expresado por células B, DCs, todas las Tregs de ratón y más del 50% de las Tregs en humanos. Por lo tanto, la adenosina es una molécula efectora de las células Tregs que actúa sobre las células T convencionales y las APCs (Whiteside, et al., 2011; Mandapathil et al., 2010).

1.3.2.2. Supresión mediante citocinas

Las citocinas como IL-10, IL-2 y TGF- β son necesarias *in vivo* para la supresión de mediada por las células Tregs. Se ha visto que la secreción de IL-10 por Tregs Foxp3⁺ en la lámina propia intestinal o en el Sistema nervioso central puede controlar la colitis o encefalomiелitis alérgica experimental (Fig. 4). Se ha encontrado IL-10 y TGF- β en varios ensayos de supresión *in vitro* y cuando se ha usado anticuerpos que bloquean la función de estas citocinas, ha fallado la remoción de la supresión (Miyara y Sakaguchi, 2007).

Se ha reportado que un 80% de las células T CD4⁺CD25⁺ expresan TGF- β en su superficie, cuando se activan con altas dosis de α -CD3. El TGF- β se requiere para el mantenimiento homeostático de las células nTregs, y para la generación de las células iTregs (Miyara y Sakaguchi, 2007).

La IL-2 es indispensable para el mantenimiento y la función de las células nTregs en la periferia. En ratones deficientes de IL-2 se ha demostrado la reducción de células T CD4⁺CD25⁺, lo cual favorece el desarrollo de enfermedades autoinmunes órgano específicas (Miyara y Sakaguchi, 2007). Las células Tregs presentan un incremento en la expresión del receptor de alta afinidad para IL-2, lo cual hace a la célula Treg una eficiente competidora por el consumo de la IL-2, e induciendo la apoptosis de células Teffs por privación de IL-2 (Shevach, 2009; Díaz et al., 2009).

1.3.2.3. Citotoxicidad

Las células Tregs pueden matar a las células B por medio de granzima B y parcialmente por perforina (Vignali et al., 2008). Además, la liberación de granzima A y perforina por parte de las Tregs induce la muerte de células T efectoras, monocitos y DCs (Fig. 4) (Shevach, 2009; Miyara y Sakaguchi, 2007).

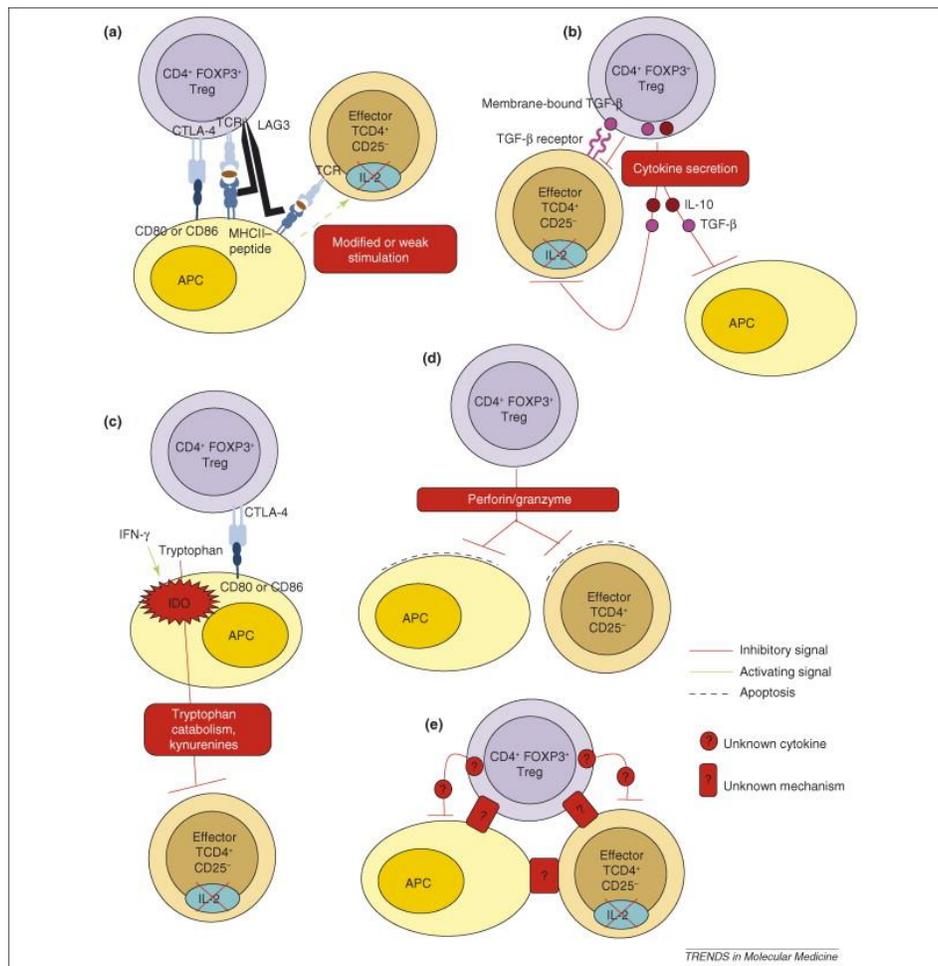


Figura 4. Mecanismos de supresión usados por las células Tregs. A) Supresión dependiente de contacto célula-célula por medio de moléculas de superficie. B) Supresión mediante citocinas. C) Supresión mediada por la inducción de triptófano a través de la molécula CTLA-4. D) Citotoxicidad. E) Debido a que ninguno de estos mecanismos puede explicar todos los aspectos de la supresión, es posible que existan varios mecanismos funcionando a la vez o que exista un mecanismo clave aún no descrito. Imagen tomada de Miyara y Sakaguchi, 2007.

1.4. Interferón gamma

El término interferón fue acuñado por primera vez en 1957 por Isacs y Lindernman; ellos infectaron células de membrana coriolantoicas de pollo con el virus de la gripe, estas células secretaban un factor en el medio de cultivo que hacía que otros cultivos de membrana fueran resistentes ante la infección por el virus, el factor secretado fue llamado interferón (Ott y Ealy, 2018). Los interferones pueden ser divididos en tres tipos distintos: tipo I (α , β , ω , τ), tipo II (IFN γ) y tipo III (λ s, en humano se han descrito 3: IFN λ 1, λ 2 y λ 3) (Mata-Espinoza y Hernández-Pando, 2008).

El IFN γ juega un papel importante en la comunicación intracelular durante la respuesta innata y adquirida, es producido por linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y NK en respuesta a estímulos por macrófagos y neutrófilos a través de la IL-12 e IL-18 (Raza y Merlino, 2011; Mata-Espinoza y Hernández-Pando, 2008). El IFN γ es necesario para la activación de macrófagos, induce la producción del factor de transcripción T-bet, considerado el interruptor maestro de la diferenciación de células Th1, además el IFN γ también puede suprimir la expresión de IL-4 y atenuar las respuestas Th2 (Weber y Krammer, 2003). El IFN γ media funciones pleiotrópicas múltiples, las cuales son dependientes de la expresión de cientos de genes, e incluyen moléculas de señalización inflamatoria, apoptosis, genes reguladores del ciclo celular y activadores transcripcionales (Castro et al., 2018). El gen que codifica para el IFN γ se encuentra en el cromosoma 12 en humanos y en el 10 en ratones (Platanias, 2005).

1.4.1. Vía de señalización del IFN γ

El receptor de IFN γ tiene dos estructuras multicadenas: IFN γ R1 e IFN γ R2, la cual interactúa con la Familia de las Cinasas Activadas de Janus (JAK) (Platanias, 2005).

En la vía canónica, el receptor de IFN γ R1 está asociado a JAK 1 y el IFN γ R2 con JAK2, los cuales, después de la unión del IFN γ , se fosforilan. (Platanias, 2005). La fosforilación de JAK crea sitios de unión para Transductores de Señal y Activadores de Transcripción (STAT), principalmente STAT 1, el cual induce la expresión de T-bet, el factor de transcripción maestro que controla la expresión del IFN γ en células T (Castro et al., 2018). La fosforilación de STAT-1 conduce a su translocación en la forma de homodímeros hacia el núcleo, donde se une a los promotores río abajo de los genes diana de los sitios secuencia activada por gamma (GAS). GAS activará el factor de transcripción interferón (IRF1), el cual a su vez activará una gran cantidad de genes como consecuencia de una respuesta secundaria (Fig. 5) (Raza y Merlino, 2011). IRF1 participa en procesos celulares como la apoptosis, la respuesta a tumores, la respuesta a virus y la modulación inmunológica (Kröger et al., 2002). IRF también regula la expresión de genes involucrados en la inflamación como el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), IL-12, e IL-18 (Tamura et al., 2008). Se ha visto que la sobreexpresión de IRF1 puede ocasionar que células tumorales desarrollen resistencia al IFN γ , por lo cual la vía JAK/STAT debe estar estrechamente reguladas para evitar consecuencias de una estimulación excesiva. Lo anterior resalta la importancia del IFN γ en las respuestas inmunitarias y la tumorigénesis (Castro et al., 2018).

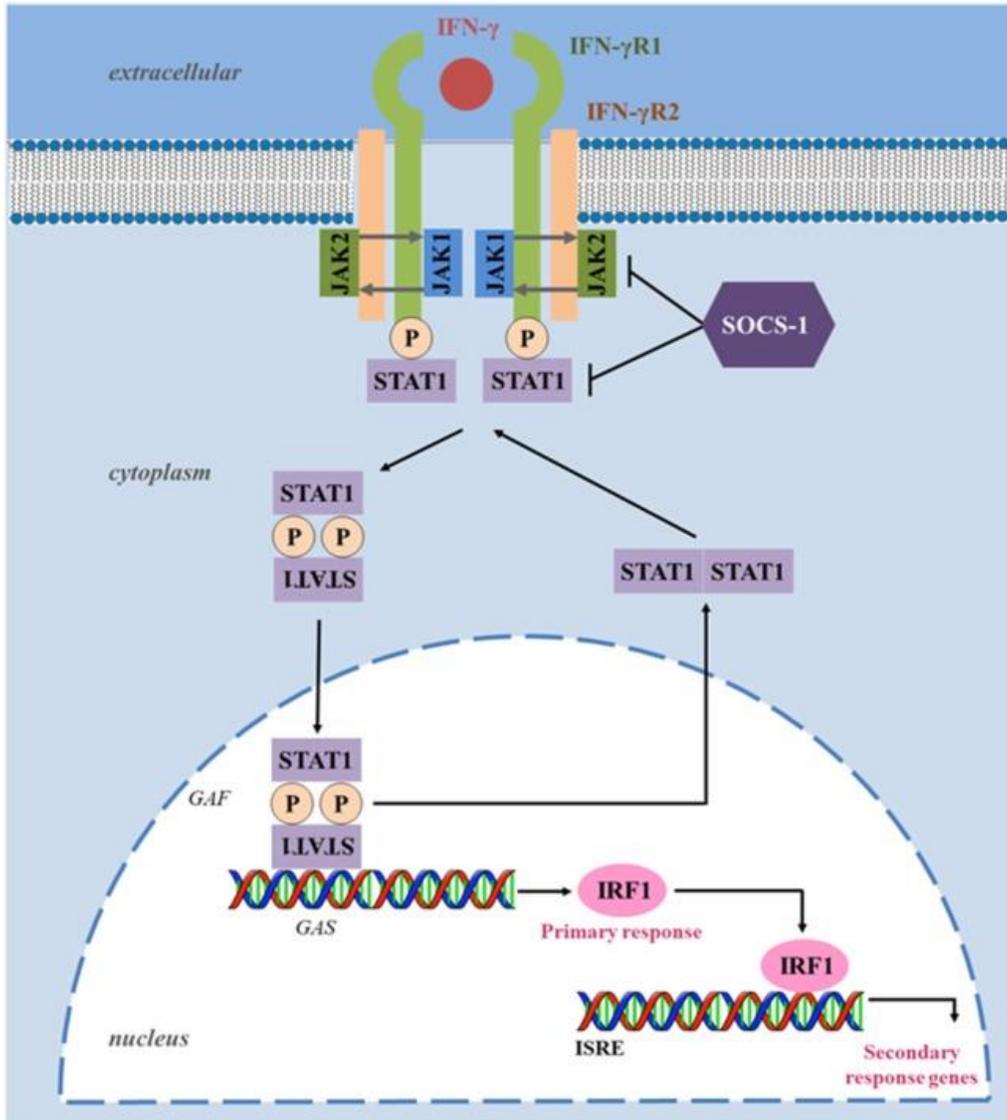


Figura 5. Vía señalización IFN γ . El IFN γ se une a su receptor compuesto de dos subunidades, IFN γ R1 y IFN γ R2 que son asociados a JAK1 y JAK2 respectivamente, las cuales fosforilan a STAT 1. STAT 1 se transloca al núcleo y se une a GAS y activa a IRF1, lo cual favorece la expresión de genes blanco. Imagen tomada de Castro et al., 2018.

1.5. Cruza de ratón Foxp3 Knock-in/CD124 Knock-out

En la actualidad es importante contar con modelos murinos que carezcan de ciertas moléculas del sistema inmune, lo cual nos ayuda a entender la participación de moléculas relevantes en procesos biológicos complejos, como

en el cáncer de colon; un ejemplo es el trabajo de la presente tesis, donde se estudió la participación del IFN γ y de las células Tregs en el ratón Foxp3 knock-in/ IFN γ knock-out (KO) durante el CAC. En el presente trabajo se generó el material biológico de cepas de ratón doble transgénico Foxp3 knock-in/ CD124 KO, para su posterior estudio en el cáncer de colon.

1.5.1. Ratones transgénicos y su importancia

Los ratones transgénicos son organismos manipulados genéticamente mediante la inserción (knock-in) o delección (KO) de un gen que originalmente no formaba parte de su repertorio genético, tienen aplicaciones en diversas técnicas de la ciencia, ya que permiten un análisis *in vivo* de las funciones biológicas y contribuyen a una mejor comprensión de diversas enfermedades patológicas, sirviendo como un modelo virtual de la biología humana (Hickman-Davis y Davis, 2006; Felmer, 2004; Wong, 2002).

A partir de 1980, surgió el ratón como modelo por su homología genética con el hombre, su fácil manejo y disponibilidad de diversas cepas. Se desarrollaron las estrategias necesarias para introducir secuencias de DNA en el genoma del ratón, confiriendo rasgos mendelianos heredables que el ratón no tenía en su genoma (Hickman-Davis, 2006; Doyle et al., 2012). Para la elaboración de un ratón knock-out es necesario un vector objetivo compuesto por: homología 5' del brazo del vector, un gen marcador de selección positiva (gen de resistencia de neomicina), homología 3' del brazo del vector y un marcador de selección negativa (timidina quinasa o si el marcador positivo esta flanqueado por sitios LoxP, el gen de la recombinasa Cre) (Bouabe y Okkenhaug, 2013). Es posible la inserción de cualquier secuencia de interés en los brazos de homología del

vector. La transfección del vector al genoma se realiza mediante recombinación homóloga, la cual dará como resultado una copia del locus genómico y la pérdida del marcador negativo (Bouabe y Okkenhaug, 2013). El vector objetivo se inserta al ratón mediante una microinyección en uno o ambos pronúcleos del cigoto del ratón, los pronúcleos con el vector objetivo se transfieren a hembras pseudopreñadas y finalmente en los próximos 20 días los ratones nacen con la secuencia del gen incorporado (Doyle et al., 2012). El marcador de selección positiva puede ser eliminado mediante la recombinasa Cre en las células troncales o mediante cruces con ratones Cre (Bouabe y Okkenhaug, 2013).

1.5.2. Gen CD124

La IL-4 es una citocina producida por subpoblaciones de células T CD4⁺, basófilos y mastocitos, participa en la regulación de la diferenciación de células T naïve por la estimulación de antígenos, cambia la expresión de las células B humanas IgE a IgG4 y en ratón de IgG1 a IgE (Nelms et al., 1999); promueve un perfil Th2 mediante la inducción de la proteína de unión de la familia GATA-3 (GATA-3) un factor de transcripción esencial para el mantenimiento de las células Th2. GATA-3 es expresado en niveles bajos por las células T naïve (Weber y Krammer, 2003). La IL-4 está involucrada en la proliferación celular, previene la apoptosis en varias células inmunes como linfocitos, macrófagos y células epiteliales, participa en tejidos de adhesión y en la anti-inflamación (UI-Haq et al., 2016). La citocina IL-4 tiene homología de aproximadamente el 25% con la IL-13, ambas comparten receptores de superficie y moléculas de señalización intracelular (McCormick y Heller, 2015; UI-Haq et al., 2016).

