



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**“Obtención de una cepa de ratón doble
transgénica STAT6-/-FOXP3EGFP para el estudio
de las células T reguladoras durante el cáncer de
colon asociado a colitis”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

JOSÉ EDUARDO NAVA LIRA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. SONIA ANDREA LEÓN CABRERA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Obtención de una cepa de ratón doble transgénica STAT6-/-Foxp3EGFP para el estudio de las células T reguladoras durante el cáncer de colon asociado a colitis

Que presenta el pasante: **José Eduardo Nava Lira**

Con número de cuenta: **312241847** para obtener el Título de: **Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
VOCAL	<u>M.V.Z. Angel German Martínez Sosa</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Sonia Andrea León Cabrera</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en E. Rosa María de los Angeles López</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZARTIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Obtención de una cepa de ratón doble transgénica STAT6-I-Foxp3EGFP para el estudio de las células T reguladoras durante el cáncer de colon asociado a colitis

Que presenta el pasante: **José Eduardo Nava Lira**
Con número de cuenta: **312241847** para obtener el Título de: **Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
VOCAL	<u>M.V.Z. Angel German Martínez Sosa</u>	<i>Angel German Martínez Sosa</i>
SECRETARIO	<u>Dra. Sonia Andrea León Cabrera</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en E. Rosa María de los Angeles López</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Obtención de una cepa de ratón doble transgénica STAT6-/Fcxp3EGFP para el estudio de las células T reguladoras durante el cáncer de colon asociado a colitis

Que presenta el pasante: **José Eduardo Nava Lira**

Con número de cuenta: **312241847** para obtener el Título de: **Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	_____
VOCAL	M.V.Z. Angel German Martínez Sosa	_____
SECRETARIO	Dra. Sonia Andrea León Cabrera	
1er. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
2do. SUPLENTE	M. en E. Rosa María de los Angeles López	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Obtención de una cepa de ratón doble transgénica STAT6-/-Foxp3EGFP para el estudio de las células T reguladoras durante el cáncer de colon asociado a colitis

Que presenta el pasante: **José Eduardo Nava Lira**

Con número de cuenta: **312241847** para obtener el Título de: **Licenciado en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	_____
VOCAL	M.V.Z. Angel German Martínez Sosa	_____
SECRETARIO	Dra. Sonia Andrea León Cabrera	_____
1er. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
2do. SUPLENTE	M. en E. Rosa María de los Angeles López	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis**

Obtención de una cepa de ratón doble transgénica STAT6-/-Foxp3EGFP para el estudio de las células T reguladoras durante el cáncer de colon asociado a colitis

Que presenta el pasante: **José Eduardo Nava Lira**

Con número de cuenta: 312241847 para obtener el Título de: Licenciado en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de Junio de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	_____
VOCAL	M.V.Z. Angel German Martínez Sosa	_____
SECRETARIO	Dra. Sonia Andrea León Cabrera	_____
1er. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
2do. SUPLENTE	M. en E. Rosa María de los Angeles López	<u>RMAL</u>

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

AGRADECIMIENTOS

Años de trabajo duro, sacrificio y dedicación se ven reflejados en este proyecto, por lo que para mí es muy importante cerrar este gran ciclo agradeciendo a toda la gente maravillosa que me ha acompañado durante estos últimos años llenos de increíbles experiencias.

A Dios, por permitirme llegar hasta aquí, por las habilidades y fuerzas que me ha concedido para superar cada difícil obstáculo que fueron y siguen siendo bendiciones y lecciones. Gracias señor por el don de fe que siempre he buscado y poco a poco estoy encontrando.

Gracias mamá por su amor y consejos, por su mano dura y regaños, porque siempre cuidó de mí y nunca me dio menos de su 100%, todo lo que soy es gracias a usted, gracias por enseñarme a diferenciar lo que es bueno y malo para mí, gracias por nunca dejarme solo aún con estos años luz de distancia... Gracias por su interminable compañía incondicional.

A ti papá, por nunca dejarme solo aún con estas difíciles pruebas, porque siempre ha querido lo mejor para mí, por la confianza de permitirme cumplir nuestras metas a mi manera, gracias por su amor, dedicación y su apoyo incondicional. Gracias por ser el mejor superpapá.

A ti mi Lilis, tanta cosas que podría decirte y jamás terminaría, nos tocó vivir épocas muy difíciles juntos y tú más que nadie me ha entendido, gracias por ser la mejor hermana y confidente, y aunque yo siempre te veré como mi pequeña hermanita, tu estatura se mide de la cabeza al cielo, por favor no olvides el verdadero valor de la familia, es lo único eterno que tenemos. Sigue echándole ganas porque voy a verte triunfar.

A toda mi hermosa familia Lira y Mendoza por siempre estar al pendiente de mí y apoyarme, y aunque muchas cosas ya no son como antes siempre están presentes en mi corazón. Gracias padrinos, gracias abuelo Efrén, gracias mamá Chuyita

por su apoyo incondicional. A usted mamá Lena, tía Sandra y tío Oscar, gracias por sus acciones tan humanas en todos estos años. Los amo.

A ti Amaysita preciosa, gracias por ser una novia maravillosa llena de principios y valores, porque juntos estamos aprendiendo el verdadero valor del amor y responsabilidad, gracias por ser una compañera de vida ejemplar, porque en estos 4 años sin interrupción hemos vivido cosas increíbles que tuvimos la oportunidad de disfrutar y salir adelante con mucho esfuerzo y apoyo mutuo. Sigue adelante corazón, luchemos por nuestras metas y sueños, te admiro muchísimo porque eres tan entregada en lo que haces y sé que vas a lograr todo lo que te propongas, cuentas con mi apoyo, te amo.

A ti Gaby, por ser una persona maravillosa llena de ángel, gracias por tu apoyo en estos años, siempre lo vamos a valorar mucho. Sigue echándole ganas y cumple tus metas, tú puedes, estoy seguro que se vienen cosas muy bonitas para ti.

A mis mejores amigos con quienes tuve la oportunidad de vivir experiencias muy bonitas en este camino por la universidad, a Paty, Kike, Deni y Bere, y aunque ya no nos frecuentemos mucho, les tengo un cariño muy especial, sin duda esas experiencias repercutieron en mi motivación para seguir adelante.

A CINEMEX, porque me dio 5 años muy preciosos, en donde yo buscaba un trabajo y encontré una familia. Gracias a todos y cada uno de mis compañeros staff, coordinadores, gerentes y Chefs, porque de todos aprendí cosas muy valiosas y de todos me llevo lo mejor. Me gustaría cerrar ese ciclo de la mejor manera deseándoles lo mejor a todos y cada uno de ustedes, quiero verlos terminar su carrera, quiero que se conviertan en el mejor coordinador o gerente, quiero verlos cumplir sus metas y objetivos, y porque los conozco bien sé que lo van a lograr. Los tkm.

Gracias a todo el equipo de trabajo del hospital Conde de Valencia por su increíble apoyo en el procedimiento quirúrgico y recuperación de mi trasplante de córnea. Estos momentos significan un punto de inflexión en mi vida, mucha reflexión y motivación para seguir trabajando personal, espiritual y profesionalmente. Agradecer infinitamente a todas las personas que me han apoyado en estos momentos tan complicados, en especial a la persona donante, gracias a su generosidad y altruismo muchas personas podemos tener otra oportunidad y mejorar nuestra calidad de vida. Gracias a ti volví a nacer, aferrarme a mis proyectos, a disfrutar, a VIVIR. Gracias de corazón, siempre te tendré en mi recuerdo.

AGRADECIMIENTOS INTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por darme las herramientas para seguir creciendo personal y profesionalmente, gracias por ser como una segunda y tercera casa para mí. Gracias a todos mi profesores por su guía académica.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, y en especial a la UBIMED por darme la oportunidad de usar sus instalaciones y de incorporarme a este increíble grupo de investigación. Gracias al equipo de trabajo del Laboratorio 8, 4 y 14 por su apoyo.

A mi Directora de tesis, la Dra. Sonia Andrea León Cabrera, por la confianza de permitir integrarme a su increíble línea de investigación, por su guía para poder terminar esta etapa con éxito, siempre estaré muy agradecido por su apoyo Doctora, es un ejemplo a seguir.

A mis asesores por la revisión crítica de este escrito, por su guía académica en esta importante etapa.

A mis compañeros de laboratorio, a la Bióloga Yael por hacer el laboratorio un lugar ameno para trabajar, por su paciencia interminable en la enseñanza de cada cuestión técnica que necesitaba, muchas gracias Yael y discúlpame por sacarte de tus casillas, eres una estudiante admirable. A mi amigo Ángel por tantas risas y apoyarme en mi adaptación al laboratorio. También a mis compañeros David, Vane, Catalina, Itzel, Yami, Mariana por su apoyo.

Al bioterio de FESI, por su apoyo en cualquier aspecto relacionado con el mantenimiento de los ratones utilizados en este trabajo.

*Es muy importante agradecer al Proyecto **PAPIIT IN215421** y Proyecto **CONACYT A1-S-23944**. Agradezco enormemente el apoyo económico otorgado con número de registro **30348** durante mi estancia en el proyecto.*



DEDICATORIA

Quiero dedicar el siguiente trabajo a todas aquellas personas que padecen enfermedades crónicas o degenerativas, que sirva de inspiración para poder lograr cualquier meta o sueño, que aunque por momentos se nuble la visión encuentren la fuerza necesaria para llegar a la luz al final del camino, y que si yo lo estoy logrando deseo que tú también lo hagas.

A ti mamá, por haber sido una guerrera durante tanto tiempo, por luchar con tu enfermedad con tus mejores armas. Sé que desde donde quiera que estés me has estado apoyado muchísimo y nunca me has abandonado, estos últimos meses he sentido tu presencia de una manera increíble, y quiero que sepas que este logro es más tuyo que mío, esta meta la planeamos juntos y aunque no estás aquí sé que también lo vas a festejar, gracias por enseñarme el significado de perseverar y alcanzar. A veces me reprocho el no haber podido hacer más por ti, simplemente creí que serías eterna. Te amo y te extraño.

A ti papá, por ser el mejor en lo que haces, por darlo todo en nuestro hogar, por anteporernos ante cualquier situación, te mereces esto y el mundo entero, todo lo que soy es gracias a usted, su fortaleza siempre ha sido una gran inspiración para mí. Tenemos un angelote que nos está cuidando y que mueve sus piezas para que todo salga bien, dejemos las preocupaciones en paz y sigamos luchando por lo que se viene. Te amo y como hijo, siempre te apoyaré.

El presente proyecto se desarrolló en el Laboratorio 16 de Inmunidad Tumoral de la Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Incidencia y mortalidad de cáncer en América Latina.....	8
2. Número estimado de muertes por cáncer en hombres y mujeres en México.....	9
3. Secuencia de inflamación-displasia-carcinoma durante el desarrollo de cáncer colorectal asociado a colitis.....	12
4. Secuencia de inflamación-displasia-carcinoma durante el desarrollo de cáncer colorectal esporádico.....	13
5. Representación esquemática de la vía JAK/STAT en células cancerígenas.....	18
6. Vía de señalización de IL-4 e IL-13.....	20
7. STAT6 modula las respuestas pro-colitis y pro-cáncer.....	26
8. La naturaleza modular de la supresión de células Treg.....	35
9. Esquema teórico de las cruzas para la obtención del ratón doble transgénico Foxp3 ^{EGFP} /STAT6 ^{-/-}	46
10. Arbol genealogico teórico de las cruzas para la obtención del ratón doble transgénico Foxp3 ^{EGFP} /STAT6 ^{-/-}	47
11. Análisis de ratones STAT6 ^{-/-}	52
12. Análisis de ratones Foxp3 ^{EGFP}	53
13. Análisis para identificar células T reguladoras en los ratones transgénicos Foxp3 ^{EGFP}	57
14. PCR del genotipo de machos parentales STAT6 ^{-/-} de F0.....	58
15. PCR del genotipo de ratones obtenidos de la F2.....	59
16. Dot plots del fenotipo de ratones de la F2 con genotipo STAT6 ^{+/-} para determinar el porcentaje de Tregs.....	60
17. PCR del genotipo de ratones obtenidos de la F3.....	62
18. Dot plots del fenotipo de ratones de la F3 con genotipo STAT6 ^{-/-} para determinar el porcentaje de Tregs.....	63
19. PCR del genotipo de ratones obtenidos de la F4.....	64
20. Electroforesis del PCR para corroborar la presencia del transgén de EGFP en los ratones Foxp3 ^{EGFP} /STAT6 ^{-/-}	65
21. Dot plots del fenotipo de ratones de la F4 con genotipo STAT6 ^{-/-} Foxp3 ^{EGFP} para determinar el porcentaje de Tregs.....	65

GLOSARIO

<i>Ab-CD4-APC</i>	Anticuerpo anti-CD4 acoplado a alofocianina
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>CAC</i>	Cáncer de colon asociado a colitis
<i>CD25</i>	Clúster de diferenciación 25
<i>CD4</i>	Clúster de diferenciación 4
<i>CRC</i>	Cáncer colorrectal
<i>dNTP'S</i>	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
<i>EGFP</i>	Proteína verde fluorescente mejorada
<i>FOXP3</i>	Forkhead box P3
<i>IBD</i>	Enfermedad inflamatoria intestinal
<i>IL13</i>	Interleucina 13
<i>IL4</i>	Interleucina 4
<i>iTregs</i>	Linfocitos T reguladores inducidos
<i>JAK</i>	Janus cinasa
<i>KI</i>	Knock-in
<i>KO</i>	Knock-out
<i>nTregs</i>	Linfocitos T reguladores naturales
<i>PCR</i>	Reacción en cadena de polimerasa
<i>SOCS</i>	Supresor de señalización de citocinas
<i>STAT6</i>	Transductor de señal y activador de la transcripción 6
<i>Th2</i>	Linfocitos T cooperadores tipo 2
<i>WT</i>	Tipo Salvaje
♀	Hembra
♂	Macho

Soluciones Utilizadas

- *Solución Hemolizante*

NH₄Cl 39mM, KHCO₃ 2.5mM, EDTA 1.5mg/ml pH=7.5

- *Buffer de Fosfatos*

NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM

- *Buffer de FACS*

0.5% BSA en PBS pH=7.5

- *Buffer de lisis de proteinasa K*

NaCl 100 mM, EDTA 25 mM, 0.5% DSS pH=8

- *Buffer TBE*

Tris base 89 mM, H₃BO₃ 89 mM, EDTA 2 mM, pH=8

- *Isopropanol*

Se utiliza al 100%

- *Etanol*

Se utiliza al 75%

Anticuerpo utilizado

Anticuerpo	Fluorocromo	Marca	Clona
CD4	APC	Biolegend	GK1.5

1. RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) ocupa el segundo lugar en la tasa de mortalidad más alta del mundo y es la tercera neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia; un total de 881,000 muertes asociadas a CCR y 1.8 millones de casos recién diagnosticados fueron reportados en el 2018. El transductor de señales y activador de la transcripción 6 (STAT6) participa en la transducción de señales en respuesta a la unión de las citocinas IL-4 e IL-13 a sus receptores y regula la expresión de genes implicados en la respuesta inmune, supervivencia celular, proliferación tumoral y metástasis. STAT6 se encuentra sobre-expresado en varios tipos de cáncer como el de mama, páncreas, próstata y colorrectal. Las células T reguladoras (Treg) son esenciales para mantener la tolerancia periférica, prevenir enfermedades autoinmunes y limitar las enfermedades inflamatorias crónicas. Sin embargo, también limitan las respuestas beneficiosas al suprimir la inmunidad esterilizante y limitar la inmunidad antitumoral. En nuestro grupo de trabajo, en un modelo experimental de CCR se demostró que el 70% de los animales deficientes en STAT6 (STAT6^{-/-}) o en los cuales se inhibió farmacológicamente esta molécula, no desarrolla tumores en comparación a los animales silvestres. La disminución en la tumorigénesis se asoció con un aumento en la frecuencia de las Treg y una mayor expresión del factor de transcripción Foxp3 en el colon durante las etapas tempranas de la transición colitis-cáncer, lo que sugiere que STAT6 podría regular la función y el reclutamiento de estas células y así participar en el desarrollo tumoral. Sin embargo, la relación entre STAT6 y la actividad de las Treg no ha sido investigada a fondo durante el CCR. Con el objetivo de contar con una herramienta experimental que permita analizar la diferenciación y las propiedades funcionales de las células Treg generadas durante la ausencia de STAT6 y así determinar su utilidad como herramienta terapéutica en el contexto del cáncer de colon, se generó una cepa de ratón doble transgénica Foxp3^{EGFP}/STAT6^{-/-}, la cuál fue obtenida mediante cruza y retrocruzas entre los ratones BALB/c Foxp3^{EGFP} y BALB/c STAT6^{-/-}. Esta cepa de ratón permite analizar a las células Foxp3⁺ mediante la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en animales STAT6^{-/-}. Futuras investigaciones en esta cepa de ratón nos permitirá caracterizar los mecanismos inmunológicos que pudiesen estar implicados en la protección frente al CCR mediada por STAT6, con miras a usar esta molécula como un blanco terapéutico.

2. ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. ÍNDICE	6
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1 CÁNCER COLORECTAL.....	8
3.1.1 EPIDEMIOLOGÍA.....	8
3.1.2 ETIOPATOGENIA.....	9
3.2 ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL Y CÁNCER DE COLON.....	10
3.3 RESPUESTA INMUNE DURANTE EL CÁNCER DE COLON ASOCIADO A COLITIS.....	13
3.4 VÍA DE SEÑALIZACIÓN JAK/STAT.....	15
3.5 TRANSDUCTOR DE SEÑAL Y ACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN 6 (STAT6).....	19
3.6 STAT6 Y CÁNCER.....	22
3.7 CÉLULAS T REGULADORAS (Tregs).....	27
3.7.1 TIPOS DE CELULAS T REGULADORAS.....	29
3.7.1.1 CÉLULAS T REGULADORAS NATURALES (nTREGS).....	29
3.7.1.2 CÉLULAS T REGULADORAS INDUCIDAS (iTREGS).....	30
3.7.2 MECANISMOS DE SUPRESIÓN.....	30
3.7.2.1 SUPRESIÓN POR CITOCINAS INHIBITORIAS.....	31
3.7.2.2 SUPRESIÓN POR CITÓLISIS.....	32
3.7.2.3 SUPRESIÓN POR INTERRUPCIÓN METABÓLICA.....	32
3.7.2.4 SUPRESIÓN POR MODULACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	33
3.8 RATONES TRANSGÉNICOS FOXP3EGFP (KNOCK-IN).....	36
3.9 RATONES TRANSGÉNICOS STAT6 ^{-/-} (KNOCK-OUT).....	38

4. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	40
5. JUSTIFICACIÓN.....	41
6. OBJETIVO GENERAL.....	43
7. OBJETIVOS PARTICULARES.....	43
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
8.1 RATONES.....	44
8.2 CRUZAS DE RATONES BALB/c STAT6 ^{-/-} MACHOS Y BALB/c FOXP3EGFP HEMBRAS.....	44
8.3 IDENTIFICACIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS.....	47
8.3.1 OBTENCIÓN DE SANGRE.....	47
8.3.2 INMUNOFLUORESCENCIA EN SANGRE TOTAL.....	47
8.3.3 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN. DE ADN DE TEJIDO POR DIGESTIÓN ENZIMÁTICA.....	48
8.3.4 CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	49
8.3.5 REACCIONES DE PCR.....	49
8.3.6 ELECTROFORESIS Y REVELADO.....	51
9. RESULTADOS.....	51
9.1 MONTAJE DE PCR PARA IDENTIFICAR LA AUESNCIA O PRESENCIA DEL GEN DE STAT6.....	51
9.2 MONTAJE DE PCR PARA IDENTIFICAR LA PRESENCIA DE EGFP.....	53
9.3 ESTRATEGIA PARA OBTENER LA CEPA DOBLE TRANSGÉNICA.....	53
9.4 DETECCIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	56
9.5 CRUZAS.....	58
9.5.1 ONTENCIÓN DE LA F1.....	58
9.5.2 OBTENCIÓN DE LA F2.....	58
9.5.3 OBTENCIÓN DE LA F3.....	61
9.5.4 OBTENCIÓN DE LA F4.....	63
10. DISCUSIÓN.....	66
11. CONCLUSIONES.....	75
12. REFERENCIAS.....	77

3. INTRODUCCIÓN

3.1 CÁNCER COLORECTAL

3.1.1 EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer colorrectal (CCR) ocupa el segundo lugar en la tasa de mortalidad más alta del mundo y es la tercera neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia; un total de 881,000 muertes asociadas a CCR y 1.8 millones de casos recién diagnosticados fueron reportados en el 2018 (Bray F, Ferlay J et al. 2018). Datos recientes en America Latina, reportado por GLOBOCAN (2018) describen que el CCR se encuentra entre las causas más comunes de muerte por cáncer en ambos sexos (**Figura 1**). En México, se presentan anualmente 83,476 muertes por cáncer, perteneciendo el 8.5% a CCR, siendo considerado el primer lugar en mortalidad por cáncer (**Figura 2**).