La IL-4 posee dos tipos de receptores: el receptor tipo I que está conformado por una cadena α (IL-4R α o CD124) y una cadena γ (γ C); el receptor tipo II que está conformado por IL-4R α y la cadena α tipo I del receptor de IL-13 (IL-13R α 1). IL-4R α ha sido mapeado en el cromosoma 7 del ratón y el 16 del humano (NCBI). El IL-4R se encuentra presente en tejidos hematopoyéticos, endoteliales, epiteliales, de músculo, fibroblastos, hepatocitos y cerebro (McCormick y Heller, 2015; Nelms et al., 1999). Además, el IL-4R puede silenciar la expresión de IFN γ mediante la vía de señalización de STAT-6 y en consecuencia mejorar el perfil Th2 por la inhibición de respuestas de Th1 (Weber y Krammer, 2003).

1.5.3. Vía de Señalización de IL-4

La IL-4 se une de manera muy específica al IL-4R α , lo que induce el reclutamiento de la γ C o IL-13R α 1 que son de más baja afinidad. La disponibilidad de cada cadena en la superficie celular, activa una u otra vía de señalización (McCormick y Heller, 2015). Cuando la IL-4 se une a su receptor tipo I se fosforila el heterodímero STAT-1/3, que a su vez fosforila tirosinas dentro del dominio citoplasmático del IL-4R α (McCormick y Heller, 2015). Los residuos de fosfo-tirosina crean sitios de acoplamiento para la molécula STAT-6 y/o IRS-2; por lo tanto la fosforilación de STAT-6 promueve su translocación nuclear y la inducción de la transcripción de genes; mientras que la fosforilación de IRS-2 activa PI3-K, AKT y NF-kB, lo que favorece la transcripción de genes involucrados en la activación del ciclo celular, en la proliferación y en la sobrevivencia de la célula (Fig. 6) (McCormick y Heller, 2015).

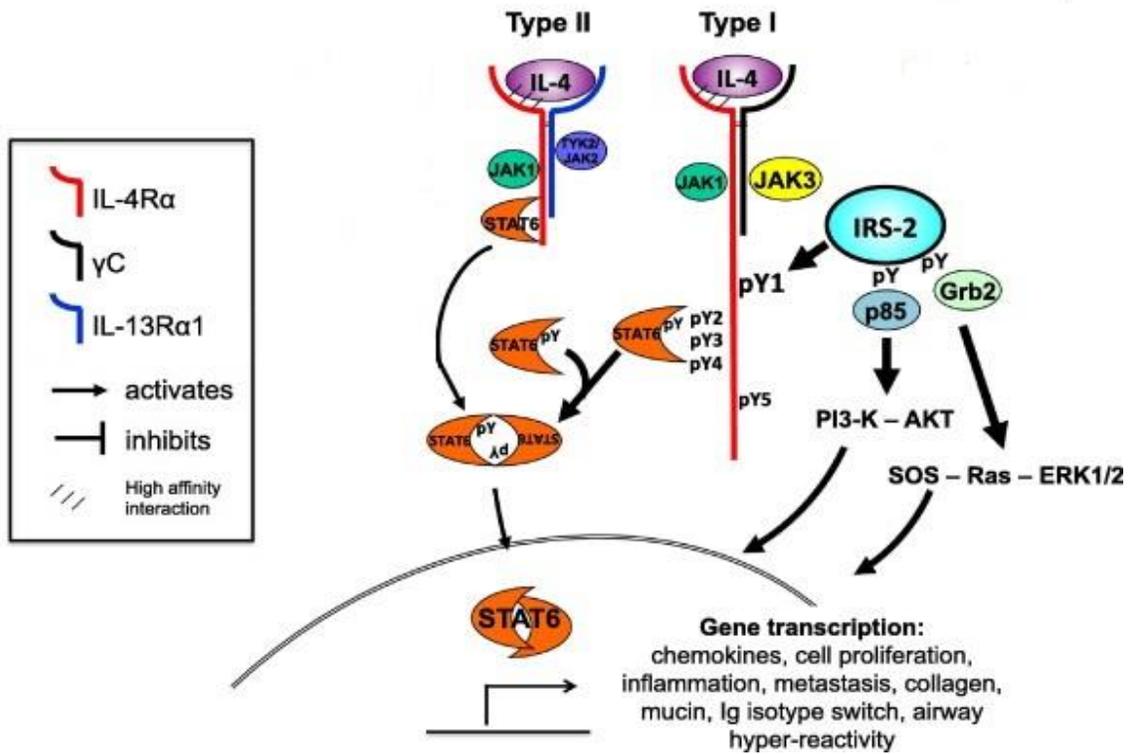


Figura 6. Vía de señalización de IL-4. La IL-4 se puede unir a dos posibles complejos, el receptor de tipo I: IL-4Rα y γC; y de tipo II: IL-4Rα y IL-13Rα1. La IL-4 se une a IL-4Rα, lo que desencadena una dimerización de la señalización secundaria de la cadena. La señalización del receptor tipo I conduce a la activación de JAK, y de moléculas adaptadoras de señalización STAT 6 e IRS-2, mientras que la señalización del receptor tipo II, conduce principalmente la fosforilación de STAT 6. La IL-4 también activa PI3-K y AKT. Imagen tomada y modificada de McCormick y Heller, 2015.

2. Antecedentes directos

Slattery et al. en 2011, examinaron en pacientes con cáncer de colon y recto que las variaciones genéticas del IFN γ y sus receptores IFN γ R1 y IFN γ R2, así como los factores de transcripción del interferón (IRF), se asocian con el riesgo de desarrollar cáncer de colon y recto, y estas modificaciones están relacionadas con el estilo de vida, como el uso de aspirinas y el consumo de cigarrillos. De igual forma, Wang et al., en 2014, observaron en ratones APC^{Min/+}/IFN^{+/-}, los cuales desarrollan CRC esporádico, que la eliminación selectiva de IFN γ aumenta la tumorigénesis y la carcinogénesis. Asimismo, Wang et al., 2014, demostraron *in vitro* que la administración de IFN γ , suprime la proliferación de células de cáncer de colon humano HT-29 mutadas con APC, y que la eliminación de IFN γ R1 estimula la proliferación celular y la formación de colonias de pólipos. Lo cual nos sugiere que las variaciones del IFN γ y sus receptores participan en el desarrollo del cáncer de colon.

STAT1 es fosforilado en la vía de señalización de IFN γ (apartado 1.4.1). En ratones KO de STAT1, a través de un modelo de CAC inducido por azoximetano (AOM) y dextran sulfato de sodio (DSS), se observó un incremento en la susceptibilidad al desarrollo de CAC en etapas tempranas, dando como resultado la formación de tumores en los primeros ciclos de desarrollo del CAC, así como daño intestinal más rápido que los controles silvestres (WT) y aumento de la proliferación desde el día 20 después de la inducción del CAC. De igual manera, se observó una reducción de la apoptosis en tumores avanzados y una desregulación en el reclutamiento de monocitos y granulocitos (León-Cabrera et al., 2018). Todos estos resultados sugieren que el IFN γ y su vía de señalización aumentan la susceptibilidad al desarrollo del CAC.

Se sabe que las células Tregs pueden suprimir activamente la respuesta inmune, así como pueden controlar la respuesta proinflamatoria de las células T efectoras, lo que concluye en el mantenimiento de la homeostasis inmune (Mookerjee-Basu et al., 2018; Kumar et al., 2018). Olguín et al. en 2018, observaron en ratones hembras BALB/c Foxp3^{EGFP} durante el desarrollo de CAC mediante AOM y DSS, que cuando hay una reducción del 50% de Tregs durante el segundo ciclo del DSS, existe una mejora en la activación de células T CD4⁺ y CD8⁺, asociada a una menor reducción del colon, menor número de tumores, así como un aumento de infiltrados inflamatorios en la mucosa y en las vellosidades del tejido intestinal. Lo cual nos sugiere que la acumulación de las células Tregs acelera el desarrollo del CAC.

3. Justificación

El IFN γ es una citocina involucrada en procesos de inflamación, Sin embargo, la deficiencia del IFN γ R1 en modelos de cáncer de colon esporádico aumenta la tumorigénesis, lo cual es contrastante. Por lo tanto, es importante estudiar si la ausencia del IFN γ favorecerá el desarrollo de cáncer de colon y si este proceso involucra a las células Tregs.

4. Hipótesis

La ausencia de IFN γ acelerará el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis (CAC) en ratones hembras y machos, y en este proceso participan las células Tregs.

5. Objetivos

General

Analizar el papel de las células Tregs durante el desarrollo del CAC en ausencia del IFN γ en ratones hembras y machos.

Particulares

- Determinar el número de tumores en ratones hembras y machos con CAC.
- Observar el daño morfológico de ratones hembras y machos con CAC mediante histología.
- Analizar el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ de bazo y nódulos mesentéricos en ratones hembras y machos.
- Analizar el porcentaje de Tregs de bazo y nódulos mesentéricos en hembras y machos.
- Determinar el porcentaje de marcadores de superficie PD-1 y TIM-3 en las células de Tregs de bazo y nódulos mesentéricos en hembras y machos.
- Cuantificar citocinas: inflamatorias (IFN γ , TNF- α), antiinflamatorias (IL-6, IL-10) y de respuesta Th17 (IL-17A, IL-17F, IL-21 y IL-22) en el sobrenadante de células de bazo en hembras y machos.

6. Materiales y Métodos

6.1. Ratones

6.1.1. Material biológico para el estudio del CAC

Se utilizaron ratones $Foxp3^{EGFP}$ *knock-in* de la cepa BALB/c (C.Cg- $Foxp3^{tm2Tch}$, Laboratorios Jackson) cuyos pies de cría fueron donados por el Dr. Rafael Saavedra Durán, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM y que además son deficientes de $IFN\gamma$ ($IFN\gamma^{-/-}$) (Tesis de Carlos Blanco, UNAM, 2016). Los ratones se reprodujeron en el bioterio de la FESI y se mantuvieron en jaulas de policarbonato con viruta de madera, alimento y bebederos *Ad libitum* estériles, a temperatura ambiente, con ciclos de luz de 12 x 12 horas. Los ratones fueron marcados en las orejas para su identificación.

6.1.2. Cruzas de ratones *knock-in* de *FOXP3* y *knock-out* *CD124*.

Se realizaron cruzas de ratones doble transgénico $Foxp3$ *knock-in*/*CD124* *knock-out*, cabe mencionar que solo se obtuvo el material biológico y no se realizaron experimentos del desarrollo de CAC en estos ratones. Para determinar la probabilidad de las generaciones en las que se obtendrían las cruzas de ratones con el genotipo $Foxp3$ *Knock-in*/*CD124* *Knock-out*, se utilizaron cuadros de Punnet, tomando en cuenta de localización del gen *CD124* en el cromosoma 7 del modelo (lo anterior se menciona en la introducción, apartado 1.5.2).

6.2.Inducción del cáncer de colon asociado a colitis (CAC)

Se administró vía intraperitoneal azoximetano (AOM) a una concentración de 12.5 mg por Kg de peso. Posteriormente, a los 7, 28 y 49 días después de la inyección de AOM, se administró a los ratones dextran sulfato de sodio (DSS) al 2% disuelto en el agua para beber durante 7 días (Tanaka, 2003), de acuerdo al esquema descrito en la Fig. 7. Asimismo, semanalmente se registró el peso de los ratones, así como la consistencia de sus heces y el sangrado anal, consecuencia del modelo de CAC.

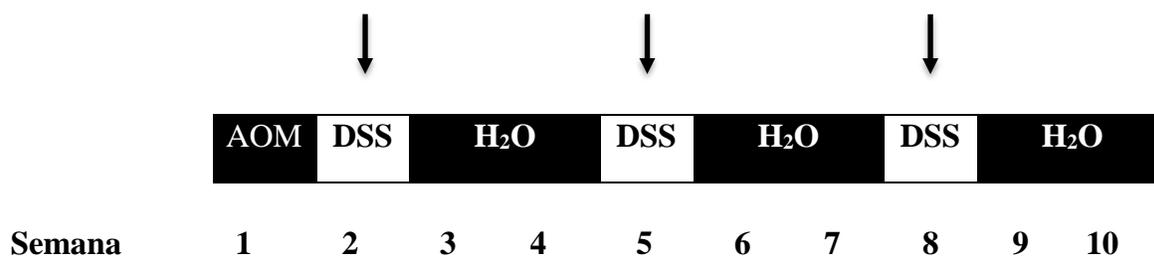


Figura 7. Esquema de administración de AOM/DSS en ratones Foxp3 knock-in/ IFN γ knock-out. Los ratones fueron tratados bajo el esquema siguiente: en el día 1 del experimento, se les inyectó el AOM, en las semanas 2, 5 y 8 se les administró DSS y en las semanas 3, 4, 6, 7, 9 y 10 se les dio de beber agua purificada.

6.3.Obtención de muestras biológicas

Se realizó el sacrificio de los ratones pasado las 10 semanas después del tratamiento con AOM/DSS, como se ha descrito en la literatura y en experimentos realizados en el laboratorio (Olguín et al., 2018), para lo cual los ratones fueron colocados en una cámara de CO₂. Posteriormente, el ratón se sumergió en alcohol para facilitar su disección donde se extrajo el colon, el bazo y los nódulos mesentéricos.

El colon se colocó en hielo para su conservación durante el proceso de análisis, y posteriormente se midió su longitud, se lavó pasando solución salina a través de la luz intestinal y se realizó un corte longitudinal con la finalidad de observar la presencia o ausencia de pólipos y/o tumores, así como contabilizar el número y el tamaño de los mismos. Una vez que se realizó el análisis macroscópico del colon, se extrajo una biopsia de aproximadamente 1cm de la parte media/distal del colon, y se colocó en etanol al 100% para histología.

6.4. Obtención de células del bazo y nódulos mesentéricos (NM)

Se colocó el bazo del ratón en una caja Petri y se perfundió con 5 ml de solución salina, se recuperó la solución salina en un tubo de 15 ml, y se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó y se le agregaron 5 ml de solución hemolizante (Anexo 1) por 5 minutos, esto se realizó para lisar los eritrocitos. Pasados los 5 minutos, a la muestra se le agregaron 10 ml de solución salina, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C, se decantó y el pellet se resuspendió con 10 ml de solución salina. Posteriormente, se realizó el conteo de células diluyendo 1:1 con azul de tripano y colocando 10 µl de la dilución en un contador automático de células (Countess II FL by Thermo Fisher Scientific), el cual nos da un valor certero del número total de células, así como de su viabilidad, la cual fue superior al 90% en cada muestra.

Los NM se extrajeron del intestino, se colocaron entre una capa de tela de horganza en una caja Petri con 5 ml de medio RPMI completo (Roswell Park Memorial Institute, Gibco™), y se maceraron suavemente con un embolo de una jeringa de 5 ml lo cual permitió obtener las células. Posteriormente se recuperó el medio RPMI en un tubo de 15 ml, se centrifugó a 1500 rpm durante

5 minutos a 4°C. A continuación, la muestra se decantó, el pellet se resuspendió con 1 ml de medio RPMI completo. El conteo de las células de NM se realizó bajo el mismo proceso de las células de bazo (Countess II FL ThermoFisher).

6.4.1. Estimulación de células con α -CD3

Se agregaron 3×10^5 células de bazo y NM en una placa de 96 pozos con anticuerpo α -CD3 a una concentración 5 μ g/ml durante 48 horas, en un ambiente humificado a 37°C, en oscuridad, con saturación de CO₂ al 5%. Posteriormente, se obtuvieron los sobrenadantes de las células estimuladas, los cuales se mantuvieron a -70°C en un ultracongelador hasta el momento de su utilización.

6.5. Citometría de flujo

6.5.1. Inmunofluorescencia en células de sangre

Para comprobar el fenotipo de las células Tregs en los ratones Foxp3^{EGFP}, se cortó un pedazo de cola al ratón (únicamente la punta) con el fin de obtener 5 gotas de sangre, las cuales se colocaron en un tubo Eppendorf con 10 μ l de EDTA. A la muestra de sangre se le añadieron 20 μ l de FACS Flow Sheath buffer (BD®) que contenían 0.1 μ l de α -CD4 (Tabla 1) y se incubaron a 4°C por 30 minutos. Se añadieron 500 μ l de solución hemolizante por 5 minutos, y las células se lavaron con 1 ml de FACS, centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, se decantó la muestra y se resuspendió con 300 μ l de FACS, homogenizando con un vórtex para analizar la muestra inmediatamente en el citómetro de flujo.

6.5.2. Inmunofluorescencia en células de bazo y nódulos mesentéricos

Se tomaron 1×10^6 células de bazo y NM por cada muestra de ratón en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se aforó a 1 ml con solución salina, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C . Posteriormente, se decantó y al pellet se le agregaron 100 μl de FACS que contenían los siguientes anticuerpos: α -CD4, α -CD8, α -CD25, α -TIM-3 y α -PD-1 (apartado 6.5.6), incubando en oscuridad por 30 minutos a 4°C . A continuación, se le agrego 1 ml de FACS a cada muestra, centrifugando a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C . La muestra se decantó y se le agregaron 300 μl de FACS, homogenizando con un vórtex. La muestra se analizó inmediatamente en el citómetro de flujo.

6.5.3. Cuantificación de citocinas Biolegend LegendPlex

Para la cuantificación de citocinas en sobrenadante de cultivo se utilizó el kit CBA Th17 (Cytometric Bead Array) de Biolegend®, los cuales son inmunoensayos basados en perlas que utilizan el principio básico de inmunoensayos tipo sándwich, similar a ELISA, con la ventaja de utilizar una menor cantidad de muestra; el kit utilizado es capaz de reconocer 13 citocinas. Primero se prepararon las perlas, para lo cual, el vial donde encontraban se sónico durante un minuto para posteriormente darle un vortéx por 30 segundos. Se calculó la cantidad de perlas por ensayo, se realizó un mix de perlas al cual se le agregó 2.7 μl de cada perla por muestra y se completó con buffer de lavado (preparado según el proveedor) a un volumen final de 1.5 ml. Se utilizaron 25 μl de la mezcla de perlas con buffer de lavado por muestra final. Al mismo tiempo se realizó una curva estándar, para lo cual se reconstituyó el liofilizado

de citocinas con 250 μ l de buffer de ensayo y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. El punto máximo de concentración de la curva estándar es de 10 000 pg/ml. Posteriormente, se realizaron diluciones del estándar de 1:4, 1:16, 1:64, 1:256, 1:1024, 1:4096 hasta llegar al punto mínimo de 0 pg/ml.

Las muestras se prepararon en tubos eppendorf colocando 25 μ l de muestra o de las proteínas de la curva estándar, 25 μ l de buffer de ensayo, 25 μ l del mix de perlas, 25 μ l de anticuerpos de detección; todo lo anterior se cubrió con aluminio dejando agitar por 2 horas. Pasadas las 2 horas se agregaron 25 μ l de Estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE) y las muestras se volvieron a tapar con aluminio manteniendo en agitación por 30 minutos más. A continuación, las muestras se centrifugaron a 1000 gravedades (g) por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se agregó 200 μ l de buffer de lavado 1X, homogenizando con un vortéx. Se centrifugó a 1000 g por 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se agregó 300 μ l de buffer de lavado. Seguidamente, las muestras se analizaron en el citómetro de flujo.

6.5.4. Citómetros de flujo

Se utilizaron los citómetros Attune NxT de Thermo Fisher® y FacsAria Fusion de BD®.

6.5.5. Programas utilizados

Los datos fueron analizados mediante el programa de citometría: FlowJo versión X (TreeStar). Para determinar las diferencias estadísticas en los grupos

se utilizó la prueba ANOVA de una vía con una prueba de comparación múltiple de Tukey usando el software de Prism 7.0 (GraphPad).

6.5.6. Anticuerpos

Anticuerpo	Fluorocromo	Marca	Isotipo	Clona
CD3	Purificado (para cultivo celular)	Biolegend	Armenian Hamster IgG	145-2C11
CD4	Brilliant violet (BV) 421	Biolegend	Rat IgG2b	A161A1
CD8	BV605	Biolegend	Rat IgG2a	53-6.1
CD25	APC-Cy7A	Biolegend	Mouse IgG1k	M-A251
PD-1	PE-A	Tonbo	Armenian Hamster IgG	J43.1
TIM-3	Alexa Fluor 647	Biolegend	Rat IgG1k	B8.2C12

Tabla 1. Anticuerpos utilizados

6.6. Histología

Las biopsias de colon fijadas en etanol al 100%, fueron incluidas en etanol al 100% durante 1 hora. Posteriormente, las muestras se sumergieron en 3 baños de xilol durante 1 hora por cada baño. Finalmente, las muestras fueron embebidas en 3 baños de parafina de 1 hora cada uno. Se formaron los bloques en parafina con la ayuda de una central de inclusión de tejido en parafina (Lupetec®) y se realizaron cortes de 3 µm de grosor en un microtomo (Leica

RM2125 RTS) montándolos en portaobjetos previamente cargados con poli L-lisina.

Para la tinción de hematoxilina y eosina (H-E), las muestras se desparafinaron por medio de 2 baños de xilol durante 10 minutos, se hidrataron en un tren de alcoholes decreciente de 100%, 90%, 80% y 70% durante 3 minutos cada uno y se lavaron con agua destilada durante 3 minutos. Para continuar, las muestras se tiñeron con hematoxilina durante 2 minutos y se lavaron con agua corriente durante 2 minutos para eliminar los excesos del colorante. Posteriormente las muestras se sumergieron por 1 segundo en alcohol ácido y se enjuago con agua. Se utilizó agua amoniacal al 2% durante 2 minutos, se lavó con agua destilada unos segundos y se continuó con la tinción. Las muestras se sumergieron en eosina por 2 minutos y se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de colorante. Después, las muestras se deshidrataron mediante un tren de alcoholes en forma creciente 70%, 80%, 90% y 100% durante 3 minutos cada uno, además de realizar 2 baños de xilol al 100% durante 5 minutos cada uno para aclarar el tejido. Finalmente, las laminillas se montaron con resina y se colocó un cubreobjetos sobre el tejido, evitando dejar burbujas.

6.7.Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

6.7.1. Extracción de DNA de cola de ratón

Para la detección del gen CD124 en los animales con fondo BALB/c, se cortó un fragmento de cola del ratón de aproximadamente 0.5 cm de largo y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml que contenía 500 µl de buffer de lisis (Anexo 1) más 10 µl de proteínasa K (Invitrogen™) y se homogenizó con un vórtex. Posteriormente, las muestras se incubaron a 56°C durante 2-3 horas o toda la

noche para posteriormente centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se separó cuidadosamente en un tubo nuevo y se le agregaron 500 μ l de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. Se decantó y el pellet, se resuspendió en 1 ml de etanol al 75% centrifugando a 12000 rpm por 10 minutos. La muestra se decantó, y el pellet se dejó secando por 1 hora para eliminar los restos de etanol, resuspendiendo finalmente en 100 μ l de agua estéril.

6.7.2. Reacción en Cadena Polimerasa (PCR)

Una vez obtenido el DNA, se realizó una PCR para amplificar los fragmentos específicos mediante PCR utilizando un kit (Amplicasa Taq DNA polimerasa, Biosystems®). Se usaron 200 ng de DNA y los primers descritos en la Tabla 3 en un volumen final de 25 μ l. Las muestras se amplificaron en un termociclador (applied biosystems® 2720 by life technologies™) de acuerdo a los ciclos mostrados en la Tabla 2.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 minutos	1
Desnaturalización	95	30 segundos	35
Alineación	Tm específica de cada primer	20 segundos	
Elongación	72	1 minuto	
Elongación final	72	5 minutos	1

Tabla 2. Condiciones bajo las cuales se realizó el PCR.

6.7.3. Geles de agarosa

Los amplicones se visualizaron en un gel de agarosa al 1.2% teñido con 1.5µl bromuro de Etidio. Posteriormente, se realizó una electroforesis a 100 Volts durante 45 minutos y finalmente las bandas fueron escaneadas mediante un sistema Gel Doc™ Ez imager (BIO-RAD) mediante el programa Image Lab™.

Gen	Secuencia del primer (5'--3')	PM del producto	Temperatura de alineación
WT IFN-γ	F- AGAAGTAAGTGGAAGGGCCCAGAAG	210	60
Común IFN-γ	F- AGGGAAACTGGGAGAGGAGAAATA T	210	60
Mutante Neo IFN-γ	F-CCTTCTATCGCCTTCTTGACG	500	60
IL-4	F-TGACCTACAAGGAACCCAGGC R-CTCGGCGCACTGACCCATCT	600	58
Neo IL-4	F-GGCTGCTGACCTGGAATAACC R-CCTTTGAGAACTGCGGGCT	471	58

Tabla 3. Primers utilizados para amplificar los genes previamente descritos

7. Resultados

7.1. La ausencia del IFN γ en ratones BALB/c promueve el desarrollo de CAC

Para los propósitos de la presente tesis, los ratones Foxp3^{EGFP} se abreviarán como WT y los ratones Foxp3 knock-in/IFN γ knock-out se abreviarán como KO.

En la literatura se ha descrito que el peso de los ratones es un indicador de su estado de salud, y previamente en nuestro grupo de investigación se demostró que, en el proceso de inducción de CAC, los ratones bajan de peso (Olguín et al., 2018). Para demostrar lo anterior, en el presente trabajo los ratones se pesaron semanalmente a lo largo del experimento.

Los ratones WT y KO controles, sin importar su sexo aumentaron su peso a lo largo del experimento, como era de esperarse (Fig. 8A y 8B). Los ratones hembras CAC WT y CAC KO disminuyeron su peso principalmente en la semana 3 y al finalizar el experimento, en aproximadamente 10% (Fig. 8A). Los ratones machos CAC WT y CAC KO disminuyeron su peso especialmente en las últimas dos semanas, y al finalizar el experimento, en aproximadamente 4% y 10% respectivamente (Fig. 8B). Por lo que, los ratones con CAC disminuyen de peso sin importar su sexo y cepa.

Al finalizar el tiempo de inducción de CAC, los ratones fueron sacrificados. Se extrajo el colon de cada ratón y se midió longitudinalmente. El colon de los grupos experimentales con CAC se redujo de 1 a 3 cm en comparación con los grupos controles, los ratones machos con CAC fueron los que presentaron mayor reducción. (Fig. 9A y B). Posteriormente, los intestinos de los ratones se lavaron y se cortaron longitudinalmente para realizar el conteo de tumores mayores a 2 mm (Fig. 9C). Los ratones CAC KO presentaron mayor número de

tumores que los ratones CAC WT, principalmente los ratones machos CAC KO (Fig. 9D). Estos datos sugieren que los ratones deficientes de IFN γ son más susceptibles al desarrollo de CAC, en especial los ratones machos.

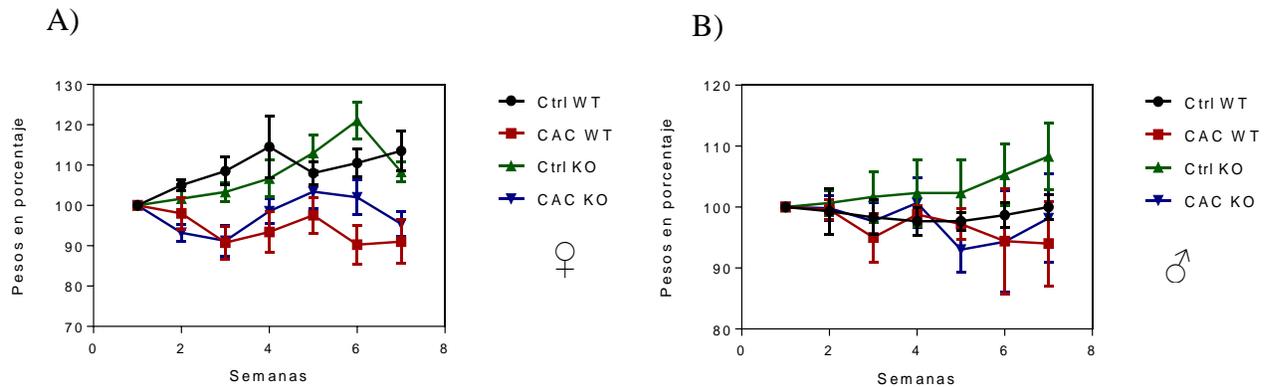


Figura 8. Porcentaje de pérdida de pesos de grupos experimentales durante el modelo de CAC inducido con AOM/DSS, el peso del día 0 del tratamiento fue tomado como el 100% y fue comparado con los pesos semanales hasta finalizar el experimento. A) Porcentaje de pesos de ratones hembra de los grupos experimentales. B) Porcentaje de pesos de los ratones macho de los grupos experimentales.

7.2. Ratones IFN γ KO con CAC presentan mayor daño histológico.

Se realizó el análisis histológico de las biopsias de colon previamente tomadas mediante la tinción H-E. Los ratones sin tratamiento presentan una morfología normal, se aprecia un epitelio sano, criptas de apariencia normal, mucosa y submucosa sin infiltrado celular. En ratones hembra CAC WT se observa infiltrado inflamatorio, formación de focos de criptas aberrantes y pólipos (Fig. 10). Sin embargo, en las hembras KO CAC se observa un mayor daño tisular, mayores infiltrados celulares, focos de criptas aberrantes en la mucosa y submucosa y, en consecuencia, engrosamiento de tejido. En los ratones machos CAC WT se observan tumores bien definidos, infiltrado inflamatorio y mayor

número de focos de criptas aberrantes que en las hembras CAC WT. Sin embargo, en los ratones machos CAC KO, se aprecian tumores de mayor tamaño, destrucción total del tejido, pérdida de vellosidades y capa muscular (Fig. 10). Estos datos sugieren que los ratones machos KO CAC presentan mayor daño histológico.

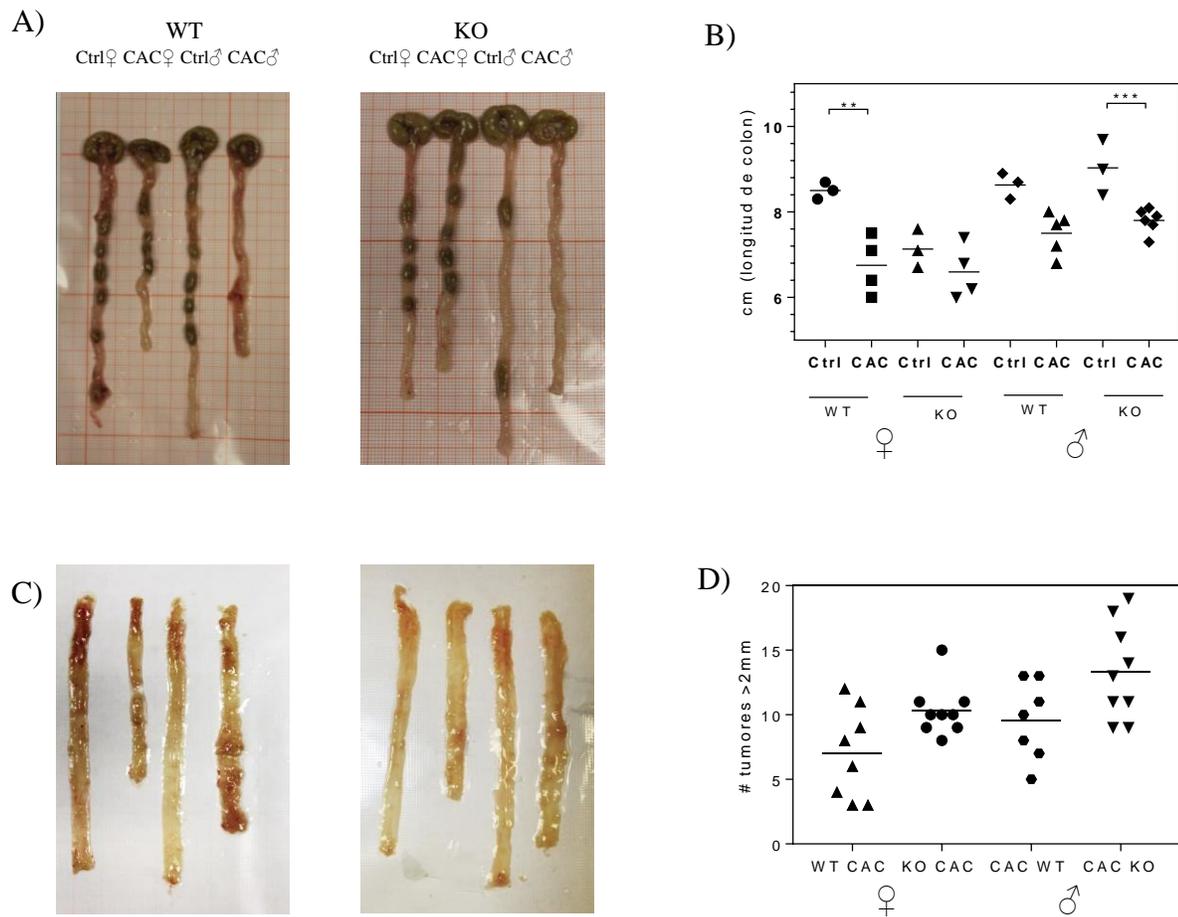


Figura 9. Análisis macroscópico de la longitud y número de tumores del colon de los distintos grupos experimentales de ratones al finalizar el experimento. A) Colon representativo de cada grupo experimental, B) Longitud y C) Número de tumores del colon de los grupos experimentales.