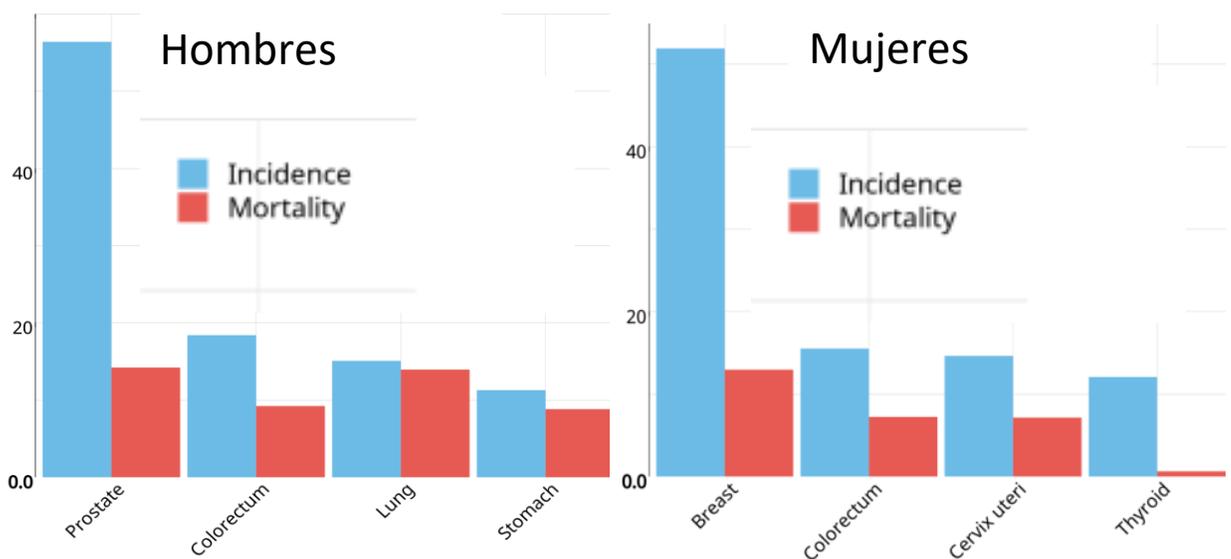


Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer en América Latina. La imagen muestra datos que representan la tasa por cada 100,000 habitantes (GLOBOCAN, 2018).

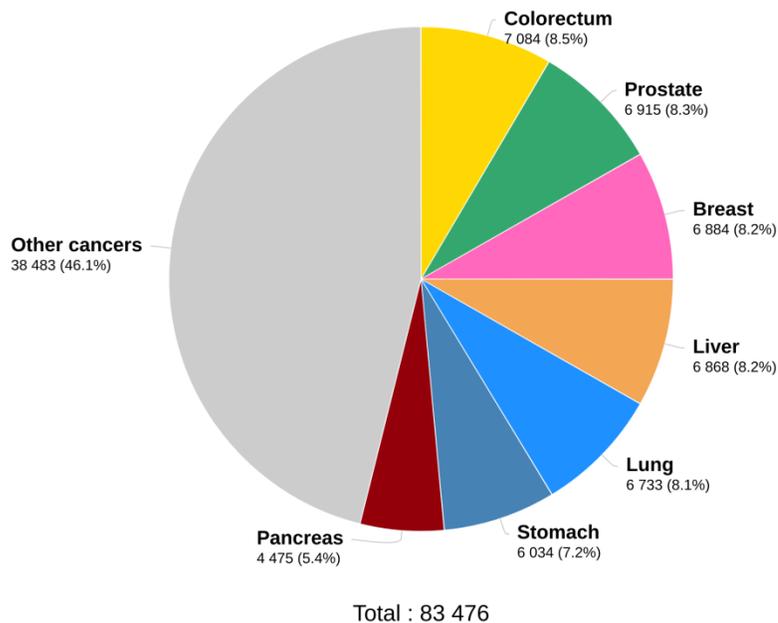


Figura 2. Número estimado de muertes por cáncer en hombres y mujeres en México (GLOBOCAN, 2018)..

3.1.2 ETIOPATOGENIA

Tanto los factores genéticos como los ambientales juegan un papel importante en la etiología del cáncer colorectal. La mayoría de los cánceres colorectales son esporádicos, aproximadamente las tres cuartas partes de los pacientes tienen antecedentes familiares negativos. Sólo el 5-6% de los casos de CCR implican alteraciones genéticas hereditarias. Se ha demostrado que tener uno o dos familiares de primer grado con CCR se asocia, respectivamente, con un aumento de 2,26 y 3,76 veces del riesgo de desarrollar CCR (Johns, L.E., Houlston, R.S. et al. 2001). El síndrome común en esta categoría es el síndrome de Lynch. Este síndrome es causado por una mutación en uno de los genes de reparación de desajuste de ADN:

MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 o EPCAM (*Kuipers, E. J., Grady, W. M., et al. 2015*).

El segundo síndrome de cáncer colorrectal hereditario más común es el de Poliposis adenomatosa familiar, este síndrome es causado por mutaciones en el gen poliposis coli adenomatosa (APC), que controla la actividad de la vía de señalización Wnt (*Vasen HFA, Tomlinson I. et al. 2015*).

La inflamación crónica es uno de los principales riesgos de CCR. Pacientes con alguna enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), tanto Colitis ulcerativa (UC) como enfermedad de Crohn (CD) tienen un mayor riesgo de desarrollar CCR asociado a la colitis en comparación con la población en general (*Jess, T., Rungoe, C. et al. 2012*) (*Farraye, F.A., Odze, R.D. et al. 2010*). El cáncer precedido por alguna IBD es conocido como cáncer de colon asociado a colitis (CAC). Algunos estudios estiman que la probabilidad de desarrollar CAC después de 10, 20, 25, 30 y 35 años de diagnosticar UC es del 2%, 8%, 14% 18% y 30% respectivamente (*Rogler, G. et al. 2013*).

3.2 ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL Y CÁNCER DE COLON

Se ha sugerido que la patogénesis molecular del epitelio inflamatorio podría jugar un papel crítico en el desarrollo de CAC. El daño al tejido de la mucosa derivado de infecciones o agentes químicos puede provocar una respuesta inmune crónica. Se sabe que el microambiente inflamatorio durante las IBDs consiste en una interacción entre las células inmunes, las células epiteliales, las células estromales,

las citocinas y las quimiocinas (Axelrad E., J., Lichtinger, S. et al. 2016). Una disfunción en la barrera epitelial promueve la invasión de bacterias, que favorece aún más el proceso de inflamación. El ambiente inflamatorio genera ROS, que puede provocar daños en el ADN, finalmente resultando en la mutación del gen que codifica APC y el desarrollo de carcinomas (**Figura 3**) (Ben-Neriah, Y. & Karin, M. et al. 2011). Dicha intervención tiene como finalidad la regeneración del tejido, si la respuesta inmune falla, un microambiente rico en citocinas y factores de crecimiento provoca una proliferación prolongada en un intento de reparación, resultando en la acumulación de errores genéticos y proliferación continua de forma inapropiada (Mariani, F., Sena, P. et al. 2014). El desarrollo de la IBD, inicia cuando el colon normal es afectado por una inflamación causada por la llegada de infiltrados celulares inmunes, que dan como resultado colitis a través de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS), que incrementan las posibilidades de desarrollar mutaciones genéticas (Coussens, L. M. and Z. Werb et al. 2002). En el CAC, las citocinas inflamatorias se encuentran de manera permanente en el tejido intestinal. La mutación del gen que codifica p53 es un evento temprano en CAC que resulta en la activación prolongada de NF- κ B y una respuesta inflamatoria exacerbada.

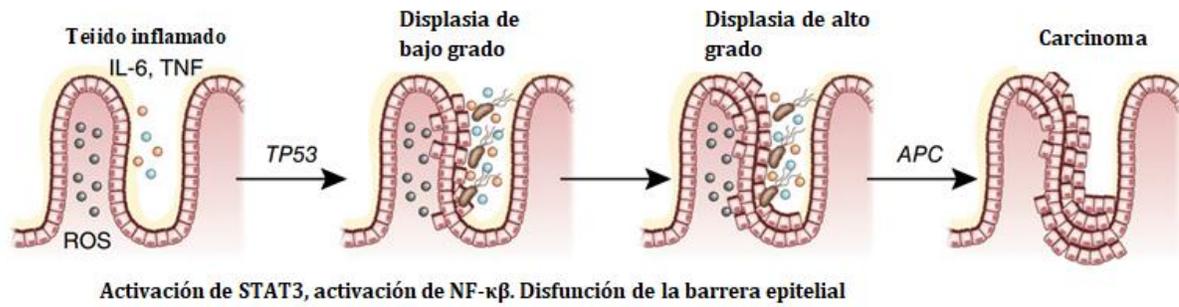


Figura 3. Secuencia de inflamación-displasia-carcinoma durante el desarrollo de cáncer colorrectal asociado a colitis. Tomado y modificada de Lasry y Zinger et al. 2016.

El desarrollo de cáncer colorrectal esporádico está impulsado por alteraciones genéticas en la vía APC / β -catenina, que conduce a la señalización Wnt aberrante y la formación de focos crípticos hiperplásicos y de adenomas tempranos. La acumulación de alteraciones genéticas en oncogenes como KRAS/BRAF y los supresores tumorales como TP53 dan como resultado la formación de adenomas y carcinomas tardíos (**Figura 4**) (Fletcher, R., Wang, Y. J. et al. 2018). Primero se convierte la mucosa normal en epitelio hiperplásico, posteriormente en pólipos adenomatosos con células displásicas, alcanzando un estado de carcinoma in situ, para su posterior transformación maligna con capacidad de invasión a la membrana basal y metástasis (Vogelstein, B. and K. W. Kinzler et al. 2004). Otros autores han reportado que en los eventos moleculares desencadenados en pacientes con IBD que llegan a desarrollar CAC se muestran mutaciones en el gen APC, activación del oncogen Kristen Ras (KRAS), ciclooxigenasa-3 (COX-2), pérdida de la función de TP53 y CDKN2A, aneuploidias, inestabilidad de microsatélites (MSI), y la hipermetilación del DNA (Axelrad E., J., Lichtinger, S. et al. 2016).

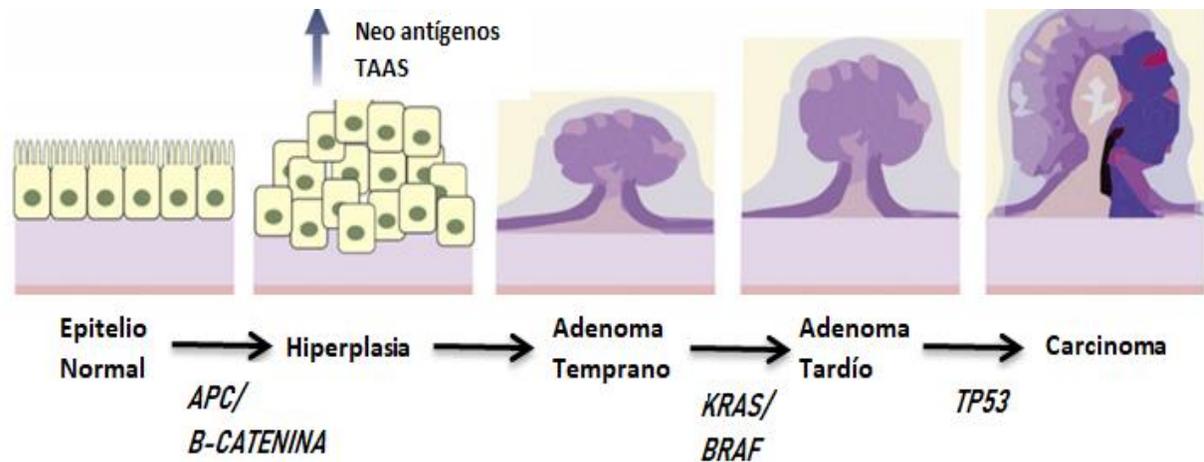


Figura 4. Secuencia de inflamación-displasia-carcinoma durante el desarrollo de cáncer colorrectal esporádico. Tomado y modificado de Fletcher y Wang, 2018.

3.3 RESPUESTA INMUNE DURANTE EL CÁNCER DE COLON ASOCIADO A COLITIS

Es bien sabido que la inflamación crónica induce displasia a través de la inducción de modificaciones de ADN en células del epitelio intestinal, y reacciones como nitración, oxidación, metilación y desaminación pueden contribuir al inicio o progresión del CCR (Bayarsaihan, D. et al. 2011). Durante la inflamación, el reclutamiento de células inmunes innatas como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, así como las células inmunes adaptativas, como las células T y B, conducen a la secreción de especies reactivas de oxígeno/nitrógeno, que son altamente genotóxicos (Francescone R., Hou V. et al. 2015). Además, se presenta un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias como la interleucina (IL) -6, IL-8, IL-1 β y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), así como factores de crecimiento. La producción de estos mediadores es intervenido por varias vías

principales de señalización como el factor nuclear-kappa B (NF- κ B), el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), PI3K / AKT, ciclooxigenasa-2 (COX-2) / prostaglandina E2 (PGE2), que están implicados en muchos procesos, incluyendo proliferación, angiogénesis, invasión, metástasis y reclutamiento de mediadores inflamatorios (*Francescone R., Hou V. et al. 2015*).

Este ambiente inflamatorio tiene muchas similitudes con el microambiente tumoral, lo que sugiere la implicación de los mismos mediadores en la inflamación crónica del intestino y la carcinogénesis colorrectal. Una de las principales citocinas inducidas por NF- κ B es IL-6, tiene un papel crucial en la iniciación y progresión de CAC. IL-6 se origina en las células del sistema inmune en la lámina propia y puede mejorar la proliferación de células epiteliales del intestino (IEC), así como protegerlas de la apoptosis. La delección de IL-6 reduce la tumorigénesis en un modelo de ratón AOM-DSS. Las señales de IL-6 de la lámina propia activan STAT3 en IEC, que luego puede promover la tumorigénesis mediante su proliferación, inhibición de la apoptosis y otras rutas pro-tumorigénicas (*Grivennikov, S. et al. 2009*) (*Bollrath, J. et al. 2009*).

Por otro lado, TGF- β es una citocina con un papel paradójico en el desarrollo de cáncer. Se ha mostrado que tiene efectos antitumorales mediante la inhibición de la proliferación, la estimulación de la apoptosis, y por la supresión de la expresión de citocinas protumorigénicas. Sin embargo, mutaciones en la vía de TGF- β en células

epiteliales, predispone al desarrollo de tumores del colon y su crecimiento (*Yuan, Q., P. D. Li, et al. 2009*).

3.4 VÍA DE SEÑALIZACIÓN JAK/STAT

Las proteínas JAK/STAT forman parte de una vía de señalización implicada en la respuesta inmune, el crecimiento y la proliferación celular (*Lu Y, Zhou J et al. 2008*). Brevemente, la señalización comienza con la asociación extracelular de citocinas o factores de crecimiento con sus receptores transmembranales correspondientes. Una vez que las proteínas JAK se activan son capaces de fosforilar monómeros de STAT latentes, lo que lleva a la dimerización, translocación nuclear y unión al ADN (*Brooks AJ, Dai W. et al. 2014*). En mamíferos, la familia JAK contiene cuatro miembros: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. La familia STAT está compuesta por siete miembros STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6, que principalmente actúan como factores de transcripción (*Aittomaki S, Pesu M. et al. 2014*) (*Rawlings JS, Rosler KM et al. 2014*).

Mientras que la ruta JAK/STAT se identificó originalmente como una vía activada por cascadas de señalización de IFN, posteriormente se determinó que las proteínas JAK pueden ser activadas por otros tipos de receptores para ampliar el conjunto de señales que podrían desencadenar esta vía de señalización. Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) son una de las categorías de receptores

que han demostrado capacidad para activar JAK (*Wagner MA, Siddiqui MA. Et al. 2012*).

Los receptores de citocinas activan la vía JAK / STAT a través de un variedad de combinaciones de diferentes miembros de las familias JAK y STAT, lo que destaca la naturaleza versátil de esta vía. Los receptores de esta familia que están vinculados a la activación de JAK podría clasificarse como receptores de interleucina (ILR), receptores de interferón (IFNR) y receptores de factor estimulante de colonias (CSFR). Entre los receptores de IL, la subunidad gp130 y los receptores de IL-2, IL3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-31 y Leptina han sido reportados para activar miembros específicos de la familia JAK de proteínas (*Emira B & Hamidreza MA. et al. 2018*).

Los STAT son activados por fosforilación catalizada por JAK de una tirosina específica entre el SH2 y el dominio de transactivación (*Chen X, Vinkemeier U. et al. 1998*). Si bien se sabe que las STAT se activan en su estado fosforilado, hay algunos casos en los que las STAT no fosforiladas también parecen desempeñar un papel en la transcripción de genes (*Yang J, Liao X. et al. 2007*). También se ha sugerido que las STAT no fosforiladas son importantes para mantener la estabilidad de la heterocromatina mediante la asociación con la proteína HP1 (*Yan S-J, Lim S et al 2011*).

STAT5 sin fosforilar tiene un papel importante como represor transcripcional en megacariocitos donde bloquea la diferenciación (*Park HJ, Li J. et al 2016*).

La señalización a través de la vía de señalización JAK-STAT es un proceso dinámico que implica la transmisión rápida de señal desde la membrana celular al núcleo seguido de una respuesta altamente organizada para una regulación descendente controlada en la atenuación de la señal inicial. Las proteínas SOCS son las principales impulsadoras de atenuación de señal, son inducidas por exposición a citocinas (a través de STAT) para después actuar como inhibidores de retroalimentación negativa para apagar la cascada de señalización. Hay ocho proteínas SOCS codificadas en el genoma humano, SOCS1-7 y CIS (*Naka T, Narazaki M. et al. 1997*).

La investigación en el campo de JAK/STAT ha aclarado su participación en diversos procesos celulares, tales como proliferación, apoptosis y migración celular, así como se han descrito aberraciones frecuentes de la vía JAK/STAT en diversos tipos de cáncer (*Dutta and Li et al. 2001*). Al respecto se ha descrito la vía de señalización JAK/STAT/SOCS asociada al riesgo a desarrollar cáncer de colon. Durante este estudio se analizó una base de datos de pacientes con diagnóstico confirmado de cáncer colorrectal, y demostraron su importancia en la regulación de la inflamación, así como su relación con la supervivencia posterior al diagnóstico oncológico (*Slattery, Lundgreen et al. 2013*). La **figura 5** resume las cascadas de

señalización intracelular que implica la activación de proteínas JAK/STAT3 en cáncer.

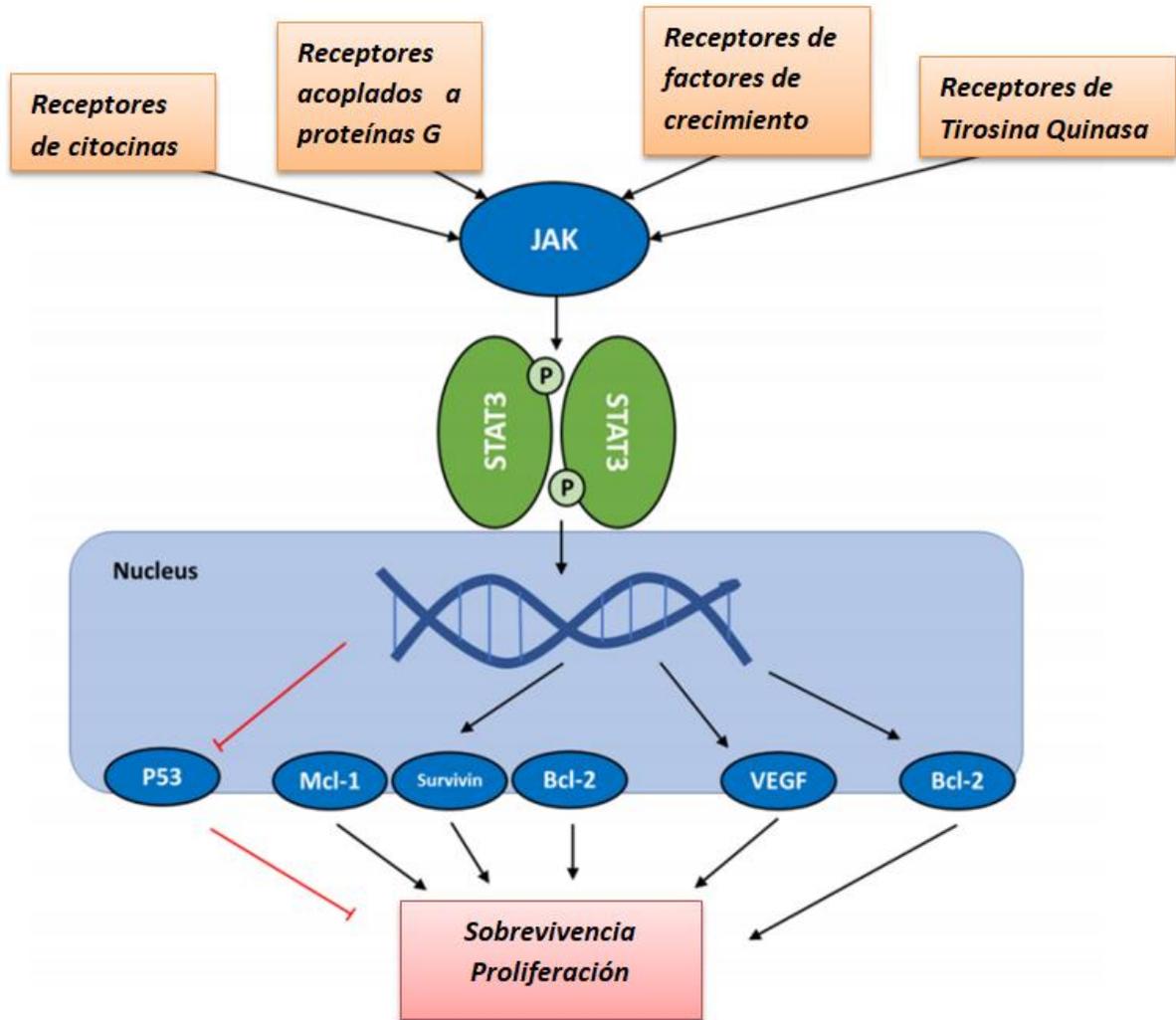


Figura 5. Representación esquemática de la vía JAK/STAT en células cancerígenas. Tomada y modificada de Emira B & Hamidreza, 2018.

3.5 TRANSDUCTOR DE SEÑALES Y ACTIVADOR DE LA TRANSCRIPCIÓN 6 (STAT6)

IL-4 e IL-13 son citocinas expresadas por células Th2, mastocitos, basófilos, y las células linfoides innatas (ILC2) y son clave en la patogénesis del asma alérgica y enfermedad atópica. Numerosas investigaciones sobre los mecanismos de señalización de IL-4 e IL-13 han proporcionado información sobre cómo regulan estas citocinas la respuesta inmune. IL-4 e IL-13 cada una se une a dos complejos receptores y tienen una subunidad de receptor compartida. IL-4 se une a su complejo receptor afín, que consiste en la cadena α del receptor de IL-4 (IL-4R α) y la cadena gamma común (γ c) (Walford, H. H., Doherty, T. A. et al. 2013). IL-4 primero se une a la subunidad IL-4R α con alta afinidad seguida de dimerización con subunidad del receptor γ c y posterior activación JAK-STAT6. La subunidad IL-4R α contiene tres residuos de tirosina (Y575, Y603 y Y631) que se fosforilan después de la estimulación del receptor y puede conducir a la activación de STAT6. Los monómeros STAT6 se unen mediante la región SH2 a la porción intracelular de la subunidad IL-4R α y a su vez se fosforilan por las cinasas JAK asociadas a IL-4R α incluyendo JAK1. La subunidad γ c también activa JAK3, mientras que IL-13R α 1 activa otras dos quinasas, la tirosina cinasa 2 (TYK2) y JAK2. La fosforilación de STAT6 conduce a la dimerización seguida de la translocación al núcleo donde STAT6 regula la expresión génica (**figura 6**) (Hannah HW, Taylor AD. et al. 2013).

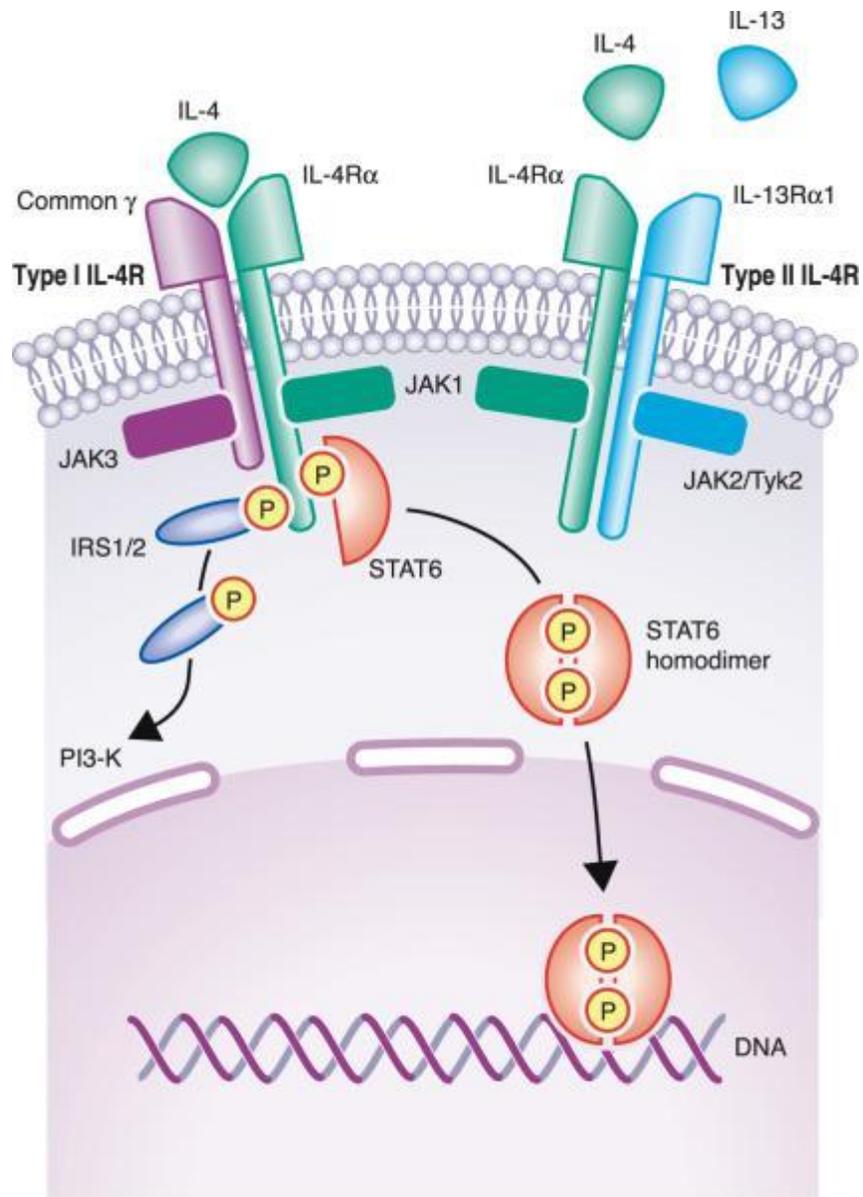


Figura 6. Vía de señalización de IL-4 e IL-13. La heterodimerización del receptor conduce a la activación de miembros de la familia de la Janus quinasa (JAK) que fosforilan residuos de tirosina en la cola citoplasmática de IL-4Rα. Esto conduce a la homodimerización de los monómeros del transductor de señal y activador del factor de transcripción 6 (STAT6) que luego se translocan al núcleo y se unen a las regiones promotoras de varios genes. Tomada Kuperman, D. A., & Schleimer, R. P et al. 2008.

La cascada de señalización de IL-4 a través de la activación STAT6 es considerado la vía canónica de diferenciación Th2 (*Goenka S, Kaplan MH. Et al. 2011*) (*Paul WE, Zhu J. et al. 2010*). Tras la activación por IL-4, STAT6 regula la expresión de el "regulador maestro" de la diferenciación Th2, GATA3 (*Zhu J, Yamane H. et al. 2006*). Después STAT6 forma dímeros que se traslocan al núcleo, STAT6 regula la expresión de GATA3, un factor de transcripción que pertenece a la familia GATA de proteínas de dedos de zinc. GATA3 es traducido de dos transcripciones distintas denominadas GATA3-1a y GATA3-1b que derivan de dos promotores diferentes. Activado STAT6 induce la expresión de GATA3 de ambos promotores y controla el inicio y mantenimiento de su expresión. GATA3 que a su vez se une y modifica el locus IL-4, IL-5 e IL-13 que da como resultado una expresión mejorada de las citocinas relacionadas con Th2 (*Maier E, Duschl A. et al. 2012*).

La regulación adecuada de la señalización de STAT6 es crucial y se han identificado moléculas específicas para regular esta vía de señalización. Las proteínas supresoras de señalización de citocinas (SOCS), en particular SOCS1, reprimen la activación de JAK1/3 y STAT6 y afectan la proliferación inducida por IL-4 (*Dickensheets H, Vazquez N et al. 2007*). La señalización de STAT6 induce la expresión de SOCS1 en un ciclo de retroalimentación negativa, inhibiendo la expresión de genes que responden a STAT6 (*Dickensheets H, Vazquez N et al. 2007*). Además, la vía de señalización de IL-4/STAT6 induce la expresión de SOCS3 en las células epiteliales intestinales. El aumento de los niveles de SOCS3 en pacientes con colitis ulcerosa

(CU) es indicativo de una exacerbación de la enfermedad (Li Y, Deuring J et al. 2012). La activación de STAT6 es responsable de la inducción de SOCS3 y afecta la regulación de la señalización STAT1 y STAT3 (Li Y, Deuring J et al. 2012). Además, la función de STAT6 está regulada por metilación. La metilación de STAT6 en Arg²⁷ es importante para la fosforilación de tirosina de STAT6 y la posterior translocación nuclear y la actividad de unión al ADN. (Chen W, Daines MO et al. 2004).

3.6 STAT6 Y CÁNCER

STAT6 está altamente expresado en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama, páncreas, próstata y colorrectal. STAT6 transduce señales en respuesta a la unión de IL-4 e IL-13 a sus receptores y regula la expresión de genes implicados en la respuesta inmune, supervivencia celular, proliferación tumoral y metástasis.

STAT6 también se estimula constitutivamente en varios tipos de cáncer. Investigadores indican que la señalización de IL-4/STAT6 en células CD11b⁺ promueve la progresión del cáncer de pulmón activando un ciclo de retroalimentación positiva de IL-4 y en aumento de las células mieloides M2 (CD11b⁺ CD11c⁻ F4/80⁺) (Fu C, Jiang L et al. 2019).

También se ha demostrado que la secuencia de siARN de STAT6 es capaz de inhibir la proliferación e inducir la apoptosis de las células de cáncer colorrectal HT-

29 y células de cáncer de mama ZR-75-1, reduciendo a la mitad el número de células cancerosas en un corto período de tiempo (*Salguero-Aranda C. et al. 2019*).

En 2007 *Das S.* y colaboradores han sugerido que STAT6 es un factor de supervivencia en el cáncer de próstata y regula el programa transcripcional genético responsable de la progresión de este tipo de cáncer (*Das S, Roth CP et al. 2007*).

STAT6 media la señalización por IL-13, una citocina frecuentemente expresada por las células *Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS)*. La neutralización mediada por anticuerpos de IL-13 dio como resultado disminuciones significativas tanto en la proliferación celular como en los niveles de STAT6 fosforilada de líneas celulares de *linfoma de Hodgking (LH)*. En conclusión, la fosforilación STAT6 constitutiva es una característica común y distintiva de las células HRS en el LH clásico, mientras que la activación de STAT3 estaba presente regularmente tanto en LH como en grupos controles. Estos resultados sugieren que la señalización de IL-13 es en gran parte responsable de la activación constitutiva de STAT6 observada en las células HRS e implica aún más a IL-13 como un factor de crecimiento importante en el LH clásico (*Skinnider BF, Elia AJ et al. 2002*).

El factor de transcripción E2F 1 (E2F1), un factor de transcripción crítico para el desarrollo del CCR, aumenta la expresión de STAT6 en las células de cáncer de colon y aumenta su susceptibilidad a la estimulación de IL-4. E2F1 actúa como un potenciador de la vía de señalización IL-4/STAT6 y aumenta la expresión de los controladores de transición epitelio-mesénquima en las células de CRC (*Chen J,*

Gong C et al. 2018). IL-4 es capaz de inducir la expresión de proteínas anti-apoptóticas y el crecimiento de células de cáncer de colon epitelial in vivo e in vitro. La neutralización de IL-4 sensibiliza a las células de carcinoma de colon a la quimioterapia y a la muerte por el ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (*Todaro M, Lombardo Y et al. 2008*). La activación anormal de IL-4/STAT6 induce la expresión de survivina, una proteína con un papel importante en la resistencia a la apoptosis en las células madre del cáncer de colon; se ha demostrado que el uso de leflunomida, un inhibidor de STAT6, disminuye la expresión y localización de survivina, reduciendo así su efecto anti-apoptótico (*Di Stefano AB, Iovino F et al. 2010*).

La producción autocrina de IL-4 por las células de cáncer de colon protege contra la apoptosis y la muerte celular inducida por quimioterapia (*Conticello C, Pedini F et al. 2004*) (*Francipane MG, Alea MP et al. 2008*) (*Li BH, Yang XZ et al. 2008*) (*Li BH, Xu SB et al 2012*). Se encontró que la IL-4 se expresaba en gran medida en las células iniciadoras del cáncer obtenidas de pacientes con CCR y se asociaba con perfiles inmunogénicos bajos; el bloqueo de IL-4 aumentó las respuestas de las células T CD8⁺ de tipo Th1 in vitro (*Volonte A, Di Tomaso T et al. 2014*). Estudios anteriores también revelaron que STAT6 mantiene la homeostasis de la mucosa al mantener las células mieloides. La administración de macrófagos M2 a ratones STAT6^{-/-} promovió la reparación de la mucosa mediante la activación de la vía de señalización Wnt; sin embargo, las

mutaciones que causan la señalización aberrante de Wnt son responsables del desarrollo de pólipos en el intestino delgado y el colon (*Cosin-Roger J, Ortiz-Masia D et al. 2016*).

Además, la delección de STAT6 en el modelo de ratón $Apc^{Min/+}$ redujo la incidencia de pólipos en el intestino delgado y disminuyó la proliferación de células epiteliales de pólipos; este efecto se atribuyó a una expansión de las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), lo que implica la regulación de la respuesta de las células T antitumorales de una manera dependiente de STAT6 (*Jayakumar A and Bothwell ALM et al. 2017*). Por lo tanto, STAT6 puede desempeñar un papel amplio en la coordinación de la proliferación de células de pólipos y la expansión de MDSC.

Por el contrario, *Oliveira et al 2019* informaron que los ratones deficientes en STAT6 son más susceptibles al daño de las mucosas durante la colitis inducida por DSS y exhiben una mayor apoptosis de las células epiteliales intestinales, lesiones tisulares y respuestas inflamatorias. La condensación de cromatina en las células epiteliales intestinales se ve afectada por la señalización STAT6 y puede proteger a las células de la apoptosis y daño tisular severo (*Oliveira et al 2019*), aunque es importante tomar en cuenta que su metodología experimental tiene importantes variantes. Sin embargo, el papel de STAT6 durante las diferentes etapas de la colitis y la proliferación de células tumorales no se ha dilucidado por completo.

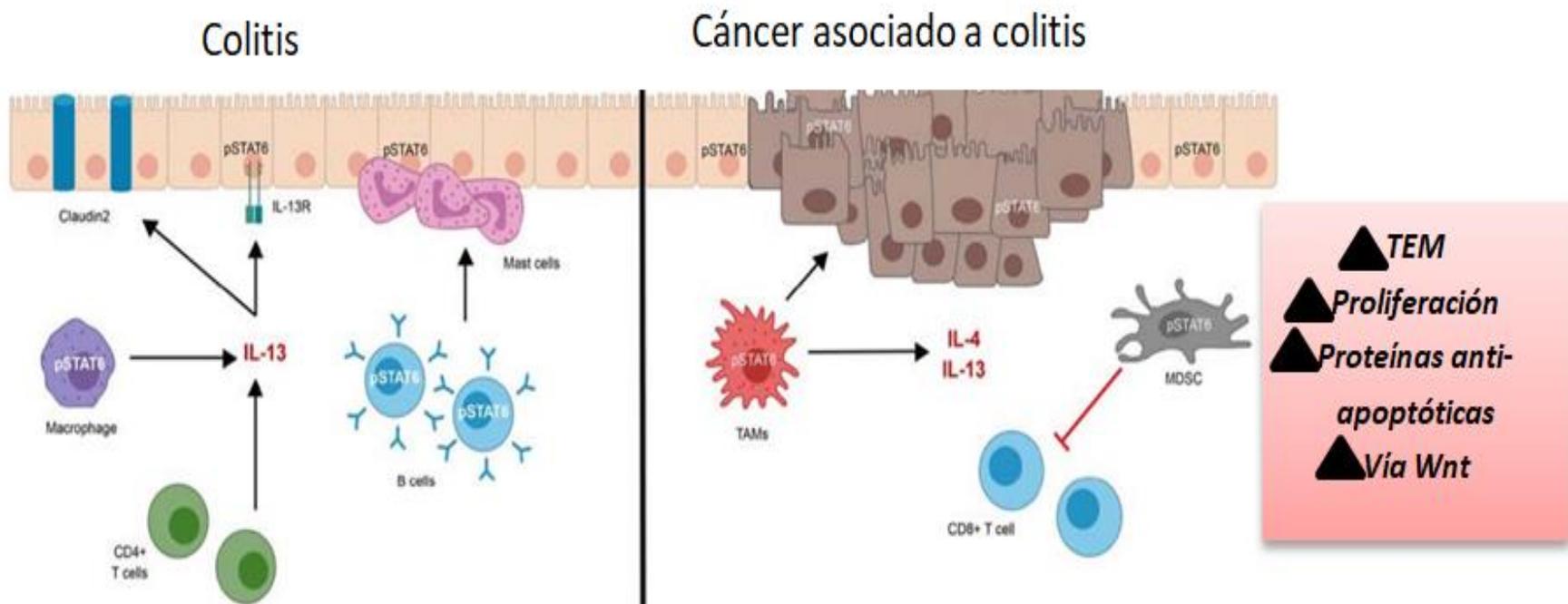


Figura 7. STAT6 modula las respuestas pro-colitis y pro-cáncer. La señalización de IL-13 altera la expresión de proteínas, incluida la proteína de unión estrecha formadora de poros claudina-2, matriptasa, prostasina y serotonina, que participan en la permeabilidad de la barrera epitelial y la función de barrera gastrointestinal a través de STAT6. Además, la IL-13 producida por las células CD4⁺ T helper 2 favorece la fosforilación de STAT6 en mastocitos, células B y macrófagos durante el desarrollo de la colitis, lo que sugiere que la señalización de STAT6 en las células inmunes favorece la progresión de la enfermedad. En el microambiente tumoral, STAT6 coordina tanto la proliferación de células de pólipos como la expansión de células supresoras derivadas de mieloides. La activación de STAT6 provoca la diferenciación de los macrófagos infiltrantes en un fenotipo asociado a tumores con funciones protumorales; Estos macrófagos M2 promueven la reparación de la mucosa mediante la activación de la vía de señalización Wnt. La activación de STAT6 provoca la diferenciación de los macrófagos infiltrantes en un fenotipo asociado a tumores con funciones protumorales, además, la exposición a IL-13 mejora la expresión de factores promotores de la transición epitelial a mesenquima. pSTAT6, transductor de señales y activador de la transcripción 6; IL-R, receptor de interleucina; TAM, macrófagos asociados a tumores; MDSC, célula supresora derivada de mieloides. Imagen tomada y modificada de Delgado-Ramírez, Y., Colly, V. et al. 2020.