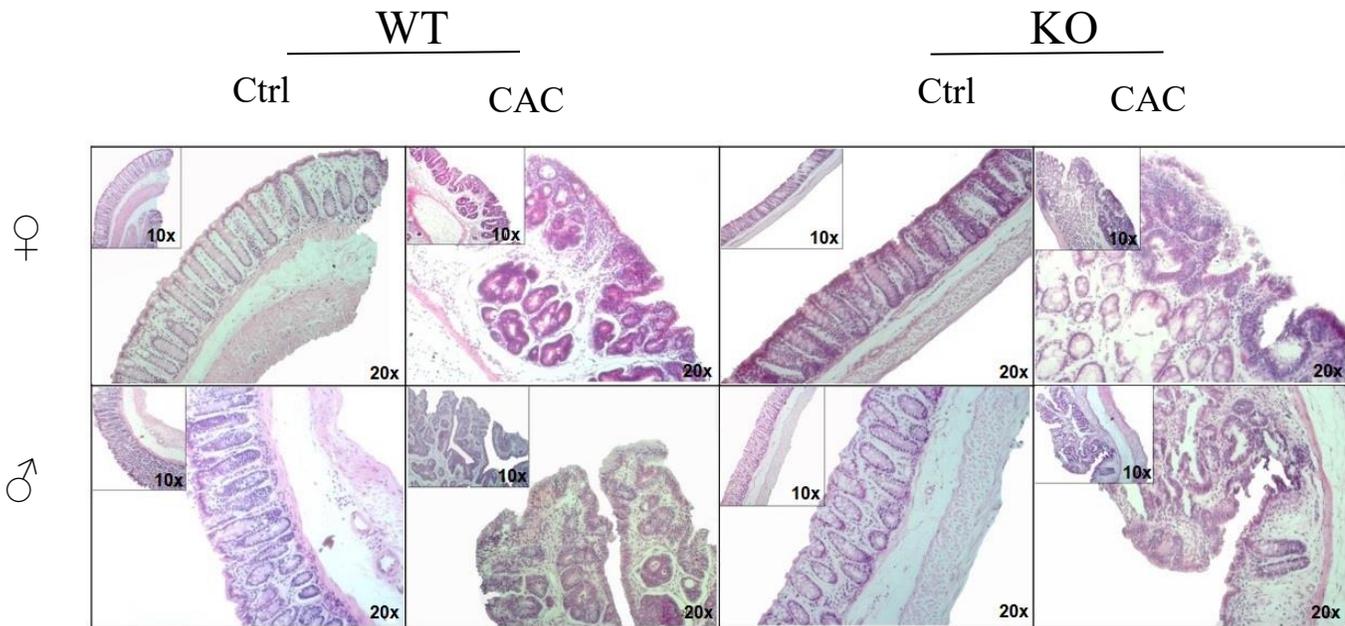


Figura 10. Tinción histológica con H-E del colon de los grupos experimentales.

7.3. Las células Tregs no participan en la vía de señalización de IFN γ durante el CAC.

En nuestro grupo de trabajo y en la literatura, se ha descrito que durante el desarrollo del CAC las células Tregs y sus moléculas de superficie TIM-3 y PD-1 aumentan (Olguín et al., 2018; Girardin et al., 2013). TIM-3 o la Inmunoglobulina 3 de células T, es una molécula inhibitoria, en células Th1 induce la apoptosis; durante la inflamación crónica y el cáncer, TIM-3 se co-expresa con PD-1 en células CD8⁺ disfuncionales o agotadas y en las Tregs induce mayor efecto supresor (Sakuishi et al., 2011). PD-1 o molécula de muerte programa 1, es un regulador negativo de la respuesta inmune, puede promover la secreción de IL-10 e inhibir la maduración de células T. La sobreexpresión de PD-1 en el cáncer favorece el desarrollo del tumor mediante la transformación de T activadas a Tregs inducidas, inhibiendo así la respuesta inmune anticancerígena de las células T (Giancchetti y Fierabracci, 2018). Por

lo que, en el siguiente experimento, de las células extraídas del bazo y NM, se analizaron las Tregs y sus moléculas de superficie TIM-3 y PD-1 mediante citometría de flujo (Fig. 11).

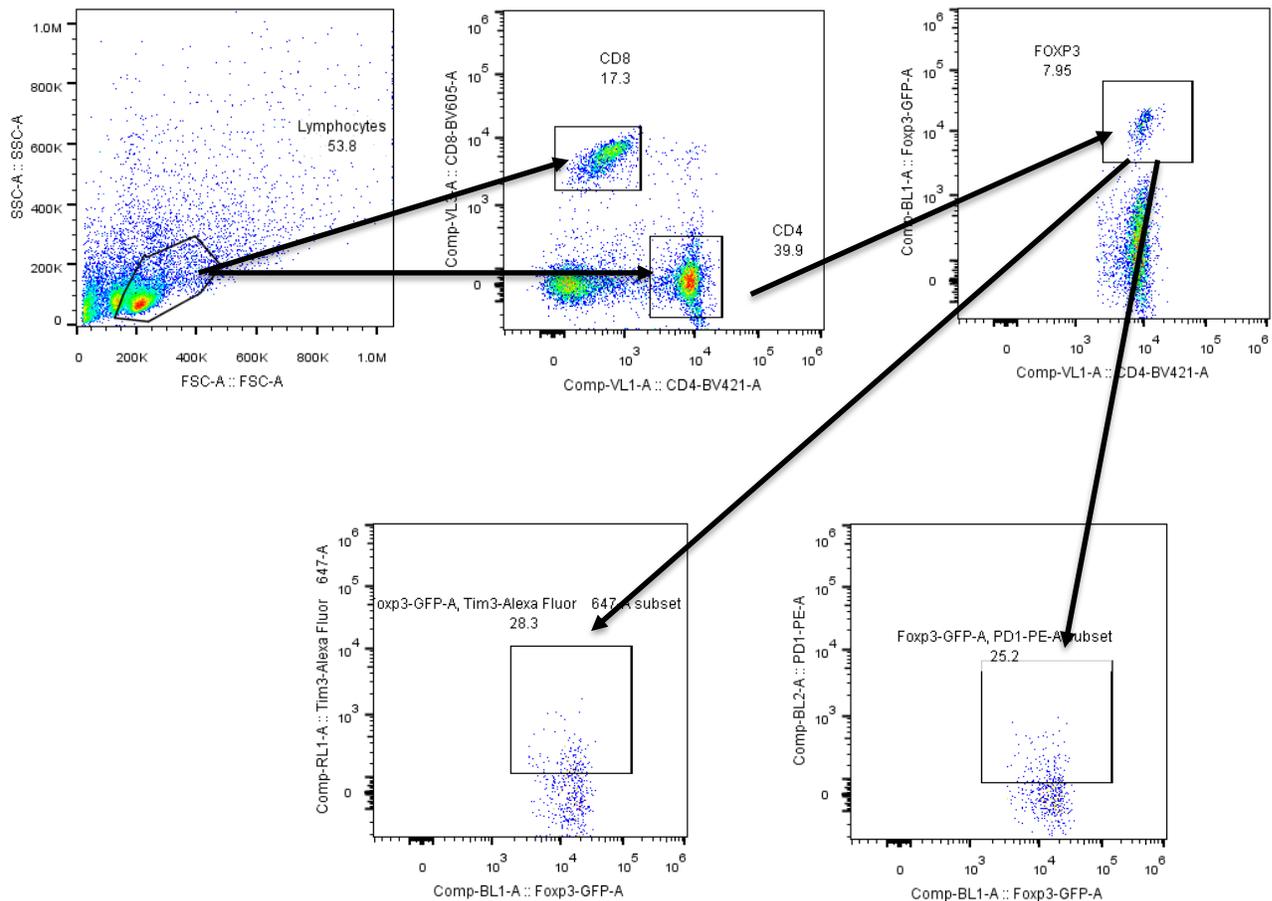
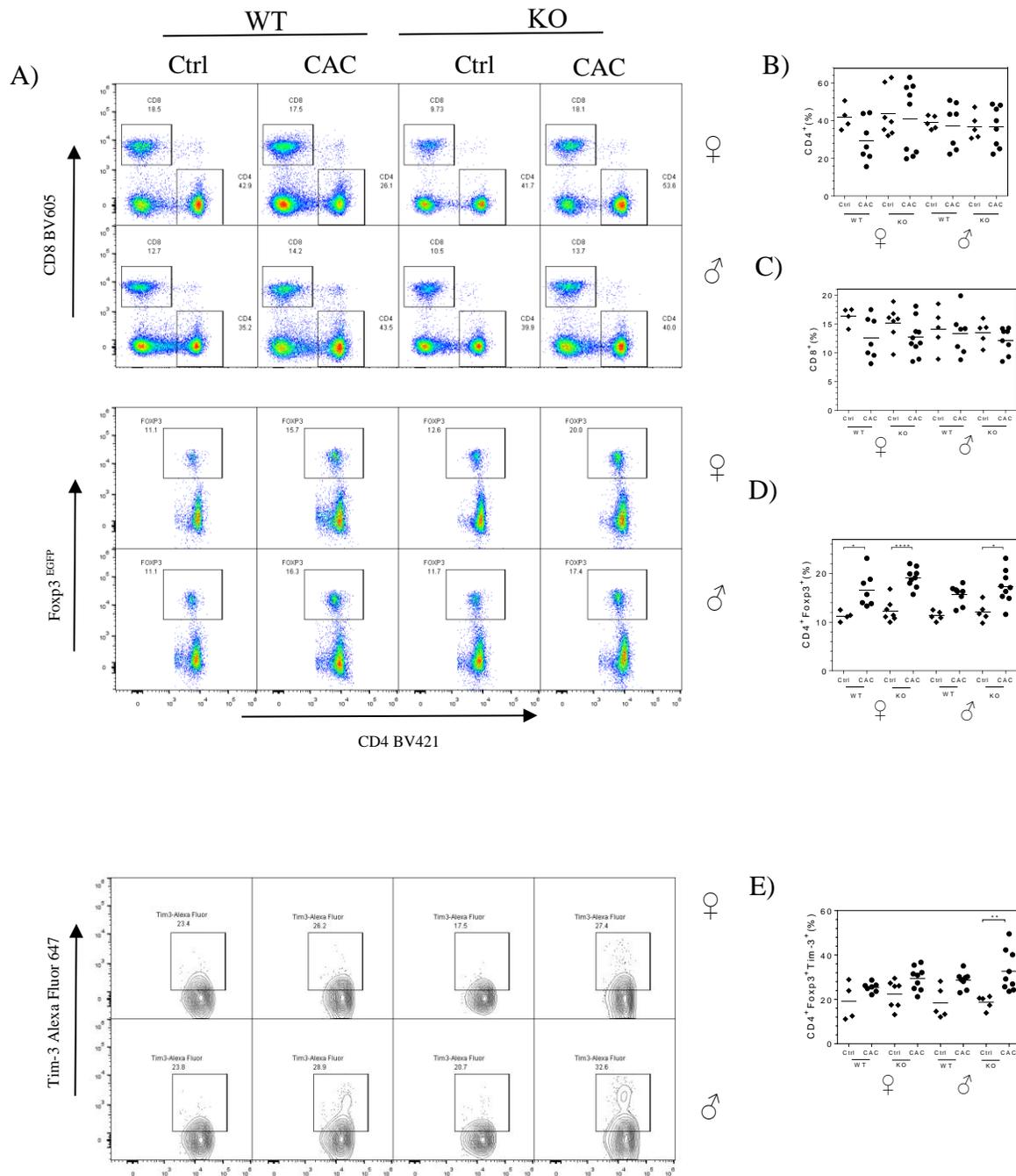


Figura 11. Plot representativo de la obtención de células CD4+, CD8+, CD4+Foxp3+, CD4+Foxp3+Tim-3+, CD4+Foxp3+PD-1+.

De las células de bazo, los ratones Ctrl WT y Ctrl KO sin importar su sexo, presentaron los porcentajes más altos de las células CD4⁺ y CD8⁺ (Fig. 12A-C). Los ratones WT y KO con CAC, presentaron porcentajes más elevados de las células CD4⁺Foxp3⁺, CD4⁺Foxp3⁺Tim-3⁺ y CD4⁺Foxp3⁺PD-1⁺ con respecto a los ratones WT y KO controles (Fig. 12A, D-F). En ratones CAC WT y CAC KO, los porcentajes de las células Tregs, así como sus moléculas de superficie

incrementan, sin embargo, estos porcentajes son muy similares entre el grupo WT y el KO, por lo que no presentan diferencias significativas entre sí.



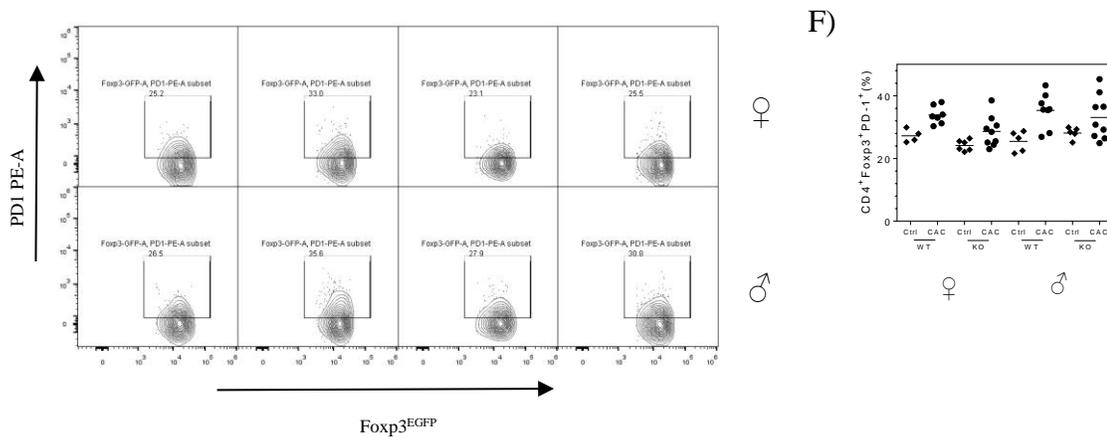


Figura 12. Las células Tregs y sus moléculas de superficie de las células de bazo aumentan en los grupos con CAC. A) Density-plots representativos del porcentaje de células CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺Foxp3⁺, CD4⁺Foxp3⁺Tim3⁺, y CD4⁺Foxp3⁺PD1⁺. B) Datos totales de dos experimentos independientes del porcentaje y número de células CD4⁺, C) CD8⁺, D) CD4⁺Foxp3⁺, E) CD4⁺Foxp3⁺Tim3⁺, y F) CD4⁺Foxp3⁺PD1⁺. P<0.05 Prueba ANOVA de una vía con una prueba de comparación múltiple de Tukey.

Debido a que los NM se encuentran en una zona más cercana al colon, que es donde se desarrollan los tumores, se extrajeron las células de los NM y se analizaron por citometría de flujo bajo el mismo criterio que las células del bazo. Las células de los nódulos mesentéricos presentaron una tendencia similar a las células de bazo. Por lo que, los ratones Ctrl WT y Ctrl KO presentaron porcentajes más altos de células CD4⁺ y CD8⁺ con respecto a los grupos con CAC (Fig. 13A-C). Los ratones CAC WT y CAC KO sin importar el sexo, tuvieron porcentajes más altos tanto de las células Tregs, así como de las moléculas de superficie Tim-3 y PD-1 con respecto a los ratones Ctrl WT y Ctrl KO (13A, D-F). Estos datos sugieren que las Tregs no juegan un papel importante en el desarrollo de la tumorigénesis en ratones ausentes de IFN γ durante el CAC.

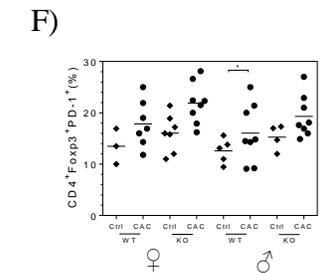
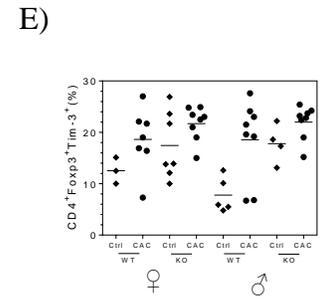
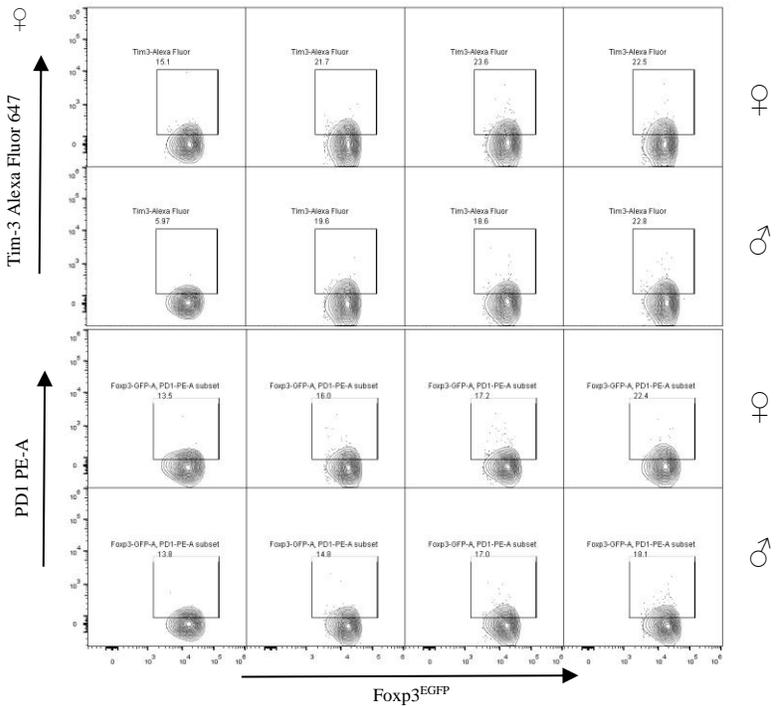
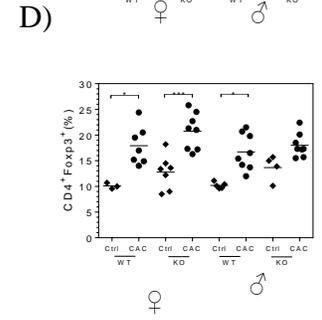
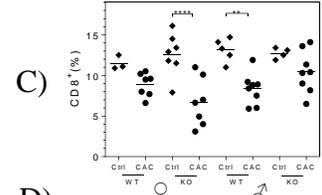
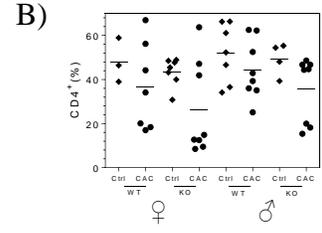
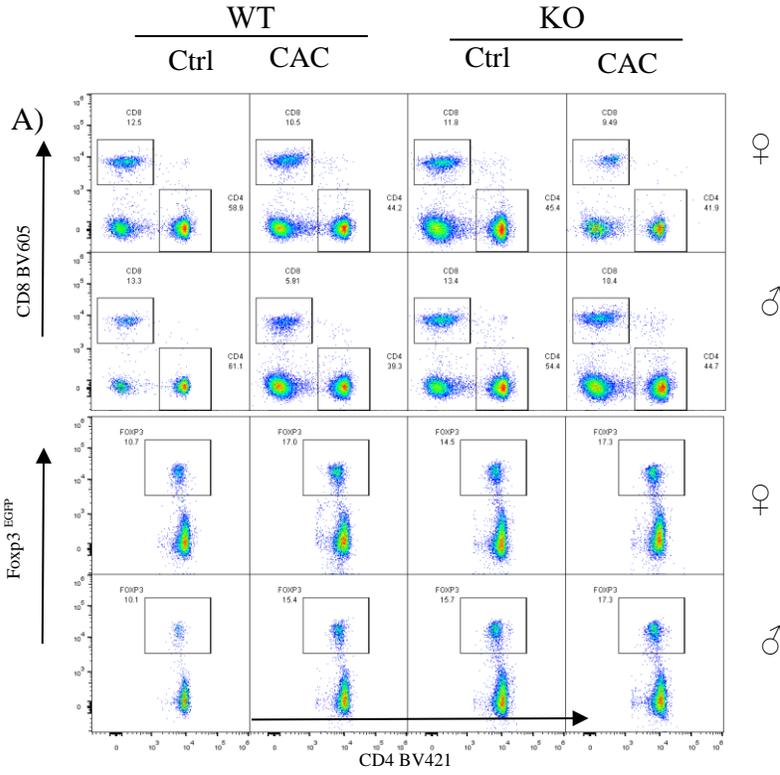
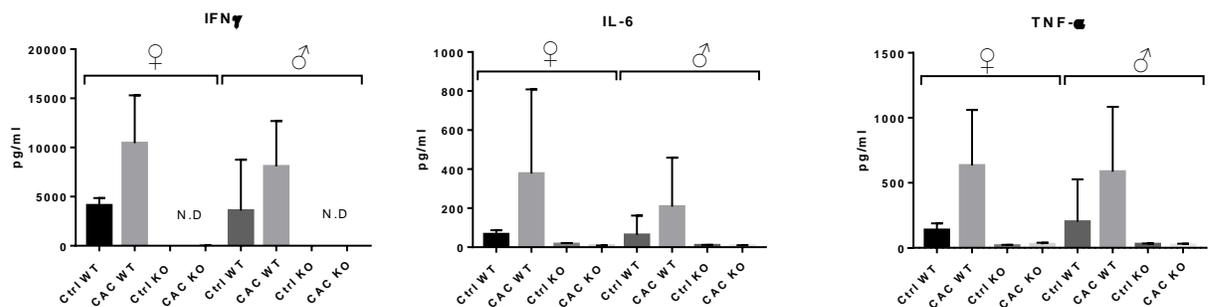


Figura 13. Las células Tregs y sus moléculas de superficie de las células de NM aumentan en los grupos con CAC. A) Density-plots representativos del porcentaje de células CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺Foxp3⁺, CD4⁺Foxp3⁺Tim3⁺, y CD4⁺Foxp3⁺PD1⁺. B) Datos totales de dos experimentos independientes del porcentaje y número de células CD4⁺, C) CD8⁺, D) CD4⁺Foxp3⁺, E) CD4⁺Foxp3⁺Tim3⁺, y F) CD4⁺Foxp3⁺PD1⁺. P<0.05 Prueba ANOVA de una vía con una prueba de comparación múltiple de Tukey.

7.4. La ausencia de citocinas inflamatorias puede ser la causa del aumento de tumores

Para determinar el perfil de las citocinas inflamatorias, antiinflamatorias y de respuesta Th17 en los grupos experimentales, se realizó la cuantificación de las citocinas del sobrenadante de cultivo de las células de bazo estimuladas con α -CD3. En los ratones CAC WT sin importar el sexo, se incrementaron las citocinas inflamatorias, antiinflamatorias y de respuesta Th17 en comparación de los ratones Ctrl WT (Fig. 14). Se observó ausencia en la producción de IFN- γ y una reducción en la producción de IL-6 y TNF- α en los ratones Ctrl KO y CAC KO. Asimismo, en los ratones CAC KO las citocinas Th17 disminuyen ligeramente en comparación con los Ctrl KO (Fig. 14). Estos resultados sugieren que la ausencia de citocinas inflamatorias en el desarrollo de CAC puede ser la causa del incremento en la tumorigénesis.



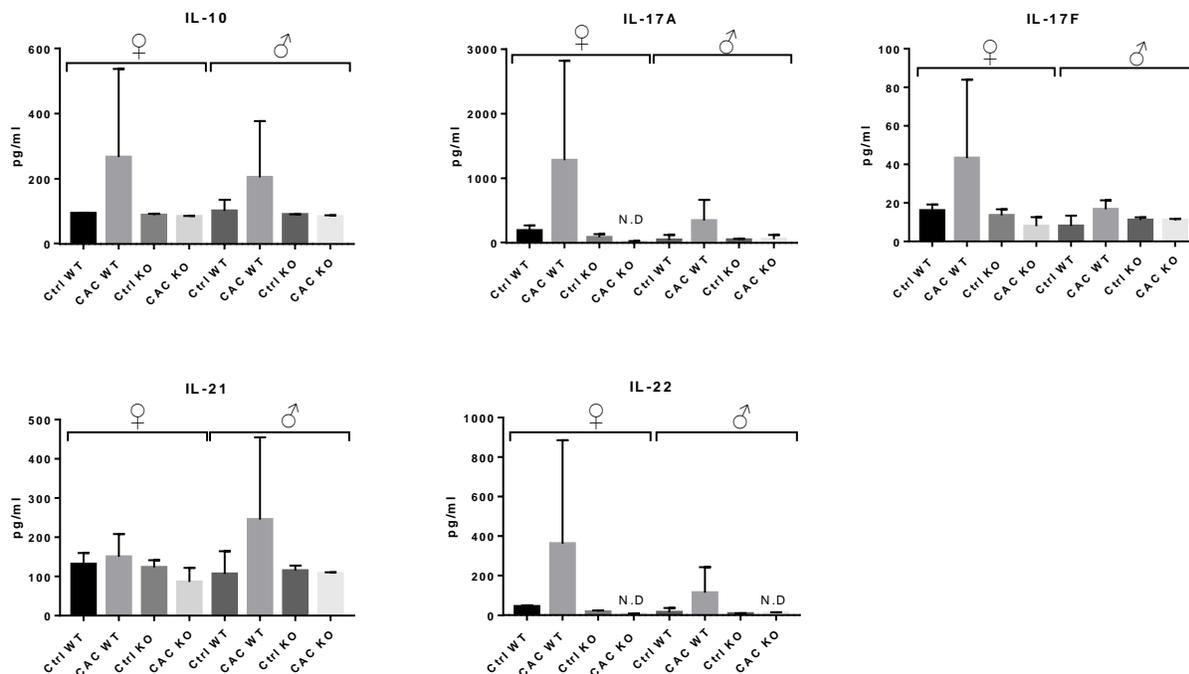


Figura 14. Las citocinas inflamatorias, antiinflamatorias y de respuesta Th17 se incrementan con ratones CAC WT. Datos totales de dos experimentos independientes. $P < 0.05$ Prueba ANOVA de una vía con una prueba de comparación múltiple de Tukey.

7.5. Generación de ratones Foxp3 knock-in/ CD124 KO

7.5.1. Se observan ratones dobles a partir de la tercera generación

Con la finalidad de tener una mejor comprensión acerca de las diversas moléculas involucradas en el cáncer de colon, además de realizar los experimentos en los ratones $IFN\gamma$ KO, se generó una nueva cepa de ratón Foxp3 Knock-in/ CD124 KO, para su posterior estudio en el CAC.

Para determinar la probabilidad en la que se obtendrían los ratones dobles transgénicos, se utilizaron cuadros de Punnett. En el apartado 1.3 se menciona que el factor de transcripción Foxp3 está ligado al cromosoma X. Para empezar la cruce F1, se utilizó una hembra Foxp3 y un macho CD124KO. Se confirmó

una descendencia 100% heterocigota para *Foxp3* (Fig. 15A). A continuación, para la segunda generación se utilizó una hembra *Foxp3* y un macho heterocigoto obtenido de la primera generación, en la cual se tendría un 50% de probabilidad de tener una descendencia homocigota para *Foxp3* (Fig. 15B).

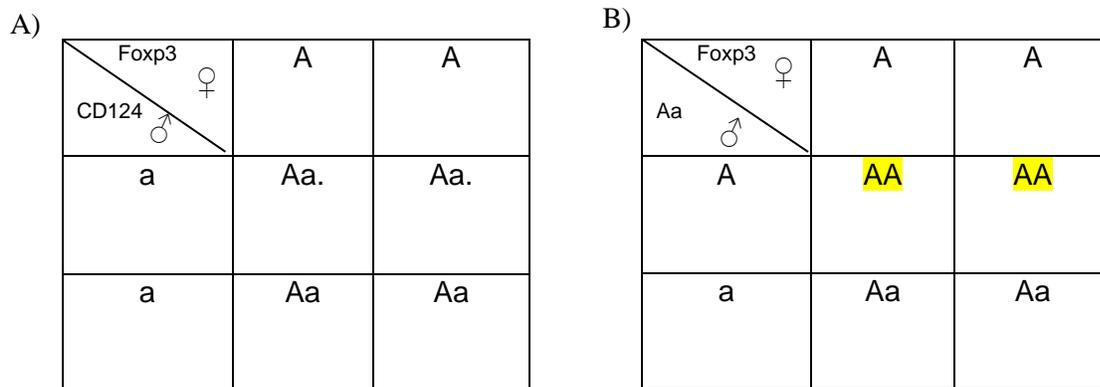


Figura 15. Cuadros de Punnet para determinar la descendencia homocigota para *Foxp3*. A) Primera generación. B) Segunda generación. Cromosoma X^{EGFP} (A), cromosoma X (a).

El gen CD124 ha sido mapeado en el cromosoma 7 del ratón (apartado 1.5.2), por lo cual, para la selección de este gen no se tomó en cuenta el sexo de los animales. Además, como se mencionó en la introducción, para la generación de ratones KO comúnmente se utiliza la neomicina, la cual impide la transcripción de cierto gen, en este caso CD124. Como ya se había mencionado, para la primera generación se utilizó una hembra *Foxp3* y un macho CD124 KO, y en la F1 se observó una descendencia totalmente heterocigota para CD124 (Fig. 16A). En la segunda generación se utilizó una hembra *Foxp3* y un macho heterocigoto de la primera generación, en la cual se observó una descendencia 50% homocigota y 50% heterocigota para CD124 (Fig. 16B). Para la tercera generación se tomó una hembra heterocigota y un macho heterocigoto de la

segunda generación, con lo cual se obtendría un 25% de probabilidad para tener una descendencia homocigota para CD124KO (Fig. 16C). Por lo tanto, los ratones dobles transgénicos Foxp3 knock-in/CD124 KO se observaron a partir de la tercera generación. Finalmente, para preservar y aumentar el número de ratones dobles transgénicos se realizó una cuarta generación con los ratones homocigotos CD124KO obtenidos en la tercera generación, donde ya observa descendencia totalmente homocigota CD124KO (Fig. 16D).