3.7 CÉLULAS T REGULADORAS (Tregs)

Las células T reguladoras (Treg) son esenciales para mantener la tolerancia periférica, prevenir enfermedades autoinmunes y limitar las enfermedades inflamatorias crónicas. Sin embargo, también limitan las respuestas beneficiosas al suprimir la inmunidad esterilizante y limitar la inmunidad antitumoral.

La investigación de Treg es de interés cuando involucra la patogénesis y la terapia de diversas enfermedades autoinmunes, cánceres y alergias, así como estudios de trasplantes e ingeniería de tejidos. Las células tienen una funcionalidad extremadamente amplia; aseguran la tolerancia a los auto-antígenos (*Sakaguchi, S., Yamaguchi, T. et al. 2008*) y a los antígenos de la micro flora comensal (*Dembic Z. et al. 2008*), limitan el exceso de respuesta inmune, inducen tolerancia a los antígenos alimentarios (*Zhang, X., Izikson, L. et al. 2001*), regulan la inmunidad feto-placentaria (*Aluvihare, V. R., Kallikourdis, M. et al. 2004*) y juegan un papel en la homeostasis y regeneración de varios tejidos (*Eming, S. A., Wynn, T. A. et al. 2017*).

La investigación de Treg comenzó hace más de 40 años. Ya en la década de 1970, Gershon y Kondo experimentaron con ratones con timo extirpado y fueron los primeros en sugerir la existencia de linfocitos T supresores (*Gershon, R. K., &*

Kondo, K. et al. 1970). En los años siguientes se realizaron grandes esfuerzos para identificar y estudiar esta población de linfocitos T, por lo que la eliminación de algunas subpoblaciones de linfocitos T en ratones desencadenó un síndrome autoinmune que afectó a diversos órganos y tejidos, lo que indirectamente demostró la existencia de una población de Linfocitos T que proporciona auto-tolerancia periférica (*Sakaguchi, S., Fukuma, K. et al. 1985*).

Un avance fundamental en el análisis de las células Treg llegó con la identificación de un factor de transcripción clave, forkhead box P3 (FOXP3), que es necesario para su desarrollo, mantenimiento y función (*Fontenot, J. D. et al. 2003*). Los ratones y los pacientes que carecen de FOXP3 desarrollan una profunda enfermedad linfoproliferativa de tipo autoinmune que enfatiza gráficamente la importancia de las células Treg para mantener la tolerancia periférica (*Brunkow, M. E., Jeffery, E. W. et al. 2001*). Aunque FOXP3 se ha propuesto como el regulador maestro de las células Treg que controla la expresión de múltiples genes que median su actividad reguladora (*Rudensky A. et al. 2005*), esto ha sido cuestionado recientemente, lo que plantea la posibilidad de que otros eventos transcripcionales puedan operar aguas arriba y/o simultáneamente con FOXP3 para mediar el desarrollo de las células Treg (*Hill, J. A., Feuerer, M. et al. 2007*). FOXP3 juega un doble papel como un activador transcripcional y represor de sus genes diana en células Treg. FOXP3 heterodimeriza con FOXP1, que amplía la regulación de la

expresión génica mediada por FOXP3 y coordina la función reguladora de las células T (Konopacki C, Pritykin Y. et al. 2019).

3.7.1 TIPOS DE CÉLULAS T REGULADORAS

Las células Treg representan del 5 al 10% del conjunto total de células T CD4⁺ y expresan receptores de células T $\alpha\beta$ (TCR) con un amplio repertorio que es muy distinto al de las células T convencionales (Hsieh, C. S., Zheng, Y. et al. 2006). Las células Treg se derivan en dos poblaciones distintas que actúan de forma sinérgica para reforzar la tolerancia periférica, las Tregs naturales y Tregs inducidas (Curotto de Lafaille, M. A. et al. 2009).

3.7.1.2 CÉLULAS T REGULADORAS NATURALES (nTregs)

Las células T reguladoras naturales CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ (nTreg) que secretan IL-10 y TGF- β , representan uno de los subconjuntos más grandes de Treg. En ratones, las citocinas asociadas con este el subconjunto de Treg incluyen TGF- β e IL-10 solubles y unidos a la membrana celular. Tanto los mecanismos dependientes del contacto que implican al TGF- β unido a la membrana para bloquear la proliferación de células T como los mecanismos independientes del contacto que implican al TGF- β soluble y la IL-10 se han invocado para describir la función de estos Tregs (Ostroukhova, M., & Ray, A. et al. 2005). Estas células se originan en el timo en respuesta a auto-antígeno (Noble, A., Giorgini, A. et al. 2006). Existen otros marcadores que las nTregs expresan a niveles muy altos en comparación con las

iTregs, entre los cuales se encuentran: PD-1, Nrp1, Helios y CD73 (*Lin and Chen et al. 2013*).

3.7.1.2 CÉLULAS T REGULADORAS INDUCIDAS (iTregs)

A diferencia de los nTregs, los iTregs son Tregs inducidos periféricamente. Las células T CD4⁺ naive en la periferia son inducidas a expresar Foxp3 en respuesta a antígenos extraños antígeno (*Noble, A., Giorgini, A. et al. 2006*), y estas células tienen una función supresora similar a nTregs (*Kretschmer, K., Apostolou, I. et al. 2005*). Además, se han descrito bien dos poblaciones de pTreg: Th3 y Tr1 que son células Foxp3⁻ y que también tiene actividad supresora y se originan principalmente por la estimulación con citocinas, presentan una alta secreción de TGF-β e IL-10, respectivamente (*Becker, C., Stoll, S. et al. 2006*). El primero ha sido identificado por su papel en la tolerancia oral; y Tr1 por su participación en la prevención de la colitis autoinmune. Ambos se generan en sitios de inflamación crónica así como en tejido trasplantado (*Safinia, N., Scotta, C. et al. 2015*).

3.7.2 MECANISMOS DE SUPRESIÓN

Definir los mecanismos de la función de las células Treg es claramente de crucial importancia. Esto no solo proporcionaría información sobre los procesos de control de la tolerancia periférica, sino que probablemente proporcionaría una serie de objetivos terapéuticos potencialmente importantes. Aunque esta búsqueda ha estado en curso desde que el interés en las células Treg se reavivó en 1995 (*Sakaguchi S, Sakaguchi N et al. 1995*), ha habido un progreso significativo en los últimos años.

Desde una perspectiva funcional, los diversos mecanismos de supresión potenciales de las células Treg se pueden agrupar en cuatro modos de acción básicos: supresión por citocinas inhibitorias, supresión por citólisis, supresión por interrupción metabólica y supresión por modulación de células dendríticas (CD).

3.7.2.1 SUPRESIÓN POR CITOCINAS INHIBITORIAS

Las citocinas inhibitorias, como la interleucina-10 (IL-10) y el TGF β , han sido objeto de considerable atención como mecanismo de supresión mediada por células Treg. También ha habido un interés significativo en su capacidad para generar poblaciones de células Treg inducidas (también conocidas como adaptativas), ya sea de forma natural in vivo o experimentalmente como una posible modalidad terapéutica. Aunque la importancia general de IL 10 y TGF β como mediadores supresores es indiscutible, su contribución a la función de las células Treg naturales derivadas del timo sigue siendo un tema de debate (*Shevach EM et al. 2006*).

Otra molécula directamente asociada con la actividad supresora de las células Treg es la citocina IL-35, que confiere actividad reguladora a las células T CD4⁺ vírgenes y también suprime la proliferación de las células T (*Collison, L. W., Pillai, M. R. et al. 2009*). Curiosamente, se ha encontrado que los niveles de IL-35 están elevados tanto en suero como en tumores en pacientes con CCR, y se correlacionaron con metástasis tumorales. Además, las células Treg de pacientes con CCR fueron también capaces de secretar altos niveles de IL-35 (*Ma, Y., Chen, L. et al. 2016*).

3.7.2.2 SUPRESIÓN POR CITÓLISIS

La citólisis mediada por la secreción de granzimas se había considerado durante mucho tiempo el fuerte de las células asesinas naturales (NK) y de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) (Lieberman J. et al. 2003). Sin embargo, muchas células T CD4⁺ humanas exhiben actividad citotóxica. De acuerdo con esto, se ha demostrado que las células Treg naturales humanas activadas expresan la granzima B. Además, la muerte de las células diana fue mediada por la granzima B y la perforina a través de la adhesión de CD18 (Grossman, W. J., Verbsky, J. W. et al. 2004).

Aunque la mayoría de la investigación hasta la fecha sobre la citólisis inducida por células Treg se ha centrado en los mecanismos mediados por granzima B, un estudio reciente ha sugerido que las células Treg activadas inducen la apoptosis de las células T efectoras a través de un TRAIL-DR5 (Ren, X., Ye, F. et al. 2007). Además, se ha sugerido que las galectinas pueden mediar en la citólisis de una manera independiente de la granzima y la perforina (Toscano, M. A., Bianco, G. A. et al. 2007). Estos estudios enfatizan que se requiere más trabajo para definir los mecanismos citolíticos que usan las células Treg para mediar la supresión.

3.7.2.3 SUPRESIÓN POR INTERRUPCIÓN METABÓLICA

Debido a la alta expresión de IL-2R (CD25), las Tregs pueden reducir las concentraciones de IL-2 en el microambiente, lo que afectará negativamente la respuesta proliferativa de las células CD8⁺. El mecanismo parece menos

significativo para suprimir la proliferación de linfocitos CD4⁺, que se debe a que CD4⁺ y CD8⁺ difieren en su sensibilidad a IL-2 (*Chinen, T., Kannan, A. K. et al. 2016*).

Además, Las células Treg expresan la ecto-enzima CD73, que junto con CD39 puede hidrolizar el ATP extracelular en adenosina, un potente inmunosupresor. Se sabe que la adenosina extracelular se acumula en el microambiente tumoral, suprimiendo la respuesta inmune antitumoral. Los niveles de adenosina pueden aumentar en respuesta a la inflamación crónica, que es una característica del CCR. Por tanto, la ablación de CD73 suprimió significativamente el crecimiento de la línea celular de cáncer de colon MC38, en una vía dependiente de células T CD8⁺. Este efecto se asoció con un aumento del nivel de células T CD8⁺ específicas de antígeno y de la producción de IFN- γ en sangre periférica y localmente en los tumores (*Stagg, J., Divisekera, U. et al. 2011*).

3.7.2.4 SUPRESIÓN POR MODULACIÓN DE CELULAS DENDRÍTICAS

La supresión específica de antígeno es causada principalmente por la interacción directa Treg-CD habilitada por el reconocimiento específico del antígeno (Ag) que la CD presenta como parte del MHC-II por medio de Treg TCR. En última instancia, tal interacción da como resultado la inducción de una célula dendrítica tolerogénica específica de Ag o haciendo que las CD sean incapaces de presentar un antígeno específico. Los mecanismos de tal supresión son diversos. Incluyen la unión de las moléculas de coestimulación CD80-86/CTLA-4 (*Onishi, Y., Fehervari, Z. et al.*

2008); y un aumento mediado por CTLA-4 en la expresión deIDO en las células dendríticas, que reduce la concentración de triptófano necesaria para que proliferen los linfocitos T efectores (*Fallarino, F., Grohmann, U. et al. 2003*).

Los mecanismos adicionales por los cuales las células Treg pueden actuar para controlar la respuesta inmune a través del contacto celular implican la interacción de LAG-3 en las células Treg con MHC-II en las DC inmaduras, lo que lleva a la supresión de la maduración de las DC (*Liang, B., Workman, C. et al. 2008*). El receptor LAG-3 se sobreexpresa en células Treg de pacientes con CCR y metástasis hepática, y un bloqueo de anticuerpos de LAG-3 aumentó la proliferación y la producción de citocinas efectoras de las células T intratumorales (*Zhou, G., Noordam, L. et al. 2018*).

Además, Treg de las últimas etapas de CAC en un modelo murino mostraron un fenotipo activado caracterizado por una mayor expresión de moléculas PD-1, Tim-3 y CD127 en sus membranas, lo que sugiere un incremento en la capacidad supresora (*Olguín, J. E., Medina-Andrade, I. et al. 2018*). También se ha sugerido que las células Treg Tim3⁺ Foxp3⁺ representan células Foxp3⁺ residentes en tumores especializados que probablemente tienen un papel en la disfunción de las células T (*Das, M., Zhu, C. et al. 2017*).

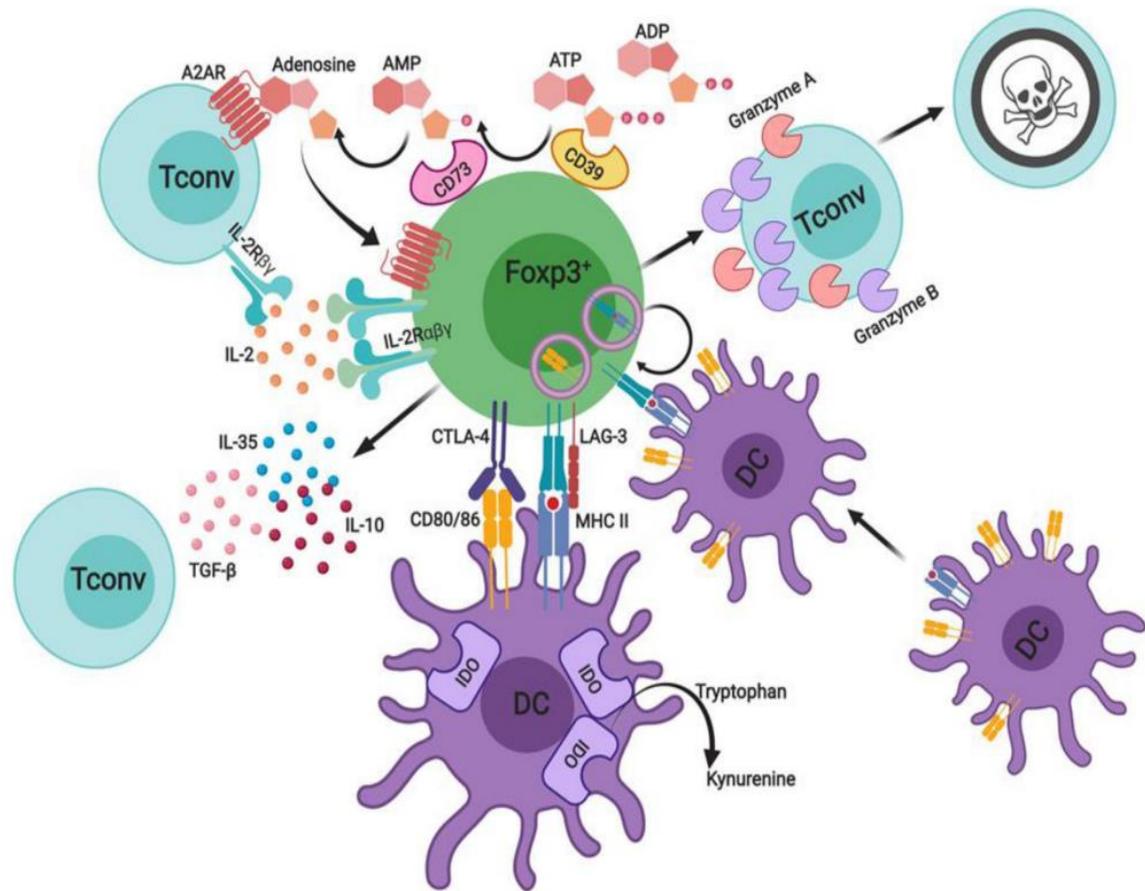


Figura 8. La naturaleza modular de la supresión de células Treg. Las células Treg suprimen las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas a través de múltiples mecanismos para reforzar la tolerancia inmunológica. Estos incluyen citocinas inhibitorias tales como IL-10, TGF- β 1 e IL-35, supresión de la presentación de antígenos por células presentadoras de antígenos profesionales (CTLA-4, LAG-3), citólisis de células diana dependiente de granzima y perforina. Los mecanismos adicionales incluyen la generación de adenosina inmunosupresora por las ectoenzimas CD39 y CD73 de las células Treg, y la competencia por IL-2 endógena a través de la expresión de la cadena alfa del receptor de IL-2 de alta afinidad (CD25). Imagen tomada de Georgiev, P., Charbonnier, L. M. et al 2019.

3.8 RATONES TRANSGÉNICOS FOXP3EGFP (KNOCK-IN)

Los genes indicadores fluorescentes se utilizan como herramienta para la obtención de imágenes biológicas. Los genes informadores fluorescentes de uso frecuente son la proteína fluorescente verde (GFP) y la proteína fluorescente roja (RFP). La GFP de la medusa *Aequorea victoria*, descubierta en 1962 por Shimomura (*Shimomura O, Johnson FH et al. 1962*), es una proteína compuesta por 238 residuos de aminoácidos (26,9 kDa) que exhibe una fluorescencia verde brillante cuando se expone a la luz en el rango de azul a ultravioleta (*Prendergast FG, Mann KG. et al. 1978*). Su descubrimiento desató un intenso interés en la investigación en la estructura, bioquímica y biofísica de proteínas fluorescentes similares a las GFP, lo que resultó en una avalancha de informes científicos sobre proteínas fluorescentes y sus aplicaciones para resolver una serie de problemas básicos en biología molecular y celular (*Chudakov DM, Matz MV et al. 2010*). Recientemente, los animales transgénicos EGFP se han utilizado para modelar enfermedades humanas (*Shetty et al. 2019*), ingeniería de tejidos (*Hirakata et al. 2016*) y ayudaron a los investigadores a revelar la biogénesis plaquetaria en los pulmones (*Lefrancais et al. 2017*).

Los ratones "Foxp3^{EGFP}", coexpresan EGFP y el factor de transcripción específico de células T regulador Foxp3 bajo el control del promotor endógeno. Para obtener este ratón KNOCK-IN *Haribhai et al. 2007* y colaboradores, aislaron el ADN genómico de Foxp3 de un clon de de cromosoma artificial bacteriano (Genome Systems) y se subclonó en el vector plásmido pKO (Lexicon). Se insertó un casete de ADN

compuesto por una secuencia de entrada ribosómica interna (IRES) unida a secuencias de EGFP y SV40 poli-A descendentes (BD Clontech) mediante ligación de extremos romos en el sitio de restricción SSPI inmediatamente aguas abajo del codón de parada de traducción Foxp3 y aguas arriba de la señal de poliadenilación endógena. También se insertó un casete PGK-neo en el sitio EcoRI en el intrón 9 de Foxp3 en la misma orientación que Foxp3, el cual estaba flanqueado (floxado) por dos sitios LoxP para permitir la recombinación mediada por Cre. Los plásmidos dirigidos se introdujeron mediante electroporación en células madre embrionarias SCC10 y se sometieron a selección con GeneticinTM. Los clones dirigidos con éxito se inyectaron en blastocistos C57BL/6, y los machos quiméricos se aparearon con hembras BALB/c de tipo salvaje (WT) para derivar hembras N1 que han transmitido el alelo bicistrónico junto con el inserto de casete PGK-neo (Foxp3EGFPneo) en la línea germinal. El casete PGK-neo se eliminó mediante el apareamiento de machos fundadores con ratones hembra Cre-deleter que albergan un alelo de recombinasa de Cre expresado de forma ubicua y constitutiva (*Lakso, M. et al 1996*). Los descendientes masculinos hemicigóticos para el alelo Foxp3EGFP (menos el casete PGK-neo) se desarrollaron normalmente y estaban libres de enfermedad. Los ratones Foxp3EGFP se retrocruzaron durante hasta siete generaciones en el fondo BALB/c (*Haribhai, D., Lin, W. et al 2007*).

Las proteínas autofluorescentes (AFP), como las GFP, son los indicadores más utilizados porque su expresión puede detectarse a nivel de una sola célula sin ningún

tratamiento invasivo de las células y sin la necesidad de sustratos exógenos. Sin embargo, se requiere una gran cantidad de expresión de AFP para detectar la fluorescencia sobre el fondo (*Tsien R. Y. et al. 1998*). Ésta es una limitación fundamental cuando se debe controlar la expresión de genes débilmente expresados, como el caso de muchas citocinas (*Bouabe, H., Liu, Y. et al. 2011*).