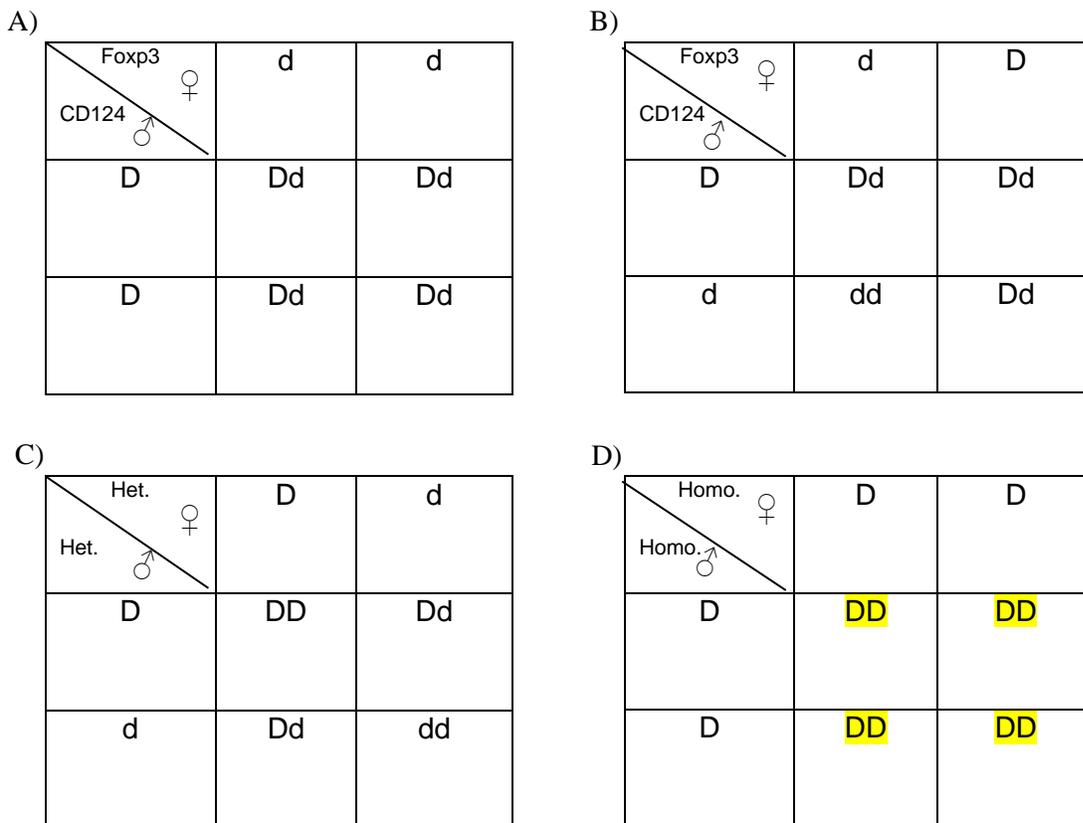


Figura 16. Cuadros de Punnet para determinar la descendencia homocigota para CD124KO. A) Primera generación. B) Segunda generación. C) Tercera generación. D) Cuarta generación. CD124 (d), CD124KO o cassette de neomicina (D), Heterocigoto (Het.), Homocigoto (Homo.).

7.5.2. Detección del genotipo CD124

Como se mencionó en el apartado 6.7.3 la detección del genotipo CD124 se realizó mediante PCR. Se sabe que el cassette de neomicina de un ratón CD124KO pesa 471Kb y el gen CD124 pesa 600Kb. Se realizaron PCR de cada generación de los ratones para poder seleccionar al ratón adecuado.

Los ratones CD124KO se obtuvieron del bioterio de la FESI, de los cuales se realizó el PCR para visualizar el cassette de neomicina y corroborar que los animales eran los correctos (Fig. 17A). Los ratones fueron seleccionados de acuerdo a los cuadros de Punnet mencionados en el apartado 7.5.1. En la generación 1, se tuvieron 4 ratones totalmente heterocigotos (Fig. 17B). En la generación 2, se observaron ratones heterocigotos CD124 y WT (Fig. 17C) y por último en la generación 3 ya se observa el ratón CD124KO (Fig. 17D).

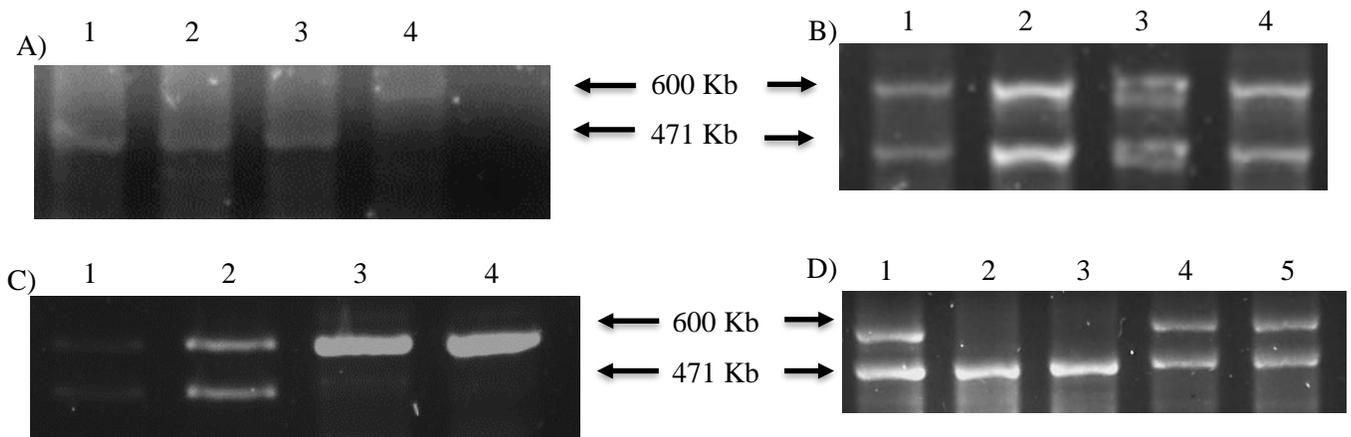


Figura 17. Geles representativos de cada generación del ratón *Foxp3* knock-in/CD124KO. A) Amplicones de ratones CD124KO. B) Generación 1. C) Generación 2. D) Generación 3. Ratón (1, 2, 3, 4, 5).

7.5.3. Detección de la proteína verde fluorescente.

Se confirmó mediante citometría de flujo que los ratones hembras *Foxp3* utilizados en las cruza, así como su posterior descendencia expresaban la proteína verde fluorescente. A continuación, se muestra Dot-plots representativos de los ratones doble transgénicos obtenidos en la tercera generación (Fig. 18) y analizados por citometría de flujo. Se seleccionó por tamaño y granularidad a los linfocitos (Fig. 18A), de los cuales se seleccionaron a las células $CD4^+$ (Fig. 18B), y posteriormente a las células $CD4^+Foxp3^+$ (Fig. 18C). Los ratones doble transgénicos presentaron un porcentaje de Tregs de un 6-10%, lo cual se encuentra en los rangos normales.

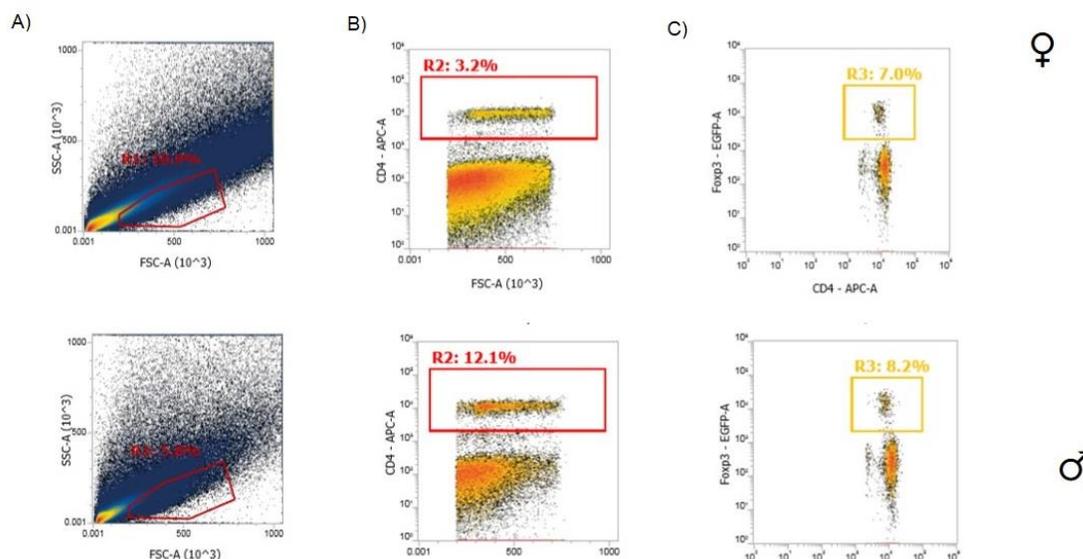


Figura 18. Dot-plots representativos de células Tregs de los ratones de la cruce *Foxp3* knock-in/*CD124* KO. A) Linfocitos T. B) Linfocitos $CD4^+$. C) Linfocitos $CD4^+Foxp3^+$ o células Tregs.

8. Discusión

La respuesta inmune en el intestino está en una constante activación y se polariza hacia un perfil inflamatorio, aunque esto puede variar dependiendo de factores genéticos o ambientales (León et al. 2006). En condiciones de homeostasia, la respuesta inflamatoria está regulada por el balance de citocinas con actividad proinflamatoria producidas por células T tanto de la lámina propia, así como de la mucosa (León et al., 2006). Sin embargo, se ha visto que en las enfermedades inflamatorias del intestino (IBD) las citocinas proinflamatorias aumentan (León et al., 2006). En los pacientes con colitis ulcerosa (UC) los niveles de metilación del IFN γ se encuentran reducidos, lo cual sugiere que los cambios epigenéticos en los patrones de metilación de IFN γ puede ser un punto de referencia de la inflamación en el intestino (León et al., 2006; Camoglio et al., 1998; Gonsky et al., 2011).

En el cáncer de colon se sabe que existe una correlación bien definida entre un microambiente alterado con la inflamación crónica; cuando se presenta un desequilibrio de las citocinas inflamatorias en el colon, se puede favorecer la tumorigénesis (Kosmidis et al., 2018). Se ha observado en tumores subcutáneos y principalmente orto-tópicos de CCR el incremento de citocinas inflamatorias y de moléculas citotóxicas como: IFN γ , IL-6, IL-2 y granzima B, respectivamente, lo cual sugiere que el sitio donde se localiza el CCR juega un papel importante en la secreción de citocinas inflamatorias (Zhao et al., en 2017).

En el presente trabajo se encontró que, en ratones hembras y machos deficientes de IFN γ inducidos con CAC, existe una mayor progresión de la enfermedad debido a que los ratones IFN γ KO (principalmente machos), presentaron el colon más reducido, mayor número de tumores y mayor destrucción de tejido. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Wang et al en 2014, donde

observaron que en ratones $\text{IFN}\gamma^{+/-}$ bajo un modelo de cáncer de colon esporádico, existe un mayor número de tumores, presencia del desarrollo adenoma-carcinoma, sangrado anal y aproximadamente el 50% de sus ratones murieron por obstrucción intestinal. Wang et al., 2014 también observaron que la delección del $\text{IFN}\gamma\text{R1}$ promovió significativamente la proliferación de células de cáncer de colon por medio de la activación de las vías de señalización de Wnt/ β -catenina, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), así como de la Cinasa regulada por señal extracelular (ERK)1/2. La señalización de Wnt1 activa la vía de señalización de β -catenina, la cual promueve el crecimiento celular y la proliferación en varios tipos de cáncer incluyendo el CRC (Yoshida et al., 2015). EGFR y ERK juegan un rol importante en la proliferación y diferenciación celular (Wells, 1999; Cai et al., 2002). Algunos autores han señalado al $\text{IFN}\gamma$ como un blanco potencial en la inmunoterapia contra el cáncer, se ha visto en líneas de cáncer de ovario que los recombinantes de $\text{IFN}\gamma$ humano pueden poseer actividad anti-proliferativa, inhibiendo el crecimiento o aumentando la apoptosis mediante autofagia (Razaghi et al., 2017). De igual manera, en líneas de cáncer de colon mutadas con APC se suprime la proliferación celular mediante la administración de $\text{IFN}\gamma$ (Wang et al, 2014). Inclusive se ha sugerido la posible administración de bajas dosis del $\text{IFN}\gamma$ antes de cualquier terapia como tratamiento para el cáncer de colon (Kosmidis et al., 2018).

Como se mencionó en la introducción (apartado 1.4.1), la señalización de $\text{IFN}\gamma$ activa la transcripción de IRF1, e IRF1 promueve la transcripción de IRF2 (Raza y Merlino, 2011). La expresión de IRF2 ha sido relacionada con una actividad oncogénica, la cual puede atenuar la actividad de $\text{IFN}\gamma$, a través de la inhibición de la transcripción de $\text{IFN}\gamma\text{R1}$ (Raza y Merlino, 2011; Wang et al., 2008). En

líneas celulares de cáncer de esófago, se ha observado reducción en la expresión de IRF1 y sobreexpresión de IRF2, lo que se asociada con la promoción de la proliferación celular mediante la estimulación de la histona H4 (Wang et al., 2007). La histona H4 es un regulador del ciclo celular y aumenta en la fase de transición de G1 a S para promover la replicación de DNA (Aziz et al., 1998). Wang et al en 2008, estudiaron en líneas celulares de cáncer de esófago, que la administración de IFN γ a elevadas concentraciones (10ng/ml), induce apoptosis e inhibe la proliferación celular, mientras que la administración de IFN γ a bajas concentraciones (0.05ng/ml) decrece la expresión de IFN γ R1 e induce la expresión de IRF2, promoviendo la proliferación e inhibiendo la apoptosis. Wang et al 2008, también observaron que al suprimir IRF2 en las células de cáncer de esófago que poseían bajas concentraciones de IFN γ , el crecimiento celular se inhibe y existe un proceso de apoptosis. Lo anterior, podría ser una explicación del porque los ratones KO son más susceptibles al desarrollo del CAC, ya que al encontrarse ausente el IFN γ podría decrecer la expresión de IRF1 y aumentar la expresión de IRF2, lo cual estimularía la proliferación celular e inhibiría la apoptosis. De manera similar, Liao et al., 2019 observaron en un modelo CRC de ratón, mediante alelos inducibles de KRAS (por medio de doxiciclina y alelos condicionales nulos de APC y TP53), una disminución en las respuestas del IFN α , IFN γ y en la expresión IRF2. Sin embargo, al inducir la expresión de IRF2, se regula la vía de señalización del IFN γ y existe una correlación positiva en la eficacia de terapias con α -PD1. Debido a lo anterior, es importante contar con estudios que tengan un mayor detalle sobre el desarrollo del CAC en ausencia del IFN γ , así como la posible evaluación de los factores de transcripción IRF1 y IRF2, la apoptosis y la proliferación celular.

En la introducción se mencionó al IFN γ como el principal activador de macrófagos. En los últimos años se ha visto que los macrófagos (Macrófagos Asociados a Tumores, TAMs) son el principal componente de las células infiltradas en tumores primarios y metastásicos (Erreni et al., 2011). Sin embargo, el papel de los macrófagos en el cáncer de colon es controversial; algunos estudios han indicado que los TAM parecen tener actividad antitumoral y se relaciona con una mejor supervivencia (Erreni et al., 2011). Por el contrario, otros estudios sugieren que la infiltración de macrófagos se correlaciona con la progresión del tumor, crecimiento del tumor y resistencia a drogas antitumorales (Cai et al., 2019). Aunado a lo anterior, es importante posteriores estudios del papel de los macrófagos en ausencia del IFN γ y durante el cáncer de colon asociado a colitis.

En la actualidad es bien sabido que las Tregs tienen un papel central en la homeostasis intestinal mediante la secreción de IL-10, lo cual induce supresión de la inflamación exacerbada. La importancia de las Tregs productoras de IL-10 en el intestino se ha demostrado porque su alteración da como resultado el desarrollo de colitis espontánea (Luu et al., 2017; Tanoue et al., 2016). Sin embargo, el papel de las Tregs en el cáncer de colon es controversial, algunos autores han señalado que la acumulación de Tregs en el tumor se asocia con un mejor pronóstico al suprimir la inflamación crónica en el microambiente (Mougiakakos, 2011), mientras que otros han señalado que su acumulación podría suprimir células de la respuesta inmune con propiedades antitumorales como células T CD4⁺ efectoras, CD8⁺ y NK (Zhang et al., 2015, Olgún et al., 2018). Por lo cual en el presente trabajo se decidió estudiar el papel de Tregs en ausencia del IFN γ durante el desarrollo de cáncer de colon asociado a colitis.