3.9 RATONES TRANSGÉNICOS $STAT6^{-/-}$ (KNOCK-OUT)

La forma más sencilla de evaluar el papel de un gen en particular es eliminar su expresión, ya sea por delección de la línea germinal o insertando sitios loxP que flanquean partes funcionalmente fundamentales del gen para permitir su delección condicional mediada por Cre. Por lo general, esto se logra mejor eliminando el primer exón. Sin embargo, se debe tener cuidado de descartar la expresión del gen a partir de sitios de inicio de la transcripción internos o mediante un corte y empalme alternativo de exones. Una estrategia alternativa es eliminar los exones que codifican la parte funcionalmente más importante de la proteína, como los que controlan su actividad catalítica o las interacciones esenciales con otras proteínas, ADN o ARN. Sin embargo, con esta estrategia existe el riesgo de generar péptidos o proteínas truncadas que pueden no ser funcionalmente neutrales, es decir, pueden tener una función negativa dominante evitando la activación de otras proteínas similares de formas que pueden ser difíciles de predecir y controlar (*Bouabe, H. et al. 2013*).

Para obtener el ratón $STAT6^{-/-}$, *Kaplan, M. H.* y colaboradores generaron una construcción de orientación genética que reemplaza los exones que codifican los

aminoácidos 505-584 de STAT6 con un casete que contiene el gen de resistencia a la neomicina. Esta región del gen STAT6 codifica el dominio SH2 requerido para la dimerización de STAT, asegurando así que cualquier proteína mutante que pueda producirse a partir del locus diana no será funcional. La construcción de direccionamiento se sometió a electroporación en células D3 ES, y el análisis Southern (ADN) de los clones resistentes a GeneticinTM reveló que 6 de 60 clones habían experimentado una recombinación homóloga en el locus STAT6. Los clones dirigidos correctamente se inyectaron en blastocitos BALB/c para generar quimeras. Una vez que el alelo STAT6 interrumpido se transmitió a través de la línea germinal, los heterocigotos se cruzaron para generar ratones homocigotos para la mutación STAT6 (*Kaplan, M. H., Schindler, U. et al. 1996*), mismo estudio en donde se demostró que los linfocitos T deficientes en STAT6 no se diferencian en células Th2 en respuesta a IL-4 o IL-13.

Posteriormente, resultados obtenidos en modelos de inducción de cáncer en ratones STAT6^{-/-} sugieren que STAT6 es fundamental en los primeros pasos del desarrollo de cáncer para modular las respuestas inflamatorias y controlar el reclutamiento y la proliferación celular (*Leon-Cabrera, S. A. et al. 2017*) (*Fu C, Jiang L et al. 2019*).

4. ANTECEDENTES DIRECTOS

Estudios previos han identificado varios componentes del microambiente tumoral que influyen en el comportamiento y la progresión maligna. Además de las células malignas, en el microambiente tumoral están presentes adipocitos, fibroblastos, linfocitos, células dendríticas y fibroblastos asociados al cáncer. Cada uno de estos tipos de células tiene capacidades inmunológicas únicas que determinan si el tumor sobrevivirá y afectará a las células vecinas (*Arneth B. et al. 2019*). En estudios anteriores en nuestro laboratorio, al utilizar un modelo experimental de CAC que presenta semejanzas al cáncer esporádico que se desarrolla en humanos, se determinó que el 70% de los animales deficientes en STAT6 o en los cuales se inhibió farmacológicamente esta molécula, no desarrolla tumores en comparación a los animales silvestres en donde el 100% presenta crecimiento tumoral en la zona media y distal del colon. La disminución en la tumorigénesis estuvo acompañada por una disminución en el infiltrado leucocitario y en la producción de citocinas pro-inflamatorias en el colon, sugiriendo que mecanismos inmunomoduladores pueden estar implicados (*Leon-Cabrera, S. A. et al. 2017*). Además *Angel Ocaña et al. 2019*, demostró que al inducir cáncer colorrectal en ratones STAT6^{-/-} y que también se les administró un anticuerpo anti-CD25 sí desarrollaron gran cantidad de tumores al finalizar el experimento. Recientemente se ha observado que ratones STAT6^{-/-} presentan una mayor porcentaje de células infiltrantes CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ en

etapas tempranas del tratamiento, además de que la ausencia de STAT6 puede promover el reclutamiento de células productoras de IL-10, como Tregs.

En el caso de CAC, existe un proceso inflamatorio crónico modulado en una etapa temprana por porcentajes de células Treg, pero esta modulación se exagera e impide que las células del sistema inmunológico ejerzan su función efectora sobre las células transformadas (Olgún, J. E., Medina-Andrade, I. et al. 2018).

5. JUSTIFICACIÓN

En México, se presentan anualmente 83,476 muertes por cáncer, perteneciendo el 8.5% a CCR, siendo considerado el primer lugar en mortalidad por cáncer y la inflamación crónica es una de los principales causas de CCR. Resultados obtenidos en modelos de inducción de cáncer en ratones STAT6^{-/-} sugieren que STAT6 es fundamental en los primeros pasos del desarrollo de cáncer para modular las respuestas inflamatorias y controlar el reclutamiento y la proliferación celular (Leon-Cabrera, S. A. et al. 2017) (Fu C, Jiang L et al. 2019). Por otro lado, se ha demostrado que en diferentes modelos deficientes de STAT6 se observan altos porcentajes de Tregs (Takaki, H. et al. 2008; Dardalhon, V. et al. 2008; Dorsey, N. J. et al. 2013), lo que sugiere que STAT6 podría ser la responsable de la disminución de Tregs, sin embargo, esta relación entre STAT6 y Foxp3 no ha sido investigada a fondo durante el CAC. Para ello, y para continuar con estas investigaciones, se tiene como objetivo obtener un ratón doble transgénico que no exprese STAT6 y que los Tregs expresen la EGFP para monitorear su actividad y

de esta manera evitar realizar tinciones intracelulares ya que su uso implica que unas células mueran, y en consecuencia obtener resultados alterados.

Para ello, contamos con ratones BALB/c F_{oxp3}^{EGFP} y BALB/c STAT6^{-/-}, con los cuales se harán cruza y retrocruzas para obtener un ratón doble transgénico que tenga ambas características. Futuras investigaciones en esta cepa de ratón nos permitirá entender el papel que juega STAT6 en el desarrollo de las células Treg durante el inicio y la progresión del CAC.

6. OBJETIVO GENERAL

Obtener una cepa de ratón doble transgénico Foxp3EGFP/STAT-6^{-/-} por cruza y retrocruza entre el ratón knock-in Foxp3EGFP y el ratón knock-out STAT-6^{-/-}, con el fin de facilitar el estudio del papel de STAT6 sobre las células T reguladoras durante el cáncer de colon asociado a colitis.

7. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener la cepa doble transgénica STAT6^{-/-}Foxp3EGFP de fondo genético BALB/c.
2. Caracterizar la cepa doble transgénica STAT6^{-/-}Foxp3EGFP de fondo genético BALB/c.
3. Analizar el porcentaje de Tregs circulantes en los ratones doble transgénicos.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

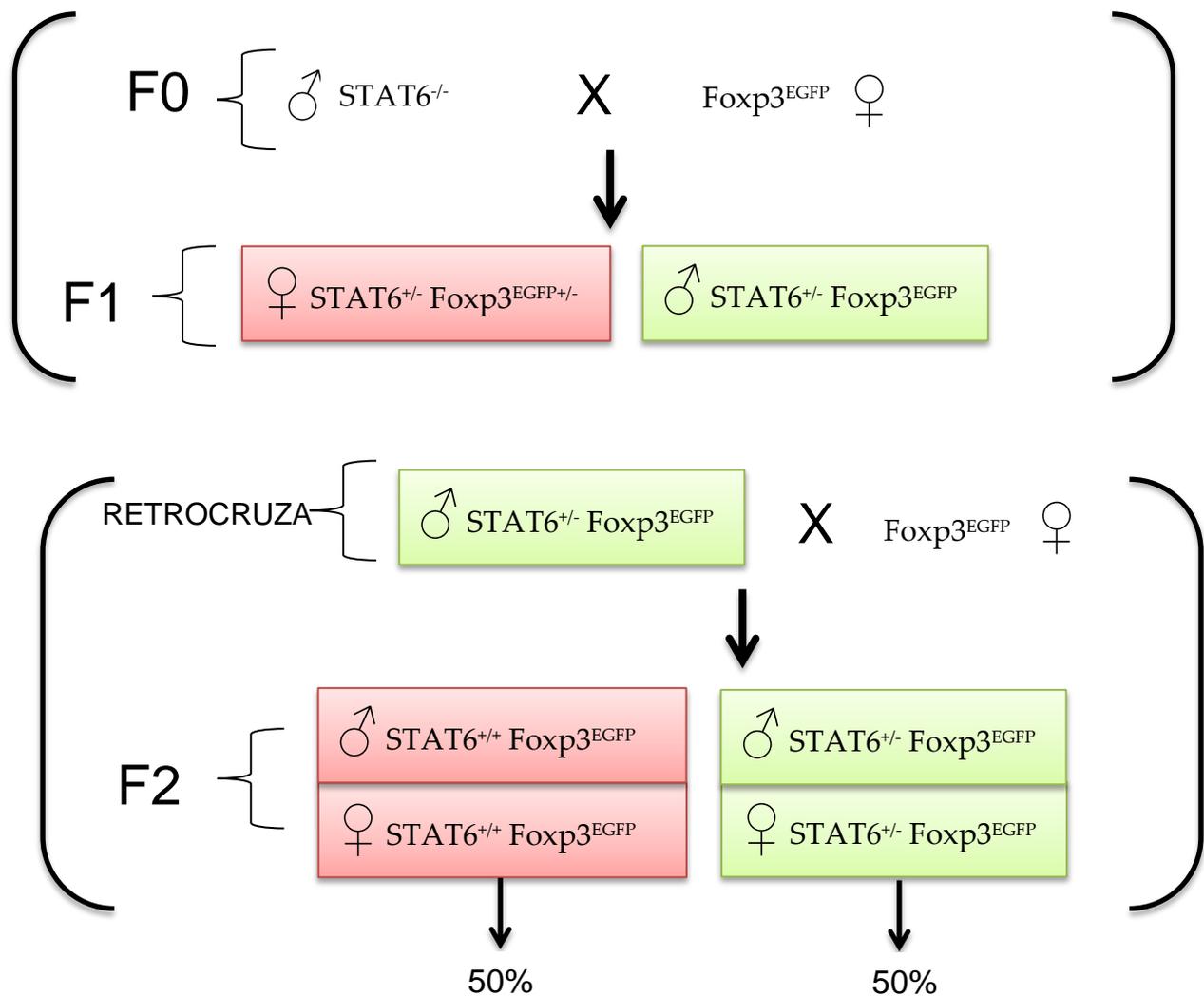
8.1 RATONES

Para el presente trabajo se utilizaron ratones transgénicos BALB/c Foxp3^{EGFP} (C.Cg-Foxp3^{tm2tch/j}) de laboratorios Jakson , cuyos pies de cría fueron donados por el Dr. Rafael Saavedra Durán, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Además se usaron ratones BALB/c STAT6^{-/-} (C.129S2-STAT6^{tm1Gru/j}). Las dos cepas de ratón se reprodujeron en el bioterio de la FES-I y se mantuvieron en jaulas de policarbonato, con viruta de madera y agua y alimento ad libitum estériles, a temperatura ambiente y con ciclos de luz oscuridad de 12 x 12 hrs.

8.2 CRUZAS DE RATONES BALB/c STAT6^{-/-} MACHOS y BALB/c Foxp3^{EGFP} HEMBRAS

Teniendo en cuenta las características de los ratones previamente descritas, se diseñaron cuadros de Punnet y se decidió realizar las cruzas esquematizadas en la **Fig. 9**. Esto se decidió tomando la ubicación de los genes Foxp3 y STAT6, los cuales se encuentran en los cromosomas X y 10 respectivamente. Ya que Foxp3 es un gen ligado al sexo, se usaron hembras Foxp3^{EGFP} porque al ser XX se garantizará que todos los descendientes de la primera generación (F1) tendrían un cromosoma con el gen Foxp3^{EGFP}. En cada generación obtenida se realizó la genotipificación de cada individuo mediante la obtención de material genético de la cola de cada animal. Se inició con la cruce F0 en la que se utilizaron machos BALB/c STAT6^{-/-} y

hembras BALB/c $Foxp3^{EGFP}$ para obtener la F1, de esta generación únicamente se ocuparon los machos $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/-}$ para realizar las retrocruzas con hembras $Foxp3^{EGFP}$. Al obtener la F2 se seleccionaron las hembras y machos con el genotipo $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/-}$ y se realizaron cruzas entre estos para dar origen a la F3. De la F3 se obtuvieron los primeros ratones dobles transgénicos $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{-/-}$, los cuales siguen siendo seleccionados para hacer las cruzas y obtener la F4 con el fin de seguir expandiendo la colonia.



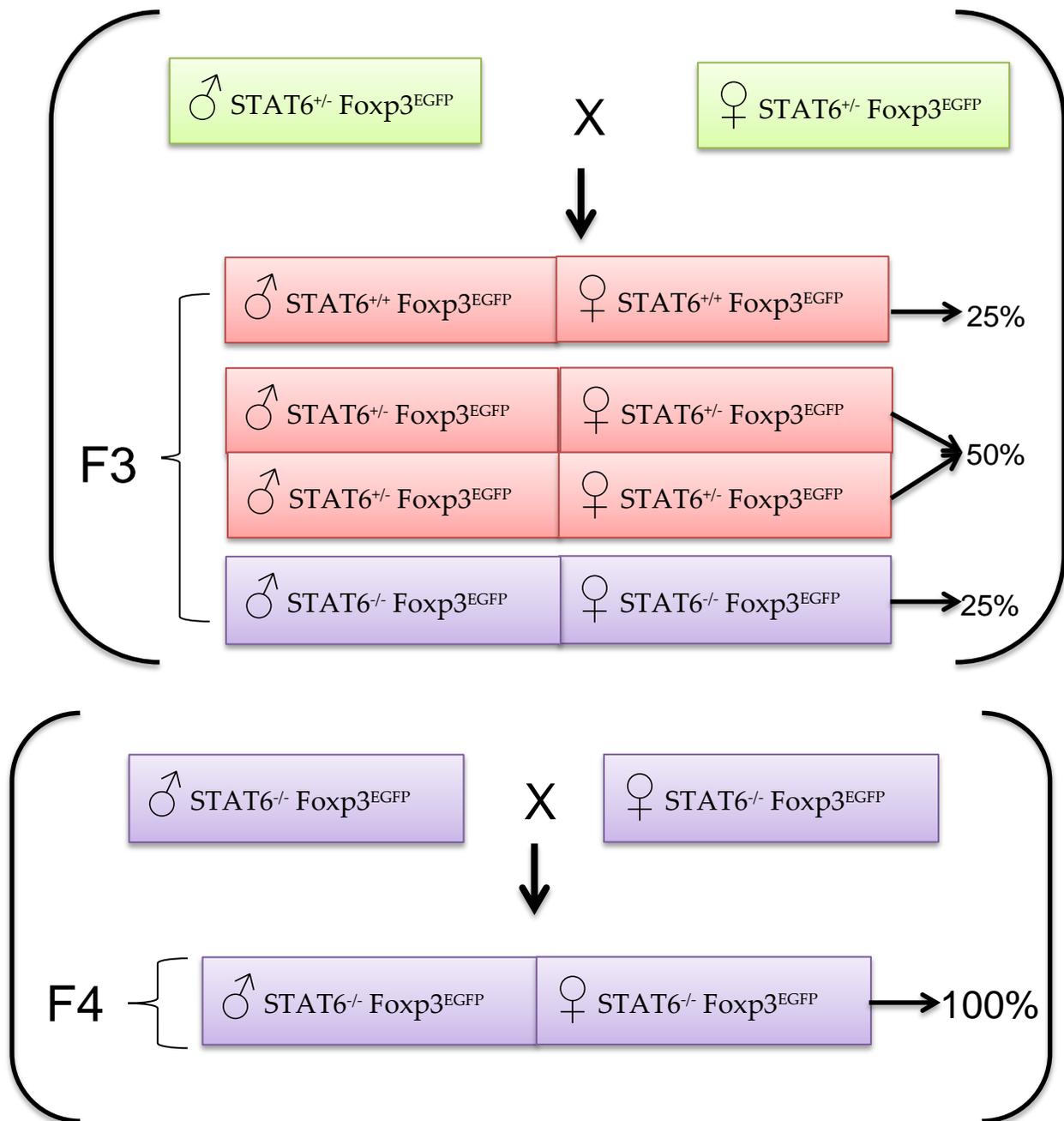


Figura 9. Esquema teórico de las cruzas para la obtención del ratón doble transgénico $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{-/-}$. Se comenzó con la cruce entre ratones $STAT6^{-/-}$ machos y hembras $Foxp3^{EGFP}$ (F0) para obtener la F1, de la cual se ocuparon solamente los machos para realizar las retrocruzas con hembras $Foxp3^{EGFP}$ para obtener la F2. Una vez obtenida la F2 se seleccionaron a machos y hembras con genotipo heterocigoto para $STAT6$ para de esta manera tener una probabilidad del 25% de obtener los primeros ratones doble mutantes entre machos y hembras. Finalmente estos ratones se seleccionan y se hacen nuevas cruzas para mantener y expandir la colonia, correspondiendo a la F4.

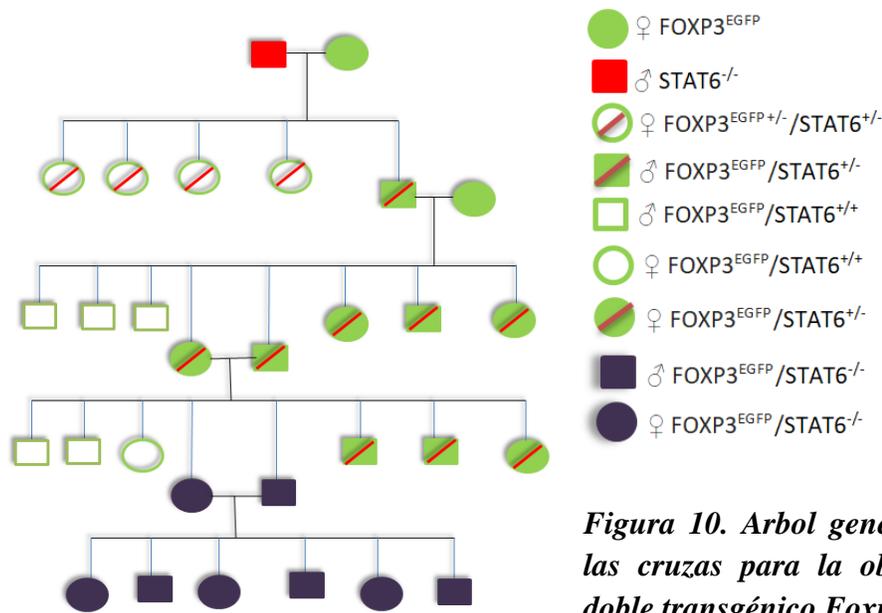


Figura 10. Arbol genealogico teórico de las cruces para la obtención del ratón doble transgénico *Foxp3*^{EGFP}/*STAT6*^{-/-}.

8.3 IDENTIFICACIÓN DE ANIMALES TRANSGÉNICOS

8.3.1 OBTENCIÓN DE SANGRE

Se corta la punta de la cola del ratón con tijeras de disección estériles y con la yema de los dedos se recorren oprimiendo la cola del ratón para obtener 50ul de sangre, la cual se deposita en un tubo Eppendorf con 20ul de EDTA (1.5 mg/ml), se agita una vez el tubo para mezclar la sangre con el anticoagulante y se mantiene en un recipiente con hielo hasta su uso.

8.3.2 INMUNOFLUORESCENCIA EN SANGRE TOTAL

Se colocan 50ul de sangre y 50ul de buffer de FACS en c/tubo para cada ratón problema con el anticuerpo Anti-CD4-APC *Biologend* y se deja incubar 1hr a 4°C en obscuridad total. Después de la incubación se agrega 1ml de Buffer de FACS para lavar el exceso de anticuerpo y se centrifuga 10min a 1500rpm a 4°C. Posterior

a la centrifugación se decanta tubo por tubo con cuidado de no romper la pastilla con las células y agitar ligeramente. Se agregan 3ml de solución Hemolizante durante 10 minutos exactos y se agrega 1 ml de Buffer de FACS para detener la reacción de lisis. Centrifugar 10 min a 1500 rpm a 4°C y decantar tubo por tubo y agitar. Se hace un lavado extra y se resuspenden las células en 300 µl de Buffer de FACS. Se leyeron las muestras en citómetro *Invitrogen Attune NxT cytometer* y se analizan los datos usando el software *FlowJo V10*.

8.3.3 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN DE TEJIDO POR DIGESTIÓN ENZIMÁTICA

Con la finalidad de cerciorarse de que efectivamente los animales KO con fondo balb/c eran STAT6^{-/-} y para tener un control sobre el genotipo de cada una de las crías de las cruas correspondientes se prosigue a extraer DNA de tejido mediante una digestión enzimática para comprobar mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la deficiencia o presencia de este gen. Con la ayuda de material quirúrgico se toma un fragmento de cola de aproximadamente 1 cm y se coloca en un tubo eppendorf de 1.5 ml al cual se le añaden 288 µl de buffer de lisis de proteinasa K y 6 µl de proteinasa K *Goldbio* 20 mg/ml los cuales se homogeneizan con la ayuda de un vortex. Posteriormente se incuba la muestra a 56°C durante 24hrs para la digestión total del tejido, transcurrido el tiempo, cada muestra se centrifuga a 13000 rpm durante 10min a 4°C, se recupera el sobrenadante (fase acuosa) y se coloca en un tubo nuevo. Para precipitar el DNA se agregan 500 µl de isopropanol frío (-20°C) y se homogeneiza la mezcla cuidadosamente por inversión; una vez

homogeneizado se centrifuga nuevamente a 13000 rpm 10 min a 4°C y se obtiene la pastilla de ADN decantando el sobrenadante; posteriormente se agregan 500 µl de etanol frío al 75% con la finalidad de lavar la pastilla y se resuspende la misma por inversión. Se centrifuga a 13000 rpm durante 10 min a 4°C y se decanta el sobrenadante; finalmente se deja secar la pastilla invirtiendo los tubos durante 1hr (hasta eliminar restos de etanol) y se resuspende el material genético con 200 µl de agua Milli-Q.

8.3.4 CUANTIFICACIÓN DE ADN

Se lee la densidad óptica a 260 y 280nm de la muestra de ADN en un espectrofotómetro “*Epoch TM Multi-Volume multi-sample Spectrophotometer System.*”

Para determinar la pureza de la extracción de DNA se ocupa la siguiente formula:

$$\text{Pureza} = \text{ABS } 260 / \text{ABS } 280$$

8.3.5 REACCIONES DE PCR

Para conocer el genotipo de cada una de las crías de las cruza, se realiza la PCR usando el kit “*Firepol DNA polymesare*” *Solis BioDyne* en un volumen final de 25 µl utilizando 500 ng de ADN de tejido, con la ayuda de un termociclador de descenso y ascenso rápido de temperatura “*BIO-RAD T100TM Thermal Cyler*” bajo las condiciones que se indican en la tabla 1, 2 y 4.

Tabla 1. Protocolo para llevar a cabo la PCR

Reactivo	Volumen
Enzima	0.3 µl
Buffer (10x)	2.5 µl
MgCl (25 µM)	2 µl
dNTP'S (400 µM)	1 µl
Pirmer Mutante (15 µM)	0.8 µl
Primer Común (15 µM)	0.8 µl
Primer Wild Type (15 µM)	0.8 µl
DNA	500 ng
H2O	Hasta volumen total de 25 µl/tubo

Tabla 2. Condiciones utilizadas en las etapas de PCR para STAT6.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	No. De ciclos
Desnaturalización inicial	94	1 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	35
Alineación	58	30 seg	
Extensión	72	30 seg	
Extensión final	72	7 min	1

Tabla 3. Secuencia de los cebadores utilizados para el genotipo de STAT6.

Temperaturas de alineación (T_m) y tamaño del producto (bp).

Gen	Temperatura de alineación	Amplicon (pb)		Secuencia 5' --- 3'
STAT6	58°C	275	<i>Forward</i>	AAG TGG GTC CCC TTC ACT CT
			<i>Reverse</i>	ACT CCG GAA AGC CTC ATC TT
Neo STAT6	58°C	380 pb	<i>Forward</i>	AAT CCA TCT TGT TCA ATG GCC GAT C

Tabla 4. Condiciones utilizadas en las etapas de PCR para Foxp3EGFP.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo	No. De ciclos
Desnaturalización inicial	94	1 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	35
Alineación	60	30 seg	
Extensión	72	30 seg	
Extensión final	72	7 min	1

Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados para el genotipo de Foxp3EGFP. Temperaturas de alineación (T_m) y tamaño del producto (bp).

Gen	Temperatura de alineación	Amplicon (pb)		Secuencia 5' --- 3'
Foxp3	60°C	275	<i>Forward</i>	GCG TAA GCA GGG CAA TAG AGG
Foxp3EGFP lox	60°C	325	<i>Reverse</i>	GCA TGA GGT CAA GGG TGA TG

8.3.6 ELECTROFORESIS Y REVELADO

Se prepara una solución de agarosa *Cleaver Scientific* al 1.5% en buffer TBE y se vierten 50 ml en la cámara de electroforesis y se deja gelificar. Posteriormente se cargan la muestras de las reacciones de PCR y éstas se corren por 110 Volts durante 35 minutos; como agente revelador se utiliza Bromuro de Etidio (BrEt) (0.5 µg/ml). Al terminar, el gel se visualiza en un transiluminador “*Gel doc TM EZ Gel Documentation System*” con luz UV y se toma una foto con ayuda del software “*Image lab*” para el análisis de resultados.

9. RESULTADOS

9.1 MONTAJE DE PCR PARA IDENTIFICAR LA AUSENCIA O PRESENCIA DEL GEN DE STAT6

Para realizar la genotipificación de los ratones que se obtendrían de cada cruce se llevó a cabo el montaje de un PCR para permitir la identificación de ratones $STAT6^{-/-}$.

Esta PCR consiste en amplificar el exón 10 del gen de $STAT6$, en los ratones WT el amplificado tiene un tamaño de 275 pares de bases (pb), pero en los ratones $STAT6^{-/-}$ el amplificado es de 380 pb.

Una vez que se obtuvieron los resultados de la reacción de PCR se pudieron identificar los 3 genotipos posibles en las diferentes generaciones (homocigotos para $STAT6$, heterocigoto y homocigotos para $STAT6$ KO). De esta manera se seleccionaron a los ratones adecuados para continuar con las cruces.

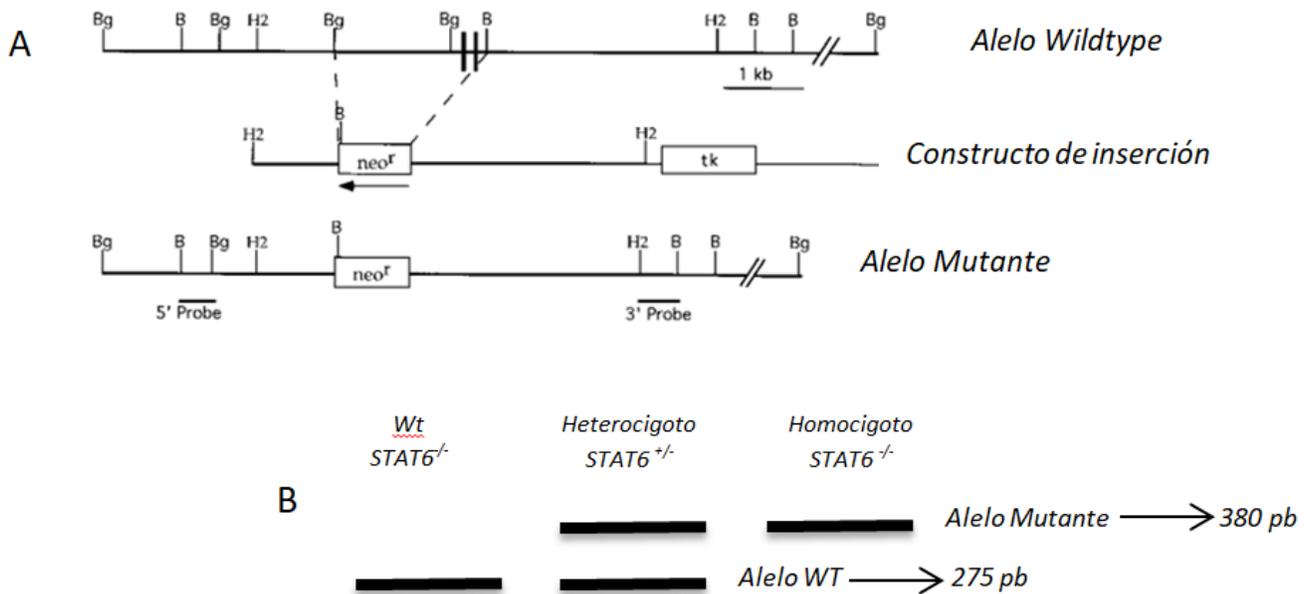


Figura 11. Análisis de ratones $STAT6^{-/-}$. **A)** Esquema del constructo de inserción en la disrupción del gen de $STAT6$. **B)** Esquema de las bandas esperadas en un gel de agarosa, después de la amplificación por PCR de ratones WT, $STAT6^{+/-}$ Y $STAT6^{-/-}$. Imagen tomada y modificada de Kaplan MH et al. 1996.

9.2 MONTAJE DE PCR PARA IDENTIFICAR LA PRESENCIA DE EGFP

Esta PCR consiste en amplificar la región entre el exon 9 y 10 del gen de Foxp3 ubicado en el cromosoma X, obteniéndose un amplicón más grande (325 pb) en ratones mutantes, y en ratones WT el tamaño del amplicón es de 275pb. Una vez que se obtuvieron los resultados de la reacción de PCR es posible identificar si las células Foxp3⁺ están expresando la EGFP.

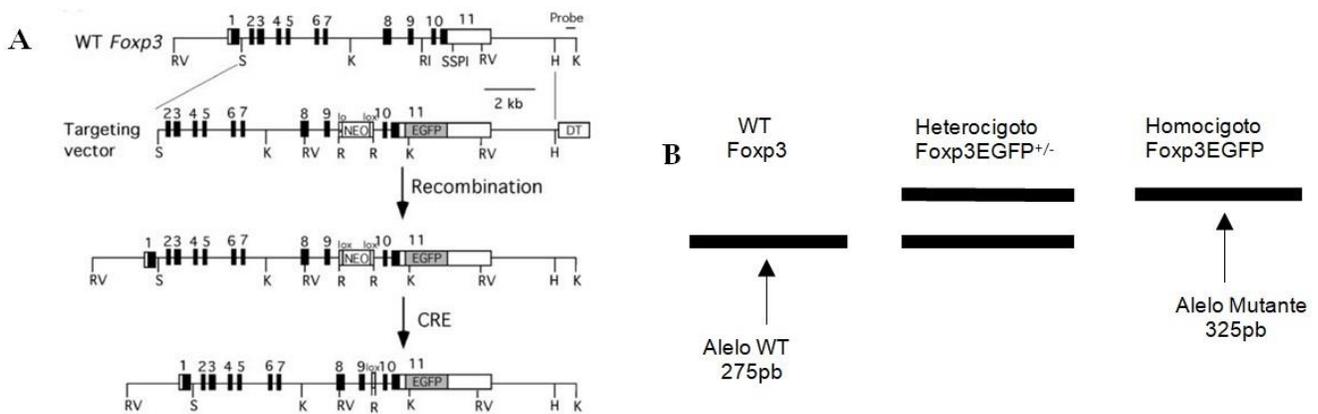


Figura 12. Análisis de ratones Foxp3EGFP. A) Origen de ratones con un locus Foxp3EGFP bicistrónico. B) Esquema de las bandas esperadas en un gel de agarosa, después de la amplificación por PCR de ratones WT y Foxp3EGFP^{-/-}. Imagen tomada y modificada de Haribhai MH et al. 2007.

9.3 ESTRATEGIA PARA OBTENER LA CEPA DOBLE TRANSGÉNICA

El ratón Foxp3^{EGFP} se generó por la inserción del gen de la proteína EGFP seguido de un codón de termino dentro del exón 11 de Foxp3. Estos ratones se desarrollaron normalmente y libres de enfermedades. Para obtener el ratón doble transgénico Foxp3^{EGFP}/STAT6^{-/-} se realizaron las cruza basándose en el esquema teórico que se

muestra en la figura 9. Se empezó con la cruce parental F0 en la que se utilizaron machos $STAT6^{-/-}$ y hembras $Foxp3^{EGFP}$, ambos con un genotipo de fondo BALB/c. Para realizar las cruces se tomó en cuenta la ubicación de los genes $Foxp3$ y $STAT6$, los cuales se encuentran en los cromosomas X y 10 respectivamente. Ya que $Foxp3$ es un gen ligado al sexo, se usaron hembras $Foxp3^{EGFP}$ porque al ser XX se garantizaría que todos los descendientes de la primera generación (F1) tendrían un cromosoma con el gen $Foxp3^{EGFP}$ y por lo tanto el transgen se fijaría en todos los individuos de la F1.

La descendencia F1 sería en su totalidad heterocigoto para el gen de $STAT6$ por tratarse de un gen autosómico. Por otro lado, tenemos el transgén de EGFP que por las características que se mencionan, las hembras serían heterocigotas, es decir, con un genotipo $Foxp3^{EGFP +/-}$ mientras que los machos, al ser XY serían hemicigotos y ya tendrían fijado el gen de EGFP. Por esta razón se ocuparon únicamente los machos de la F1, que generarían el genotipo $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/-}$; los machos con este genotipo se usarían para realizar las retro cruces con hembras $Foxp3^{EGFP}$ y de esta forma asegurar que toda la generación de la F2 tenga fijado el gen de EGFP en su genoma.

Los ratones que se obtendrían de la F2 tendrían el transgen EGFP fijado en toda la población, de forma hemicigota en machos y homocigota en hembras. Respecto al gen de $STAT6$, se obtendrían ratones WT y heterocigotos de ambos sexos. Por lo tanto se obtendrían hembras y machos con los genotipos $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/-}$, los

cuales corresponden al 50% de la población, y ratones $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/+}$ el restante 50% de la población. Para seguir con nuestro objetivo se se seleccionarían a los machos y hembras con genotipo heterocigoto para STAT6, con los cuales se realizarón las siguientes cruzas y obtener la F3.

Como las cruzas para obtener la F3 sería con hembras y machos heterocigotos para STAT6, se obtendría un porcentaje del 25% de ratones $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/+}$, un 50% de ratones $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/-}$ y un 25% de ratones $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{-/-}$; estos últimos serían los primeros ratones dobles transgénicos. Finalmente para ampliar y mantener la colonia de ratones dobles transgénicos se realizarían cruzas entre estos últimos con un 100% de crías con genotipo $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{-/-}$, los cuales estarían listos para ser utilizados en los experimentos posteriores.

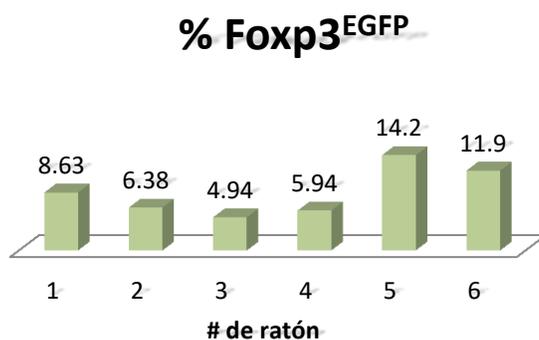
Tabla 6. Número de ratones obtenido en cada generación perteneciente a los diferentes genotipos posibles.

	$STAT6^{-/-}$	$Foxp3^{EGFP}$	$Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/+}$		$Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/-}$		$Foxp3^{EGFP}/STAT6^{-/-}$		$Foxp3^{EGFP+/-}/STAT6^{-/-}$
F0	2♂	4♀							
F1					3♂				7♀
F2			5♂	4♀	9♂	5♀			
F3			1♂		2♂	1♀	1♂	2♀	
F4							3♂	4♀	
Hoy							12♂	21♀	

9.4 DETECCIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para llevar a cabo la fenotipificación de los ratones que se obtendrían de las cruzas, se realizó la técnica de inmunotipificación y análisis por Citometría de flujo.

La estrategia de análisis que se utilizó se muestra en la *figura 13*, los dot plots mostrados corresponden a hembras utilizadas en la F0 y en las retrocruzas. De un “dot plot” de tamaño vs granularidad (FSC vs SSC) se seleccionó la población total donde se encuentran los linfocitos (R1) y de este “gate” se graficó tamaño vs CD4 (FSC vs CD4) y se seleccionó la población de linfocitos CD4+ (R2). Finalmente se analizó la población Foxp3 dentro de la población CD4+. De esta manera se verificó la expresión del transgen EGFP y se determinó el porcentaje de células T reguladoras. Este análisis se realizó para todos los ratones obtenidos de las diferentes cruzas.



Gràfica 1. Porcentajes de células Foxp3^{EGFP} de hembras utilizadas en F0 y retrocruza.

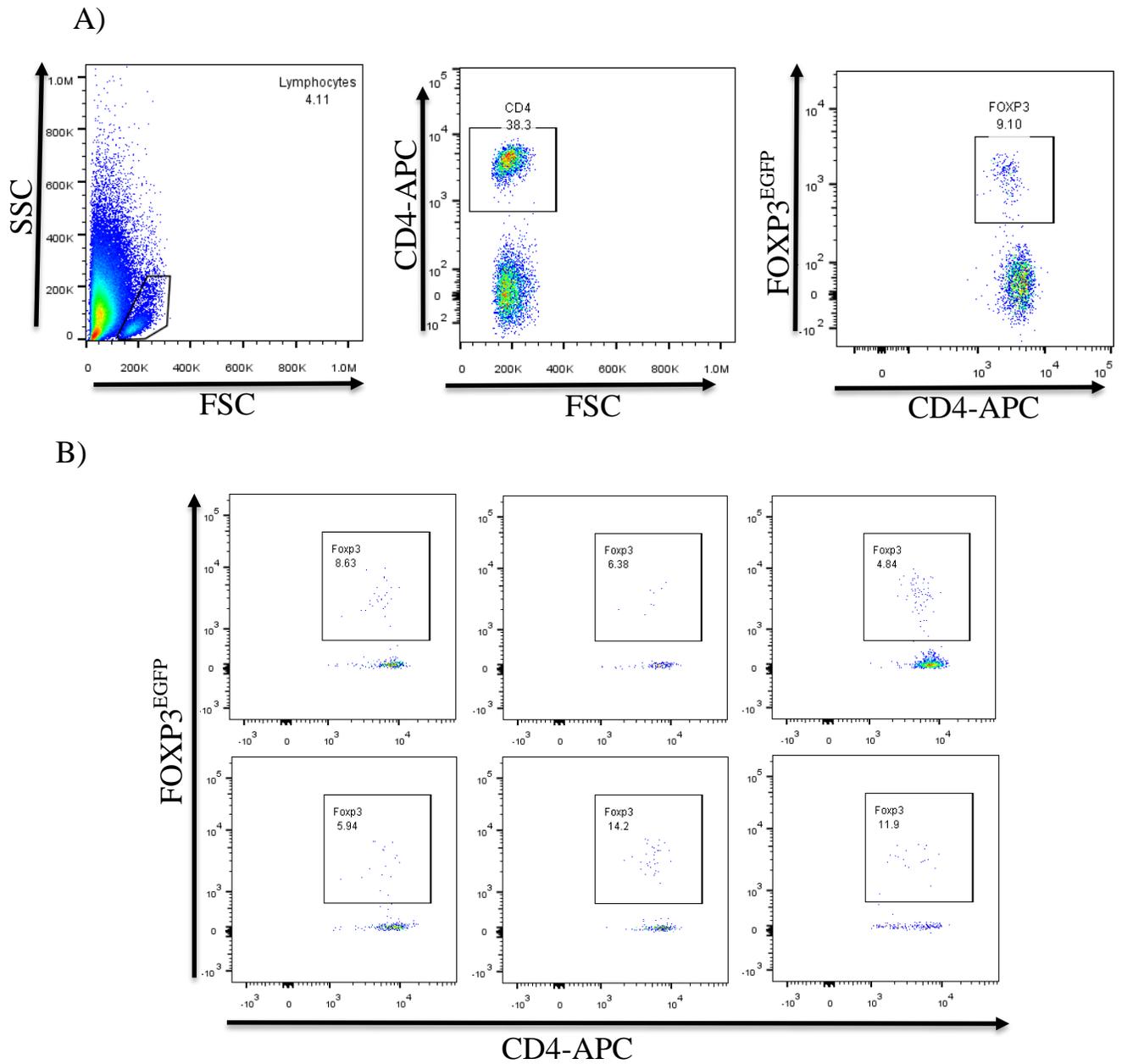


Figura 13. Análisis para identificar células T reguladoras en los ratones transgénicos *Foxp3^{EGFP}*. A) Estrategia de análisis para determinar el porcentaje de Tregs. B) Dot plots del fenotipo de ratones hembra utilizadas en la F0 y retro cruce, para determinar el porcentaje de Tregs.