En la presente tesis, se observó que, en los ratones con CAC, los porcentajes de las células Tregs y sus moléculas de superficie como PD-1 y TIM-3 en bazo y nódulos mesentéricos se encontraban incrementados con respecto al control. Estos resultados son similares a los presentados por Olgúin et al., en 2018, en donde se observó que los porcentajes de Tregs y sus moléculas de superficie como PD-1, TIM-3 y CD127 aumentaban conforme el CAC avanzaba, haciendo a las Tregs más supresoras. Del mismo modo, Olgúin et al 2018, observó que al reducir parcialmente las Tregs en un 50-57%, los ratones con CAC presentaban menor reducción del colon, menor número de tumores y mayor número de infiltrados inflamatorios en mucosa y vellosidades, pero no en el músculo intestinal. El aumento de Foxp3 en las Tregs, así como sus moléculas de superficie, Tim-3 y PD-1 ha sido asociado con una mayor capacidad de supresión de las Tregs, lo cual podría estar promoviendo el crecimiento tumoral, al suprimir células del sistema inmune con propiedades antitumorales como las células T efectoras (Teff) y CD8+ (Olgúin et al., 2018; Zhang et al., 2015). De manera similar, Betts et al., en 2012 observaron en pacientes con CRC, que la expresión de Foxp3 aumentó y en consecuencia la supresión de las Tregs dirigida hacia los antígenos asociados a tumores como 5T4 y antígeno embrionario (CEA) se incrementa. Estos antígenos 5T4 y CEA tienen una expresión aumentada en CRC y una expresión basal en el tejido sano. Posteriormente Betts et al., 2012 observaron una disminución de la expresión de Foxp3 después de la remoción del tumor, así como un aumento en la respuesta específica de antígenos asociados a tumores, sugiriendo que los tumores provocan que la población de células Tregs aumenten, induciendo supresión de las respuestas específicas de las células T CD4⁺ hacia los antígenos asociados a tumores. En 2013, Girardin et al observaron en pacientes con CRC, que las células Tregs se encontraban aumentadas en tumores y conforme

aumentaba la profundidad del tumor existió un aumento del número de células Tregs, mientras que disminuían las células Teff, existiendo un gradiente cambiante de células T a medida que se desarrolla el tumor. Los resultados obtenidos en la presente tesis, sugieren que el incremento de las células Tregs en bazo y nódulos mesentéricos se relacionan con un peor pronóstico en los ratones con CAC, ya que las células Tregs podrían estar suprimiendo células del sistema inmune con propiedades antitumorales como las Teff, células T CD8⁺ y NK.

Como se mencionó anteriormente, TIM-3 se expresa por células T CD4⁺ y en células CD8⁺ agotadas o disfuncionales, cuando TIM-3 se une con galactina-9 produce muerte celular (Monney et al., 2002; Sakuishi et al., 2013). Por lo tanto, TIM-3 funciona como una molécula inhibidora de inflamación en las células Th1. Se ha demostrado que el bloqueo de la señalización de TIM-3 eleva la producción de IFN γ y TNF- α (Sun et al., 2017). Se ha observado en ratones con cáncer de cabeza y cerebro, el cual es caracterizado por una fuerte supresión del sistema inmunológico, y por ende incrementos en los porcentajes de las células Tregs, que al bloquear TIM-3, se reduce el porcentaje de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ así como la expresión de TIM-3 en las células Tregs, sugiriendo que TIM-3 podría estar implicada en la modulación de las células Tregs (Liu et al., 2018). Las células Tregs intra-tumorales que se caracterizan por la expresión de TIM-3, ejercen funciones inmunosupresoras más fuertes, mediante el aumento de la expresión de moléculas efectoras como IL-10, granzima A, granzima G y perforina en comparación con las células Tregs⁺TIM3⁻ (Sakuishi et al., 2013). En carcinoma hepatocelular, la expresión de TIM-3 está relacionada con un peor pronóstico, ya que inhibe la inmunidad tumoral mediante el agotamiento de células Teff, aumenta la supresión de

células Tregs, facilita la polarización de TAMs y promueve la proliferación celular, la cual facilita la migración e invasión del carcinoma hepatocelular (Liu et al., 2018). En los resultados obtenidos en el presente trabajo se observó que las células $CD4^{+}Foxp3^{+}TIM-3^{+}$ aumenta en los grupos con CAC, especialmente en los ratones KO CAC, lo cual nos sugiere que las células Tregs son más supresoras en los ratones KO con CAC y en consecuencia presentan mayor supresión hacia las células inmunes con actividad antitumoral, lo cual explica la reducción de las células $CD8^{+}$ durante el CAC así como el mayor número de tumores por parte de los ratones KO CAC.

Las células Tregs que se caracterizan por la expresión de PD-1, que es una molécula que ejerce un rol en la tolerancia de las células T, induciendo anergia (Gianchecci y Fierabracci). La señalización de PD-1 ayuda al mantenimiento de la capacidad supresora de las células Tregs (Gianchecci y Fierabracci, 2018). Las células tumorales pueden expresar el ligando de PD-1 (PD-L1), lo cual brinda la capacidad de inhibir la actividad antitumoral de las células $CD8^{+}$ y promueve que el tumor evada la respuesta inmune (Gianchecci y Fierabracci, 2018). En tumores en estado primario de CRC, se ha observado baja expresión de PD-L1; sin embargo, en estados de metástasis los niveles de PD-L1 aumentan, sugiriendo que la vía de regulación de PD-1 es alterada en el trascurso de displasia a metástasis durante el desarrollo de CRC (Wang et al., 2017). Se ha observado, que los pacientes con CRC deficientes en los mecanismos de reparación mismatch, obtuvieron resultados positivos en el bloqueo de PD-1 en comparación con los pacientes con tumores pro-eficientes en el mecanismo de regulación de mismatch (Le et al., 2015). Li et al., 2017 observaron en pacientes con cáncer de mama, una expresión alta de PD-L1 con mayor número de infiltrados de células Foxp3 positivas, lo cual se relaciona con

un peor pronóstico, sugiriendo que el bloqueo de PD-L1/PD-1 de manera simultánea con la depleción de células Tregs podría ser una terapia eficaz en estos pacientes (Li et al., 2017). Se ha observado que el bloqueo simultaneo de las vías de señalización de TIM-3 y PD-1 durante el cáncer ha mostrado mejores resultados que el bloqueo de solo una vía, restaurando la función efectora de células CD8⁺ (Sakuishi et al., 2013). Sakuishi et al., en 2010 observaron que al bloquear las vías de señalización de TIM-3 y PD-1 en ratones con CRC, existe una reducción dramática en el crecimiento del tumor, se incrementó la producción de IFN γ por parte de los linfocitos infiltrados de tumores y el 50% de los ratones mostró regresión completa del tumor. En el presente trabajo se decidió evaluar el porcentaje de células CD4⁺Foxp3⁺PD-1⁺, y nosotros observamos que en los ratones con CAC el porcentaje de células Tregs que expresan PD-1 aumenta, similar a lo que ocurre con las células CD4⁺Foxp3⁺TIM-3⁺, esto refuerza lo anteriormente mencionado, ya que las células Tregs se podrían encontrar con mayor capacidad supresora durante el CAC, lo cual podría estar favoreciendo el desarrollo del CAC.

Los porcentajes de las células CD4⁺Foxp3⁺, CD4⁺Foxp3⁺TIM-3⁺ y CD4⁺Foxp3⁺PD-1⁺ obtenidos de los ratones WT con CAC y de los KO con CAC fueron muy similares entre ambos grupos, lo cual nos sugiere que tal vez las células Tregs no participan en ausencia del IFN γ en el CAC, por lo menos a nivel sistémico y linfático. Sin embargo, aún desconocemos como se encuentran las Tregs en el tumor en ausencia del IFN γ durante el desarrollo del CAC, por lo que sugerimos caracterizar el perfil de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺, Th1, Th2, Th17 y NK de células de intestino en ausencia del IFN γ durante el desarrollo de CAC.

Por último, en el presente trabajo se decidió cuantificar citocinas inflamatorias, antiinflamatorias y de perfil Th17. Las células Th17 secretan citocinas como IL-17A, IL-17F, IL-21 y IL-22 (Jiang et al., 2013). Recientemente se ha observado que existe un vínculo estrecho entre las células Th17 y las células Tregs, ya que se ha visto que las células Tregs son capaces de producir IL-17 bajo condiciones de inflamación exacerbada (Li y Boussiotis, 2013; Zhou et al., 2008). Girardin et al., 2013 observaron en pacientes con cáncer de colon, porcentajes altos de células Foxp3⁺IL-17⁺ y bajos porcentajes de Teff en comparación con pacientes sanos. Se ha sugerido que la presencia de células inflamatorias Th17 pueden favorecer el desarrollo del tumor, creando un ambiente tumoral alto en las células Tregs, pero agotado en células antitumorales (Girardin et al., 2013). Además, se ha sugerido que el incremento de la IL-17 en CRC, puede estar promoviendo la angiogénesis mediante la estimulación del factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG) en células cancerígenas (Liu et al., 2011). Jiang et al., 2013, observaron en pacientes con CCR la expresión elevada de IL-22, la cual se asoció con la activación del factor de transcripción oncogénico STAT3. Jiang et al., 2013 también observaron en ratones desnudos con CCR que la IL-22 puede promover el crecimiento tumoral e incluso inducir metástasis a través de la fosforilación de STAT3 y de la activación de la ciclina D y VEGF.

Nuestros resultados muestran que las citocinas de perfil de Th17 como IL-17A, IL-17F, IL-21 y IL-22 aumentan en los ratones WT con CAC, lo cual podría asociarse con la activación de diversos genes como STAT3 o VEGF creando un microambiente favorable para el desarrollo del tumor. Curiosamente también observamos que en los ratones KO con CAC no aumentan las citocinas de perfil Th17 e incluso disminuyen ligeramente. Lo cual sugiere que al modificarse

alguna vía de señalización inflamatoria mediante la eliminación de alguna citocina como el IFN γ , podría modificarse otras vías de señalización promotoras de la inflamación como lo es el perfil Th17. De manera similar, Hyun et al., 2012 observaron en ratones deficientes de IL-17A con CAC, que existe una reducción en el número y tamaño de los tumores, así como disminución de las citocinas IFN γ , TNF- α e IL-6; por lo que la IL-17 actúa como un factor promotor de células tumorales y su ausencia afecta la expresión de citocinas inflamatorias.

9. Conclusión

Los datos obtenidos en la presente sugieren que la presencia del IFN γ y su señalización podría tener un papel protector contra el cáncer de colon, ya que los ratones deficientes de IFN γ presentan mayor número y tamaño de los tumores, así como mayor daño histológico, especialmente los ratones machos. De igual manera, nuestros datos sugieren que las células Tregs no participan en el desarrollo tumoral incrementado que se observó en ausencia del IFN γ durante el CAC. Finalmente, sugerimos una participación relevante de las células Th17 en el modelo IFN γ KO CAC, lo cual será demostrado en la continuidad del presente proyecto.

10. Referencias

- Aziz, F., Wijnen, A.J.V. Stein, J.L. and Stein G.S. 1998. HiNF-D (CDP-cut/CDC2/Cyclin A/pRB-Complex) Influences the timing of IRF-2-dependent cell cycle activation of human histone H4 gene transcription at the G1/S phase transition. *Journal of Cellular Physiology*. 177:453-464.
- Becker, C., Stoll, S. Bopp, T. Schmitt, E. and Jonuleit, H. 2006. Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Medical microbiology and immunology*. 195(3):113-124.
- Betts, G., Jones, E. Junaid, S. El-Shanawany, T. Scurr, M. Mizen, P. and Godkin, A. 2011. Suppression of tumour-specific CD4⁺ T cells by regulatory T cells is associated with progression of human colorectal cancer. *Gut*. 61(8): 1163-1171.
- Bouabe, H., and Okkenhaug, K. 2013. Gene targeting in mice: a review. *Methods Mol Biol*. 1064:315-336.
- Broere, F., Apasov, S.G. Sitkovsky, M.V. and Eden, W.V. 2011. T cell subsets and T cell-mediated immunity. *Principles of Immunopharmacology*. 728 p.
- Burbano, L.D.F., Manrique, M.A. Chávez, G.M.A. Pérez, C.F Hernández, V.N.N. Escandón, E.Y.M. Gómez, U.J.M. Rubalcaba, M.E.J. Martínez, R.G. Cisneros, A.A. García, R.A. Martínez, G.M.G. y Cerna, C.J. 2016. Epidemiología del cáncer colorrectal en menores de 50 años en el Hospital Juárez de México. *Endoscopia*. 28(4):160-165.

- Camoglio, L., Te Velde, A.A. Tiggers, A.J. Das, P.K. and Van Deventer, S.J. 1998. Altered expression of interferon-gamma and interleukin -4 in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*. 1998(4): 285-290.
- Castro, F., Cardoso, A.P. Madeira, G.R. Serre, K. and Oliveira, M.J. 2018. Interferon-Gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasión. *Frontiers immunology*. 9:847.
- Chávez, S.F.R., Rojas-Lemus, M. Fortoul, G. T.I. y Tenorio, Z.E.P. 2017. Células T reguladoras tímicas: su origen, función e importancia en la salud y la enfermedad. *Rev. De la Facultad de Medicina*. UNAM.
- Chen, S. and Huang E.H. 2014. The colon cancer stem cell microenvironment holds keys to future cancer therapy. *Gastrointestinal surg*. 18(5):1040-1048.
- Cai, J., Xia, L. Li, J. Ni, S. Song, H. and Wu, X. 2019. Tumor-associated macrophages derived TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition in colorectal cancer cells through smad 2, 3-4/snail signaling pathway. *Cancer res treat*. 51(1):252-266.
- Cai, T., Nashida, K. Hirano, T. and Khavari, P.A. 2002. Gab1 and SHP-2 promote RAS/MAPK regulation of epidermal growth and differentiation. *The Journal of Cell Biology*. 159:103-112.
- Deaglio, S., Dwyer, K.M. Gao, W. Friedman, D. Usheva, A. Erat, A. Chen, J-F. Enjyoji, K. Linden, J. Oukka, M. Kuchroo, V.K. Strom, T.B. and Robson, S.C. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *Experimental Medicine*. 204(6):1257-1265.

- Díaz, M.D., Prieto, M.A. Sanz, J.M. Sánchez, L.M.A. y Álvarez-Mon, S.M. 2009. Sistema inmune y cáncer. *Medicine*. 10(28):1900-8.
- Doyle, A., McGarry, M.P. Lee, N.A. and Lee, J.J. 2012. The construction of transgenic and gene Knockout/Knockin mouse models of human disease. *Transgenic res*. 21(2): 327-349.
- Erreni, M., Mantovani, A. and Allavena, P. 2011. Tumor-associated Macrophages (TAM) and inflammation in colorectal cancer. *Cancer microenvironment*. 4:141-154.
- Feagins, L.A., Souza, R.F. and Spechler, J. 2009. Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology & hepatology*. 6:297-305.
- Felmer, R. 2004. Animales transgénicos: pasado, presente y futuro. *Scielo*. 36(2):105-117.
- Giancchetti, E., and Fierabracci, A. 2018. Inhibitory receptors and pathways of lymphocytes: The role of PD-1 in Treg development and their involvement in autoimmunity onset and cancer progression. *Frontiers in immunology*. 9: 2374.
- Girardin, A., McCall, J. Black, M.A. Edwards, F. Phillips, V. Taylor, E.S. Reeve, A. E. and Kemp, R.A. 2013. Inflammatory and regulatory T cells contribute to a unique immune microenvironment in tumor tissue of colorectal cancer patients. *Cancer*. 132(8): 1842-1850.
- Gonsky, R., Deem, R.L. Landers, C.J. Derkowski, C.A. Berel, D. McGovern, D.P.B. and Targan, S.R. 2011. Distinct IFNG methylation in a subset of ulcerative colitis patients based upon reactivity to microbial antigens. *Inflammatory bowel diseases*. 17(1): 171-178.