9.5 CRUZAS

9.5.1 OBTENCIÓN DE LA F1

Se realizaron 2 cruzas parentales con machos $STAT6^{-/-}$ y hembras $Foxp3^{EGFP}$, y se obtuvieron los ratones de la F1, de los cuales fueron en total 3 machos y 4 hembras.

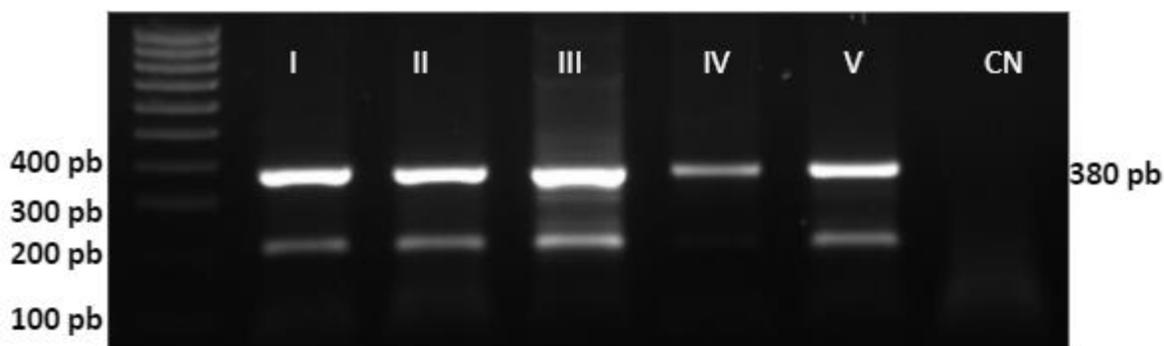


Figura 14. PCR del genotipo de machos parentales $STAT6^{-/-}$ de F0. Electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Se observa el marcador de peso molecular (carril M) y ratones $STAT6^{-/-}$ hembras (carriles I-III) y ratones $STAT6^{-/-}$ machos (carriles IV-V) y control negativo (carril CN).

9.5.2 OBTENCIÓN DE LA F2

Como se había descrito anteriormente, para poder obtener la F2, se tomaron únicamente 3 machos obtenidos de la F1 y se pusieron a cruzar con 2 hembras $Foxp3^{EGFP}$ cada uno. Se obtuvieron un total de 15 machos y 8 hembras de las 3 retrocruzas.

De la descendencia de las retrocruzas se obtendrían dos diferentes genotipos para el gen de $STAT6$: ratones $STAT6^{+/+}$ y ratones $STAT6^{+/-}$, por este motivo se realizó el genotipo para identificar a los machos y hembras heterocigotos para $STAT6$. En la

figura 15 podemos observar los geles de las electroforesis que muestran los amplificadores de los genotipos correspondientes. Se obtuvieron 9 machos y 5 hembras con el genotipo $STAT6^{+/-}$. En la *figura 16* se muestran los dot plots del fenotipo de animales $STAT6^{+/-}$, seleccionandolos para generar la F3.

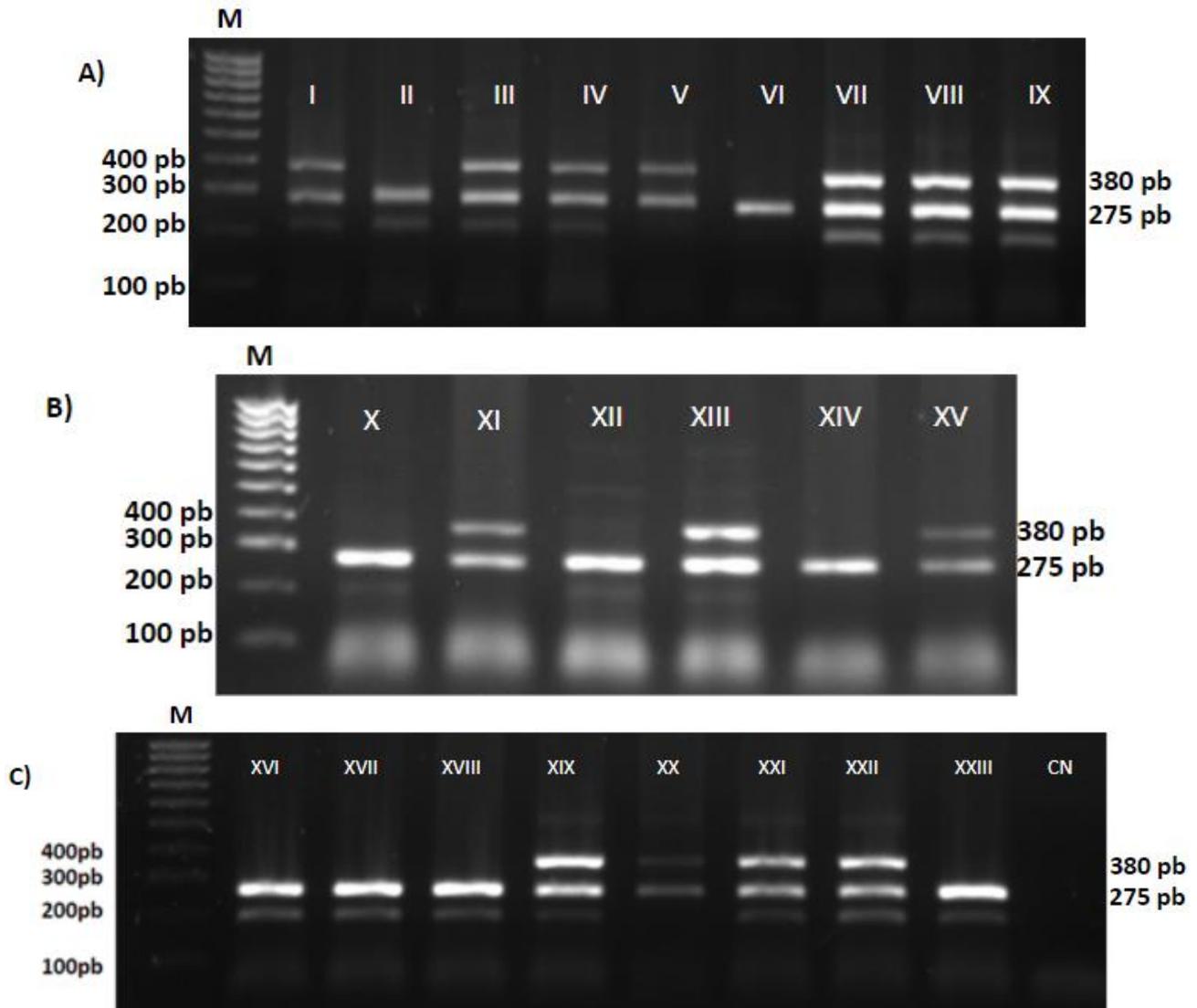


Figura 15. PCR del genotipo de ratones obtenidos de la F2. A): Marcador de peso molecular (carril M), ratones $STAT6^{+/-}$ (carriles I, III, IV, V, VII, VIII y IX), ratones $STAT6$ (carriles II y VII). **B):** Marcador de peso molecular (carril M), ratones $STAT6^{+/-}$ (carriles XI, XIII y XV), ratones $STAT6$ (X, XII y XIV). **C):** Marcador de peso molecular (carril M), ratones $STAT6^{+/-}$ (carriles XIX-XXII), ratones $STAT6$ (carriles XVI, XVII, XVIII y XXIII) y control negativo (carril CN). Se obtuvieron 9 machos y 5 hembras con el genotipo $STAT6^{+/-}$.

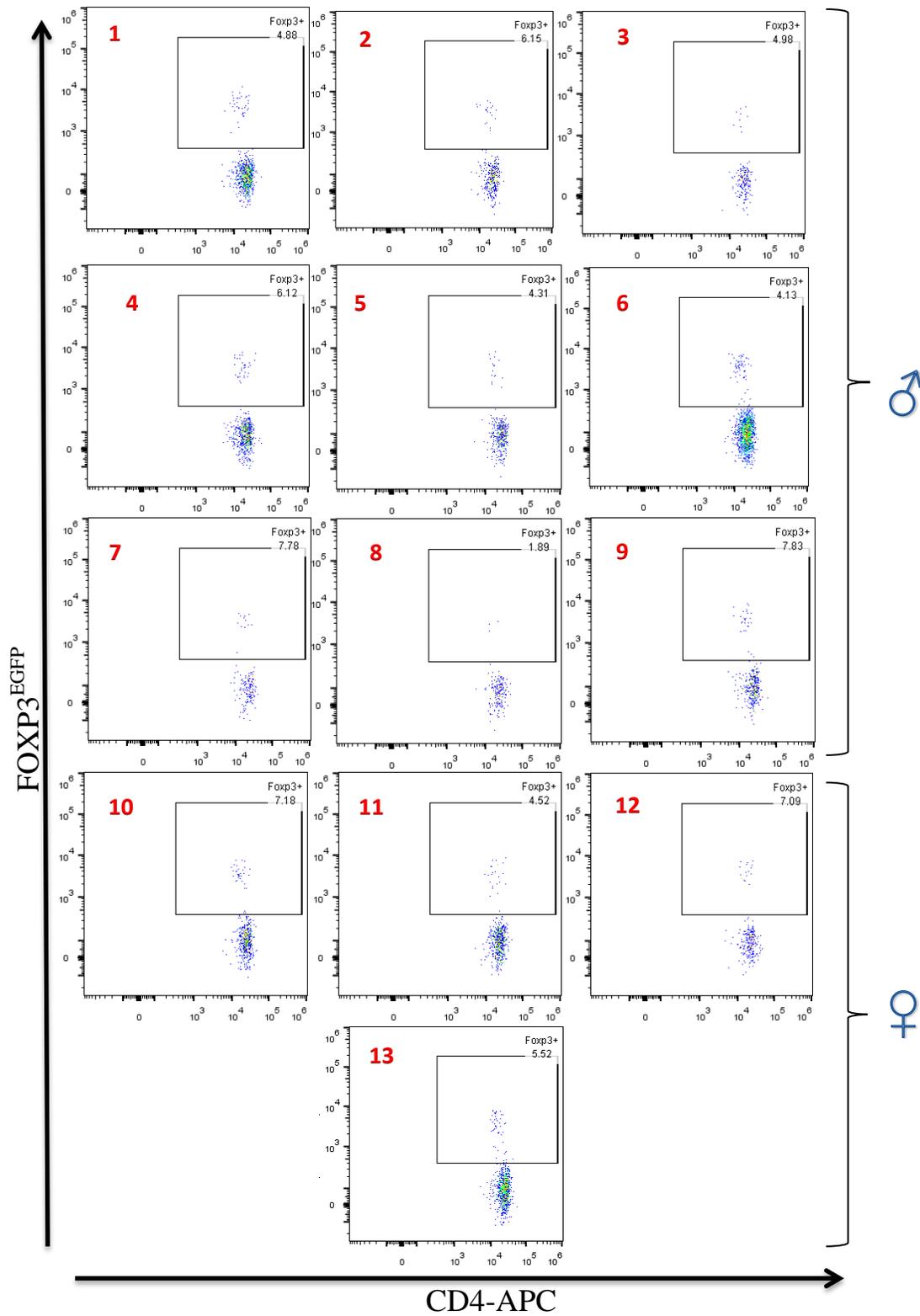
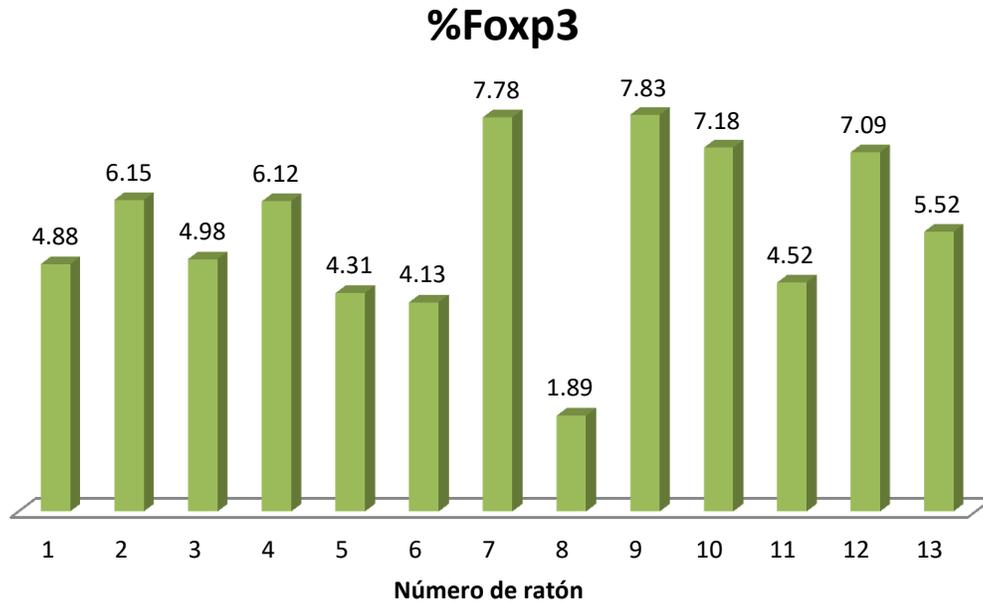


Figura 16. Dot plots del fenotipo de ratones de la F2 con genotipo $STAT6^{+/-}$ para determinar el porcentaje de Tregs. Los números rojos representan el número de ratón. Los ratones 9, 10 y 12 fueron seleccionados y puestos a cruzar para generar la F3.



Gráfica 2. Porcentajes de células $Foxp3^{EGFP}$ de ratones con genotipo $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/-}$ obtenidos en la F2.

9.5.3 OBTENCIÓN DE LA F3

Una vez identificados los ratones hembras y machos heterocigotos para STAT6 de la F2, se realizaron 2 cruzas para obtener la F3. Se obtuvieron 7 ratones en total, de los cuales 3 ratones son KO para STAT 6, 3 ratones heterocigotos y un ratón de tipo silvestre. En la **figura 17** podemos observar que en los geles de la electroforesis se encuentran los 3 diferentes genotipos, tal y como lo señalan teóricamente las leyes mendelianas (WT, $STAT6^{+/-}$ Y $STAT6^{-/-}$). En la **figura 18** se muestran únicamente los dot plots del fenotipo de animales $STAT6^{-/-}$, seleccionándolos con el fin de expandir la colonia.

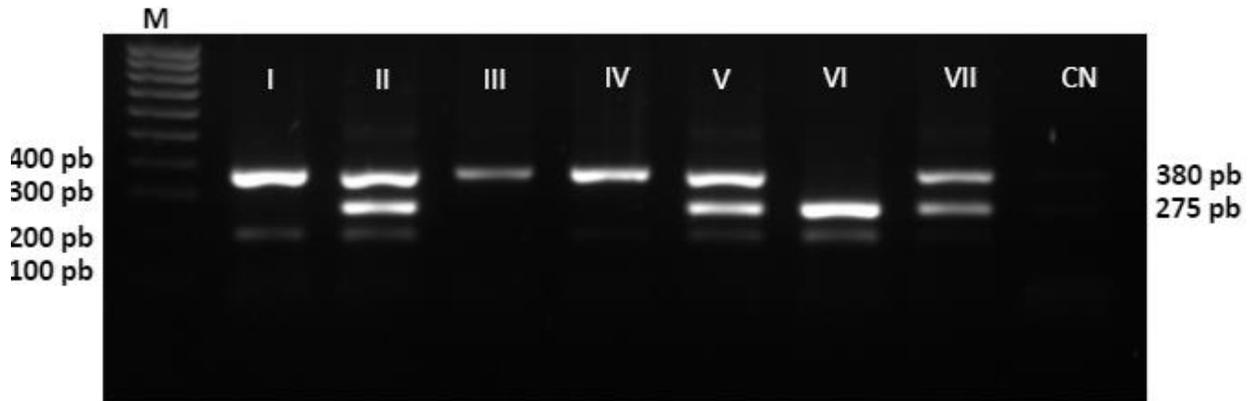
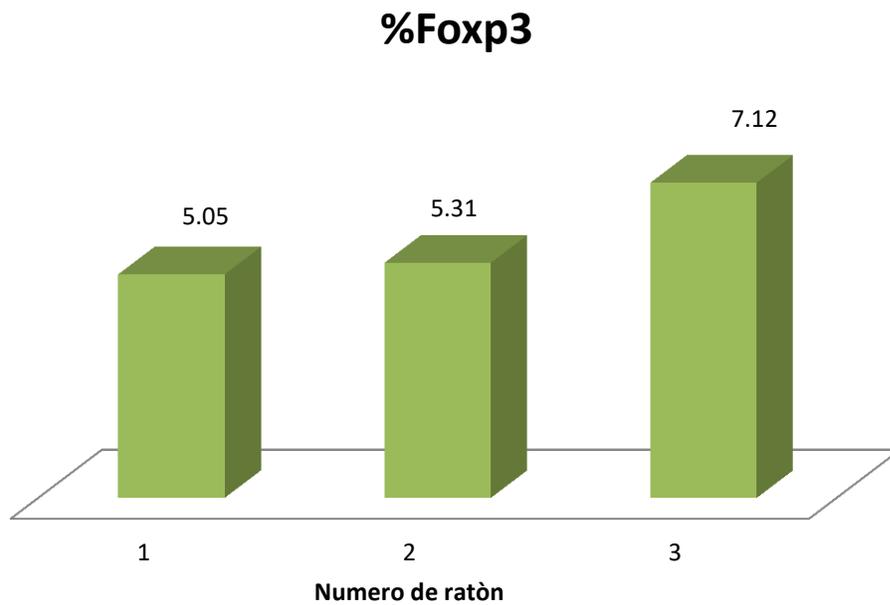


Figura 17. PCR del genotipo de ratones obtenidos de la F3. Marcador de peso molecular (carril M), ratones STAT6^{+/-} (carriles II, V y VII), ratones STAT6^{+/+} (carriles VI) y ratones STAT6^{-/-} (carriles I, III, y IV). Se obtuvo 1 macho y 2 hembras de genotipo STAT6^{-/-} y control negativo (carril CN).



Gràfica 2. Porcentajes de células F_{oxp3}^{EGFP} de ratones con genotipo F_{oxp3}^{EGFP}/STAT6^{-/-} obtenidos en la F3.

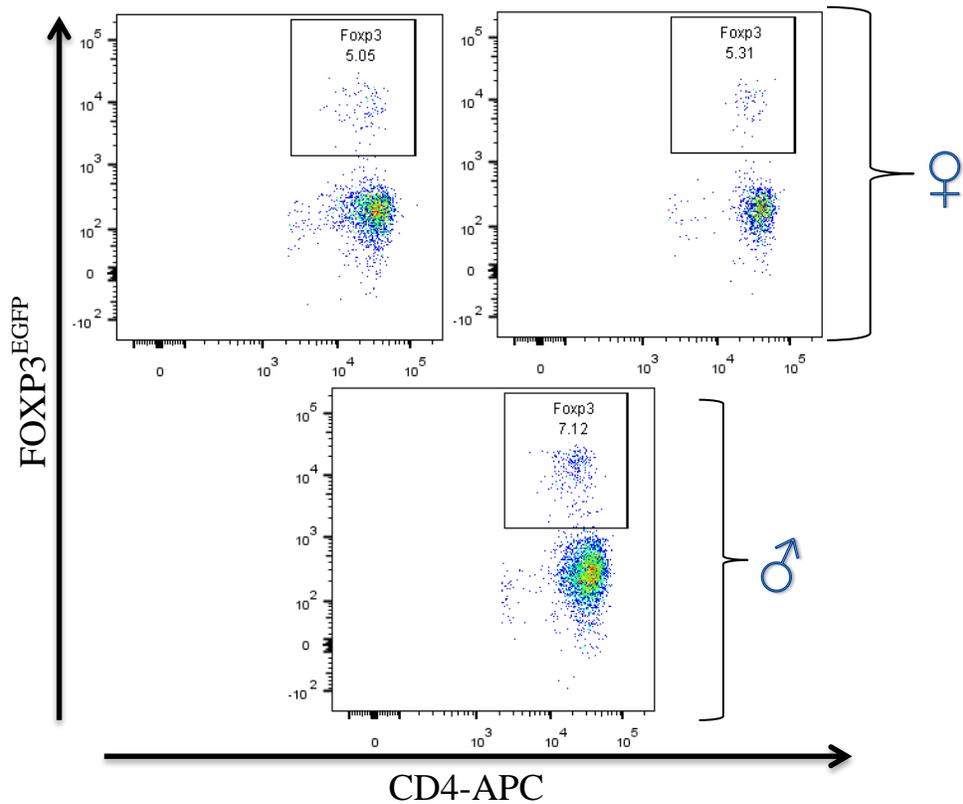


Figura 18. Dot plots del fenotipo de ratones de la F3 con genotipo $STAT6^{-/-}$ para determinar el porcentaje de Tregs. Estos 3 ratones fueron aislados y puestos a cruzar con el fin de expandir la colonia.