- González, P.J.L., Duque, G.V.E. y Velásquez-Lopera, M.M. 2010. FOXP3: Controlador maestro de la generación y función de las células reguladoras naturales. *Immunology*. 29(2): 74-84.
- Hickman-Davis, J.M., and Davis, I.C. 2006. Transgenic mice. *Pediatric respiratory reviews*. 7:49-53.
- Hyun, Y.K., Han, D.S. Lee, A.R. Eun, C.S. Youn, J. and Kim, H.Y. 2012. Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis*. 33(4): 931-936.
- Isaacs, A., and Lindenmann, J. 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the royal society B: Biological sciences*. 147(927): 258-267.
- Jiang, R., Wang, H. Deng, L. Hou, J. Shi, R. Yao, M. Gao, Y. Yao, A. Wang, X. Yu, L. and Sun, B. 2013. IL-22 is related to development of human colon cancer by activation of STAT3. *BioMed Central Cancer*. 13:59.
- Juárez-Vázquez, C.I., y Rosales-Reynoso, M.A. 2014. Cáncer colorrectal (CCR): alteraciones genéticas y moleculares. *Gac. Méd. Méx.* 150:154-164.
- Kosmidis, C., Sapalidis, K. Koletsa, T. Kosmidou, M. Efthimiadis, C. Anthimidis, G. Varsamis, N. Michalopoulos, N. Koulouris, C. Atmatzidis, S. Liavas, L. Strati, T.M. Koimtzis, G. Tskalidis, A. Mantalovas, S. Zarampouka, K. Flourou, M. Giannakidis, D.E. Georgakoudi, E. Baka, S. Zarogoulidis, P. Man, Y.G. and Kesisoglou, I. 2018. Interferon- γ and colorectal cancer: an up-to date. *Cancer*. 9(2): 232-238.
- Kröger, A., Köster, M. Schoroeder, K. Hauser, H. and Mueller, P.P. 2002. Activities of IRF-1. *Interferon & cytokine research*. 22(1): 5-14.

- Kumar, P., Bhattacharya, P. and Prabhakar, B.S. 2018. A comprehensive review on the role of co-signaling receptors and Treg homeostasis in autoimmunity and tumor immunity. *Autoimmunity*. 95: 77-99.
- Le, D.T., Uram, J.N. Wang, H. Bartlett, B.R. Kemberling, H. Eyring, A.D. Skora, A.D. Luber, B.S. Azad, N.S. Laheru, D. Biedrzycki, B. Donehower, R.C. Zaheer, A. Fisher, G.A. Crocenzi, T.S. Lee, J.J. Duffy, S.M. Goldberg, R.M. de la Chapelle, A. Koshiji, M. Bhaijee, F. Huebner, T. Hruban, R.H. Wood, L.D. Cuka, N. Pardoll, D.M. Papadopoulos, N. Kinzler, K.W. Zhou, S. Cornish, T.C. Taube, J.M. Anders, R.A. Eshleman, J.R. Vogelstein, B. and Diaz, L.A. Jr. 2015. PD-1 Blockade in tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *The New England Journal of Medicine*. 372(26): 2509-2520.
- León, A.J., Garrote, J.A. y Arranz, E. 2006. Citocinas en la patogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Med clin*. 127(4): 145-152.
- León-Cabrera, S., Vázquez-Sandoval, A. Molina-Gúzman, E. Delgado-Ramirez, Y. Delgado-Buenrostro, N.L. Callejas, B.E. Chirino, Y.I., Pérez-Plasencia, C., Rodríguez-Sosa, M. Olguín, J.E. Salinas, C. Satoskar, A.R. and Terrazas, L.I. 2018. Deficiency in STAT1 signaling predisposes gut inflammation and prompts colorectal cancer development. *Cancers*.10:341.
- Liao, W., Overman, M.J. Boutin, A.T. Shang, X. Zhao, D. Dey, P. Li, J. Wang, G. Lan, Z. Li, J. Tang, M. Jiang, S. Ma, X. Chen, P. Katkhuda, R. Korphaisarn, K. Chakravarti, D. Chang, A. Spring, D.J. Chang, Q. Zhang, J. Maru, D.M. Maeda, D.Y. Zebala, J.A. Kopetz, S. Wang, Y.A. and DePinho, R.A. 2019. KRAS-IRF2 axis drives immune therapy resistance in colorectal cancer. *Cancer cell*. 35:559-572.

- Li, L., and Boussiotis, V.A. 2013. The role of IL-17-producing Foxp3⁺CD4⁺T cells in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clinical immunology*. 148(2):246-253.
- Liu, F., Liu, Y. and Chen, Z. 2018. Tim-3 expression and its role in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hematology & Oncology*. 11:126.
- Liu, J., Duan, Y. Cheng, X. Chen, X. Xie, W. Long, H. Lin, Z. and Zhu, B. 2011. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications*. 407(2): 348-354.
- Liu, J.F., Wu, L. Yang, L.L. Deng, W.W. Mao, L. Wu, H. Zhang, W.F. and Sun, Z.J. 2018. Blockade of TIM3 relieves immunosuppression through reducing regulatory T cells in head and neck cancer. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 37:44.
- Li, X., and Zheng, Y. 2015. Regulatory T cell identity: formation and maintenance. *Trends Immunol*. 36(6): 344-353.
- Li, Z., Dong, P. Ren, M. Song, Y. Qian, X. Yang, Y. Li, S. Zhang, X. and Liu, F. 2016. PD-L1 Expression is associated with tumor FOXP3⁺ regulatory T-Cell infiltration of breast cancer and poor prognosis of patient. *Journal of cancer*. 7(7): 784-793.
- Li, Z., Li, D. Tsun, A. and Li, B. 2015. Foxp3⁺ regulatory T cells and their functional regulation. *Cellular & molecular immunology*. 12:558-565.
- Luu, M., Steinhoff, U. and Visekruna, A. 2017. Functional heterogeneity of gut-resident regulatory T cells. *Clinical & translational immunology*. 6(9): e156.

- Mandapathil, M., Hildorfer, B. Szczepanski M.J. Czytowska, M. Szajnik, M. Ren, J. Lang, S. Jackson, E.K. Gorelik, E. and Whiteside, T.L. 2010. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Biological chemistry*. 285(10): 7176-7186.
- Markman, J.L. and Shiao, S.L. 2015. Impact of the system and immunotherapy in colorectal cancer. *Gastrointestinal Oncology*. 6(2):208-223.
- Mata-Espinoza, D.A., y Hernández-Pando. 2008. Interferón gamma: aspectos básicos, importancia clínica y usos terapéuticos. *Investigación clínica*. 60(5): 421-431.
- McCormick, S.M., and Heller, N.M. 2015. Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. *Cytokine*. 75: 38-50.
- Miyara, M. and Sakaguchi, S. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends in molecular medicine*. 13(3):108-116.
- Monney, L., Sabatos, C.A. Gaglia, J.L. Ryu, A. Waldner, H. Chernova, T. Manning, S. Greenfield, E.D. Coyle, A.J. Sobel, R.A. Freeman, G.J. and Kuchroo, V.K. 2002. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*. 415(6871): 536-541.
- Mookerjee-Basu, J., Chemmannur, S.V. Qin. L. and Dietmar, J.K. 2017. ThPOK, a Key Regulator of T Cell Development and Function. 77 pp. In: Signaling Mechanisms Regulating T Cell Diversity and Function. *CRC press*. New York.
- Mougiakakos, D. 2011. Regulatory T cells in colorectal cancer: From biology to prognostic relevance. *Cancers*. 3(2): 1708-1731

- Nelms, K., Keegan, A.D. Zamorano, J. Ryan, J.J. and Paul, W.E. 1999. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Immunology*. 17:701-738.
- Ohta, A., and Sitkovsky, M. 2014. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Frontiers in immunology*. 5:304.
- Olguín, J.E., Medina-Andrade, I. Molina, E. Vázquez, A. Pacheco-Fernández, T. Saavedra, R. Pérez-Plasencia, C. Chirino, Y.I. Vaca-Paniagua, F. Arias-Romero, L.E. Gutiérrez-Carlos, E.B. León-Cabrera, S.A. Rodríguez-Sosa, M. and Terrazas, L.I. 2018. Early and partial reduction in CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells during colitis-associated colon cancer induces CD4⁺ and CD8⁺ T cell activation inhibiting tumorigenesis. *Cancer*. 9(2): 239-249.
- Ott, T.L., and Ealy, A.D. 2018. Interferons. *Encyclopedia of reproduction*. 2(2):412-416.
- Platanias, L.C. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling. *Nature reviews Immunology*. 5:375-386.
- Pointet, A.L., y Taieb, J. 2017. Cancer de colon. *EMC*. 21(1):1-7.
- Raza, Z.M., and Merlino, G. 2011. The two faces of interferon- γ in cancer. *Clin cancer res*. 17(19): 6118-6124.
- Razaghi, A., Villacrés, C. Jung, V. Mashkour, N. Butler, M. Owens, L. and Heimann, K. 2017. Improved therapeutic efficacy of mammalian expressed-recombinant interferon gamma against ovarian cancer cells. *Experimental cell research*. 359(1):20-29.
- Rogler, G. 2014. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer letters*. 345:235-241.

- Sakaguchi, S., Miyara, M. Costantino, C.M. and Hafler, D.A. 2010. FOXP3⁺ regulatory T cells and their functional regulation. *Nature reviews Immunology*. 10:490-500.
- Sakuishi, K., Apetoh, L. Sullivan, J.M. Blazar, B.R. Kuchroo, V.K. and Anderson, A.C. 2010. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *Journal Experimental Medicine*. 207(10): 2187-2194.
- Sakuishi, K., Jayaraman, P. Behar, S.M. Anderson, A.C. and Kuchroo, V.K. 2011. Emerging Tim-3 functions in anti-microbial and tumor immunity. *Trends immunology*. 32(8): 345-349.
- Sakuishi, K., Ngiow, S.F. Sullivan, J.M. Teng, M.W.L. Kuchroo, V.K. Smyth, M.J. and Anderson, A.C. 2013. TIM3⁺FOXP3⁺regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncolmmunology*. 2(4): e2349-1.
- Shevach, E.M. 2009. Mechanisms of Foxp3⁺ T Regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*.30:636-645.
- Shawki, S., Ashburn, J. Signs, S.A. and Huang, E. 2017. Colon cancer. Inflammation-Associated Cancer. *Surg Oncol Clin*. 27:269-287.
- Slattery, M.L., Lundgreen, A. Bondurant, K.L. and Wolff, R.K. 2011. Interferon-signaling pathway: associations with colon and rectal cancer risk and subsequent survival. *Carcinogenesis*. 32(11): 1660-1667.
- Sun, H., Gao, W. Pan, W. Zhang, Q. Wang, G. Feng, D. Geng, X. Yan, X. and Li, S. 2017. Tim3⁺Foxp3⁺Tregs cells are potent inhibitors of effector T cells and are suppressed in Rheumatoid Arthritis. *Inflammation*. 40(4): 1342-1350.

- Tamura, T., Yanai, H. Savitsky, D. and Taniguchi, T. 2008. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annual review of immunology*. 26(1): 535-584.
- Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Yamada Y, Sugie S, Mori H. 2003. A novel inflammation -related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer science*. 94(11): 965-73
- Tanoue, T., Atarashi, K. and Honda, K. 2016. Development and maintenance of intestinal regulatory T cells. *Nature reviews Immunology*. 16: 295-309.
- Terán, A., Arias, L.M.T. y Peña, D. 2012. Cáncer de colon y recto. *Medicine*. 11(7):420-30.
- Terzic, J., Grivennikov, S. Karin, E. and Karin, M. 2010. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 138:2101-2114.
- UI-Haq, Z., Naz, S. and Mesaik, M.A. 2016. Interleukin-4 receptor signaling and its binding mechanism: A therapeutic insight from inhibitors tool box. *Cytokine Growth Factor reviews*. 32:3-15.
- Vignali, D.A.A., Collison, L.W. and Workman, C.J. 2008. How regulatory T cells work. *Nature reviews Immunology*. 8(7):523-532.
- Wang, H.B., Yao, H. Shu, C. Liang, L.X. Zhang, Y. Chen, Y.X. Fang, J.Y. and Xu, J. 2017. Rise of PD-L1 expression during metastasis of colorectal cancer: implications for immunotherapy. *Journal of Digestive Diseases*. 18:574-581.
- Wang, L., Wang, Y. Song, Z. Chu, J. and Qu, X. 2014. Deficiency of interferon-gamma or its receptor promotes colorectal cancer development. *Interferon & cytokine research*.

- Wang, Y., Liu, D. Chen, P. Koeffler, H.P. Tong, X. and Xie, D. 2008. Negative feedback regulation in IFN γ pathway by IFN Regulatory Factor 2 in esophageal cancers. *Cancer Research*. 68(4): 1136-1143.
- Wang, Y., Liu, D-P. Chen, P-P. Koeffler, H.P. Tong, X-J. and Xie, D. 2007. Involvement of IFN Regulatory Factor (IRF)-1 and IRF-2 in the formation and progression of human esophageal cancers. *Cancer Research*. 67(6): 2535-2543.
- Weber, M.L., and Krammer, P.H. 2003. Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. *Nature reviews Immunology*. 3:534-543.
- Wells, A. 1999. Molecules in focus EGF receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 31:637-643.
- Whiteside, T.L., Mandapathil, M. and Schuler, P. 2011. The role of the adeno synergic pathway in immunosuppression mediated by human regulatory T cells (Treg). *Current medicinal chemistry*. 18(34):5217-5223.
- Wong, G.T. 2002. Speed congenics: Applications for transgenic and Knock-out mouse strains. *Neuropeptides*. 36(2-3): 230-236.
- Wu, J., and Lanier, L.L. 2003. Natural killer cells and cancer. *Advances in cancer research*. 127-156.
- Yaeger, R., Shah, M.A. Miller, V.A. Kelsen, J.R. Wang, K. Heins, Z.J. Ross, J.S. He, Y. Sanford, E. Yantiss, R.K. Balasubramanian, S. Stephens, P.J. Schultz, N. Oren, M. Tang, L. and Kelsen, D. 2016. Genomic alterations observed in colitis-associated cancers are distinct from those found in sporadic colorectal cancers and vary by type of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 151(2): 278-287.

- Yoshida, N. Kinugasa, T. Ohshima, K. Yuge, K. Ohchi, T. Fujino, S. Shiraiwa, S. Katagiri, M. and Akagi, Y. 2015. Analysis of Wnt and β -catenin Expression in Advanced Colorectal Cancer. *Anticancer Research*. 35:4403-4410.
- Zhang, X., Kelaria, S. Kertetter, J. and Wang, J. 2015. The functional and prognostic implications of regulatory T cells in colorectal carcinoma. *Gastrointestinal oncology*. 6(3): 307-313.
- Zhao, X., Starr, T.K. Subramanian, S. 2017. Tumor location impacts immune response in mouse models of colon cancer. *Oncotarget*. 8(33): 54775-54787.
- Zhuo, C., Xu, Y. Ying, M. Li, Q. Huang, L. Li, D. Cai, S. and Li, B. 2015. FOXP3+ Tregs: heterogeneous phenotypes and conflicting impacts on survival outcomes in patients with colorectal cancer. *Immunol Res*. 61: 338-347.
- Zhuo, L., Lopes, J.E. Chong, M.M.W. Ivanov, I.I. Min, R. Victora, G.D. Shen, Y. Du, J. Rubtsov, Y.P. Rudensky, A.Y. Ziegler, S.F. and Littman, D.R. 2008. TGF- β -induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function. *Nature*. 453(7192): 236-240.

Anexo 1

Soluciones utilizadas

- **Solución de lisis de eritrocitos**

39mM NH_4Cl , 2.5mM KHCO_3 y 0.02mM EDTA.2Na

- **Buffer de lisis para proteinasa K**

100mM NaCl , 25mM EDTA , 0.5% SDS

- **Solución TBE 1X**

Para preparar 1 L se utilizó 10.8 g de TRIZMA base, 5.5 g ácido bórico, 4 ml de EDTA 0.5M