9.5.4 OBTENCIÓN DE LA F4

Una vez identificados los ratones hembras y machos $STAT6^{-/-}$ de la F3 se cruzaron para obtener la F4 y seguir expandiendo la colonia, en donde inicialmente se obtuvieron 7 ratones. En la **figura 19** podemos observar que en el gel de la electroforesis se encuentran crías 100% genéticamente iguales, perteneciendo al grupo $STAT6^{-/-}$.

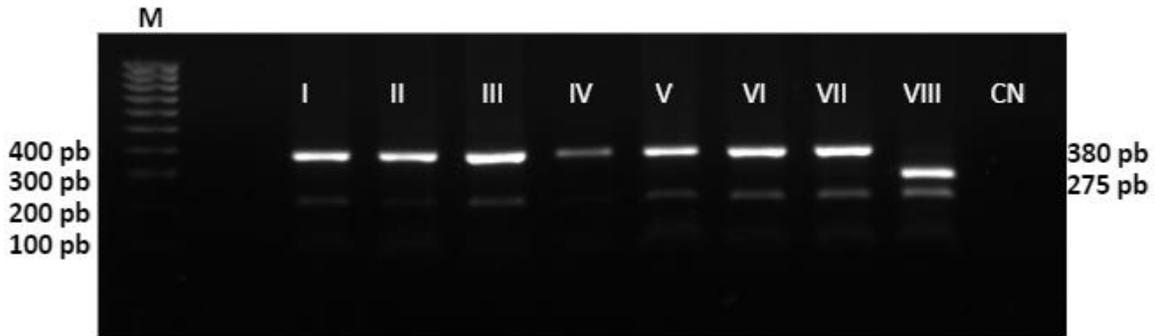


Figura 19. PCR del genotipo de ratones obtenidos de la F4. Marcador de peso molecular (carril M), ratones STAT6^{-/-} (carriles I-VII), control de ratón WT (carril VIII) y control negativo (CN). Se obtuvieron 4 machos y 3 hembras de genotipo STAT6^{-/-}.

Adicionalmente, al ser los primeros ratones dobles mutantes se realizó un PCR a los mismos ratones para corroborar la presencia del transgen EGFP y de esta manera se verificó que los ratones están co-expresando la proteína verde fluorescente. En la **figura 20** podemos observar que en el gel de la electroforesis se encuentran crías 100% genéticamente iguales, perteneciendo al genotipo *Foxp3*^{EGFP}. En la **figura 21** se muestran los dotplots de estos 7 ratones para determinar el porcentaje de Tregs, los cuales se pusieron a reproducir con el fin de seguir expandiendo la colonia.

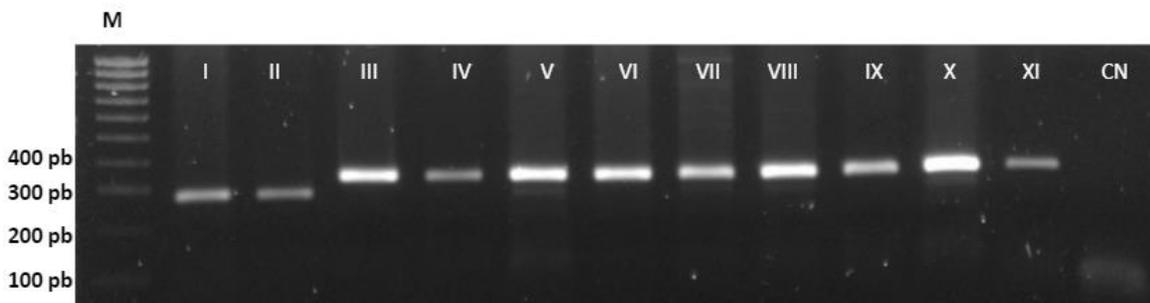


Figura 20. Electroforesis del PCR para corroborar la presencia del transgén de EGFP en los ratones *Foxp3*^{EGFP}/STAT6^{-/-}. Marcador de peso molecular (carril M), control de ratón WT (carril I y II), ratones *Foxp3*^{EGFP} (carril III-IX), control de ratón *Foxp3*^{EGFP} (carril X-XI) y control negativo (CN). Los 7 ratones STAT6^{-/-} *Foxp3*^{EGFP} expresan el transgén EGFP.

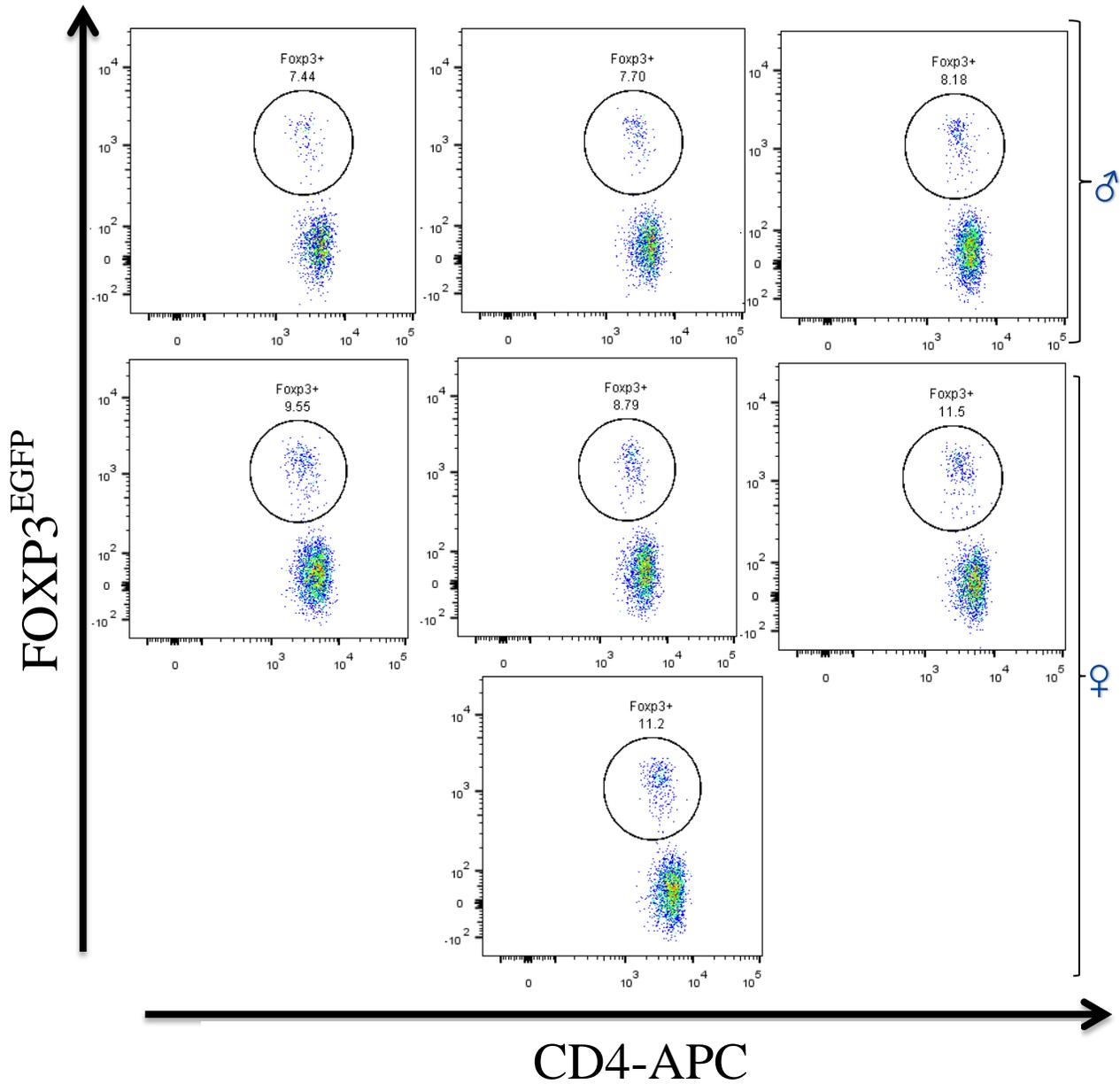
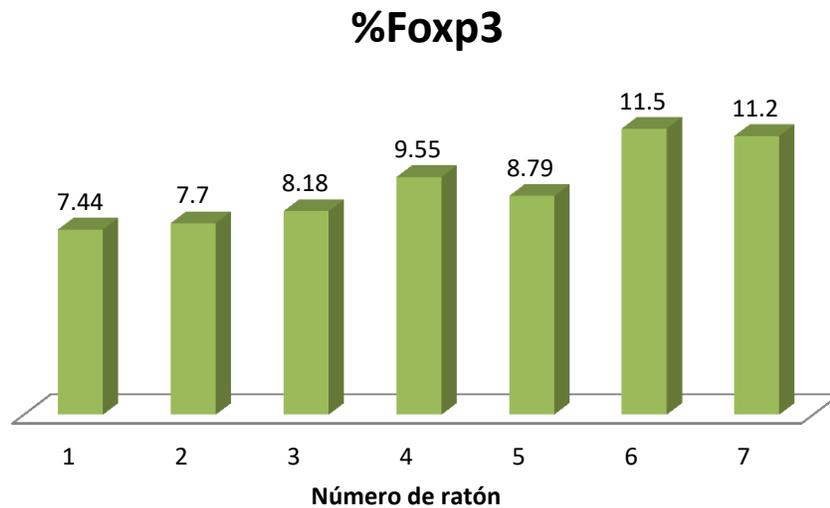


Figura 21. Dot plots del fenotipo de ratones de la F4 con genotipo *STAT6*^{-/-} *Foxp3*^{EGFP} para determinar el porcentaje de Tregs. Estos 7 ratones fueron aislados y puestos a cruzar con el fin de expandir la colonia.



Gràfica 2. Porcentajes de células $Foxp3^{EGFP}$ de ratones con genotipo $Foxp3^{EGFP}/STAT^{-/-}$ obtenidos en la F4.

10. DISCUSIÓN

Para montar las PCR de los genotipos de las cruza nos encontramos con varias situaciones que nos permitieron optimizar los resultados. Uno de los aprendizajes más importantes es que una vez que vayamos a re-suspender el ADN en agua, procurar hacerlo en el menor volumen posible para de esta manera obtener una concentración de aproximadamente 500ng/ μ l y únicamente colocar 1 μ l en el tubo de reacción de PCR, pues observamos que a mayor volumen de DNA se inhibe la capacidad enzimática debido a impurezas presentes en la muestra. Por otro lado y debido a un error de cálculos, se estaba colocando 5 veces más la cantidad óptima de dNTPS, pues una alta concentración de dNTPs conlleva a un decrecimiento de la especificidad y fidelidad del PCR, por lo que es importante que la concentración de

dNTPs usada esté equilibrada, con el objetivo de minimizar la incorporación de errores. En general 200 μ M de cada uno de los dNTPs puede usarse para la amplificación de un fragmento de 2kb durante 30 ciclos (Viljoen *et al.* 2005).

Una vez, teniendo estandarizada la reacción de PCR para genotipar a ratones STAT6^{-/-} se continuo con la realización de las cruzas para iniciar la obtención de la cepa transgénica. Para iniciar con las cruzas es de vital importancia identificar la ubicación genética de STAT6 y Foxp3, los cuales se encuentran en el cromosoma 10 y X respectivamente. Por lo tanto como Foxp3 es un gen ligado al sexo se utilizaron hembras Foxp3^{EGFP} las cuales tiene 2 cromosomas X, y de esta manera se garantizó que al cruzarla con un ratón STAT6^{-/-} toda la de descendencia de la primera generación tuviera un cromosoma con el gen Foxp3^{EGFP}. El 100% de los machos obtenidos de la primera generación al ser hemocigotos, tendrían fijado el gen EGFP desde la primera generación, y por otro lado las hembras son heterocigotas con un genotipo Foxp3^{EGFP+/-}. Respecto a STAT6, al ser un gen autosómico, el 100% de los descendientes tuvieron un alelo de STAT6 interrumpido, teniendo un genotipo heterocigoto STAT6^{+/-}. La diferencia entre al tamaño del amplicon para el genotipo de STAT6 es debida a que los ratones STAT6^{-/-} se les inserto un gen de resistencia a neomicina dentro del gen de STAT6 y como consecuencia de esta modificación, el gen del cassette de neomicina funciona como un codón de término durante la traducción, por lo tanto, el tamaño del amplicon es mayor en el gen de STAT6 mutado.

Para continuar con las cruzas, se tomaron únicamente a los ratones machos con genotipo $STAT6^{+/-}/Foxp3^{EGFP}$, representando el 42.85% de la población total obtenida. Cabe mencionar que no se realizaron genotipos para identificar STAT6 en esta generación, pues de acuerdo con la primera ley de Mendel, al cruzar 2 razas puras de una especie para determinada característica, el 100% de la descendencia de la primera generación filial serán genéticamente iguales, es decir, con un genotipo heterocigoto para STAT6 ($STAT6^{+/-}$). Con los machos obtenidos de esta generación se realizaron retrocruzas con hembras $Foxp3^{EGFP}$ para de esta manera asegurar que todos los cromosomas X presentes en la descendencia expresen EGFP. Respecto al gen de STAT6 se obtuvo un 60.8% de la población total con un genotipo $STAT6^{+/-}$, un porcentaje considerable pues teóricamente podíamos esperar una distribución 50-50 entre genotipos posibles $STAT6^{+/-}$ y $STAT6^{+/+}$.

No se utilizaron ratones hembras $STAT6^{-/-}$ y ratones machos $Foxp3^{EGFP}$ desde un principio, porque de haberlo hecho así solo se tomarían a las hembras de la F1 con el genotipo $Foxp3^{EGFP+/-}/STAT6^{+/-}$ y al hacer la retrocruza con machos $Foxp3^{EGFP}$ teóricamente solo un 25% de la población resultante entre machos y hembras tendrían un genotipo $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/-}$ que serían utilizados para poder obtener la F3, sin embargo, cuando utilizamos ratones machos $STAT6^{-/-}$ y ratones hembras $Foxp3^{EGFP}$ desde un principio, el porcentaje teórico resultante de ratones con genotipo $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/-}$ es del 50% entre machos y hembras presentando una mayor probabilidad lo que se traduce en ahorro de tiempo y recursos.

De esta manera, al tener fijado EGFP en todos los cromosomas X de la F2 se realizaron cruza entre hermanos con genotipo $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/-}$ para fijar el gen interrumpido de STAT6 en toda la población. Con esta cruza se da origen a la F3 en donde ya pudimos obtener los primeros ratones doble transgénicos $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{-/-}$, además de ratones con genotipo heterocigoto y WT para STAT6. Al realizar el genotipo de los individuos, se encontró que un 42.8% de ratones pertenecen al genotipo $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{-/-}$, otro 42.8% al genotipo $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/-}$ y un 14.28% al genotipo $Foxp3^{EGFP}/STAT6^{+/+}$. Estos porcentajes indican las frecuencias de los genotipos esperados, en donde además encontramos que de acuerdo con la ley de la segregación de Mendel, se puede recuperar el genotipo y fenotipo de la primera generación parental en por lo menos un 25% teórico. Es importante mencionar el alto porcentaje obtenido en los primeros ratones doble mutantes, pues se obtuvo una distribución casi al doble del esperado.

Por último la diferencia en el tamaño de las bandas en el genotipo de EGFP es debido a que los cebadores fueron diseñados para amplificar la región LoxP ubicada entre el exón 9 y 10 del gen de Foxp3, formada de la eliminación del casete PGK-neo por acción de la recombinasa Cre, el cual genera un amplicón de mayor tamaño en ratones mutantes (325pb) (*Haribhai, D., Lin, W. et al 2007*).

Estos primeros ratones doble mutantes se usaron como fundadores para seguir expandiendo la colonia para obtener la F4, y actualmente contamos con un total de

33 ratones entre machos y hembras, mismos que serán distribuidos para seguir expandiendo la cepa y para estudios futuros.

Durante estas cruzas pudimos observar varias cuestiones, y una de ellas es la heterogeneidad en el número de crías obtenidas en cada crua, pues el número de individuos no se mantuvo homogéneo. *Crawley, J. N. y colaboradores* mencionan que las cepas de fondo genético BALB/c muestran comportamientos copulatorios más bajos, en comparación con otras cepas de ratones, sin embargo esto no siempre ocurre. No encontramos cambios en el comportamiento de los ratones en las cruzas en comparación con ratones WT, sin embargo, los autores hacen incapie en que cada protocolo experimental representa un conjunto único de comportamiento, que están regulados por un conjunto único de factores ambientales, neuroanatómicos, neuroquímicos, neurofisiológicos y genéticos, que deben estar lo más controlados posibles.

A medida que se obtenían los ratones doble mutantes, todas las cruzas estuvieron bajo observación constante para detectar alguna anomalía, y aunque *Beck, J.* A reporte que en cepas consanguíneas se pueden presentar mutaciones puntuales que van a repercutir en el fenotipo, nosotros no encontramos ninguna anomalía que pudiera afectar la calidad de vida de nuestros ratones.

Los ratones transgénicos han revolucionado la investigación biomédica. Los ratones transgénicos se pueden utilizar para estudiar rutas bioquímicas y moleculares en cultivos primarios y suspensiones celulares derivadas de ratones transgénicos,

interacciones célula-célula utilizando múltiples proteínas fluorescentes en el mismo ratón y el ciclo celular en tiempo real y en todo el animal, y ellos se puede utilizar para realizar imágenes de tejido profundo en todo el animal, seguir el linaje celular durante el desarrollo y la enfermedad, y aislar grandes cantidades de un tipo celular puro directamente de los órganos (*Miller R. L. et al. 2011*).

Analizando el modo de generación de estos ratones KO Y KI (Cre-LoxP), podemos discutir cuestiones interesantes. Dado que los ratones knock-out generados por células *stem cells* modificadas revelan una tasa letal embrionaria más alta, la utilidad de los ratones knock-out completos es limitada. Para evitar el problema de la muerte embrionaria, se desarrolla otro tipo de ratones knockout, ratones knockout condicionales o inducibles. Estos ratones se generan utilizando el sistema LoxP-Cre, en donde se insertan dos loci LoxP en uno o varios exones importantes del gen objetivo para producir ratones floxados. Estos ratones expresan el gen diana normalmente cuando su genotipo es de tipo salvaje. Después de cruzar ratones floxed con ratones Cre, los exones floxed serán eliminados y resultará en la modificación del gen objetivo (*Jiang, Y. et al. 2017*). Sin embargo, con esta estrategia existe el riesgo de generar péptidos o proteínas que pueden tener una función negativa dominante evitando la activación de otras proteínas similares en formas que pueden ser difíciles de predecir y controlar, de esta manera se hace énfasis en conocer muy bien la fracción genética a eliminar (*Bouabe, H. et al. 2013*). Una forma de evitar esto es introducir mutaciones puntuales que inactivan una

función enzimática particular o evitan que la proteína interactúe con otras (*Saveliev, A. et al. 2009*). Por otro lado, las limitaciones del uso de genes reporteros deben tomarse con delicadeza, sin embargo, el uso de EGFP representa múltiples ventajas en comparación con genes como luciferasa, fosfatasa alcalina, cloranfenicol acetiltransferasa, β -galactosidasa o β -lactamasa pues su uso requiere de sustratos, se necesita de lisis o permeabilización de la célula y además tienen límites de detección bajos, por esta razón las proteínas autofluorescentes son los indicadores más utilizados porque su expresión puede detectarse a nivel de una sola célula sin ningún tratamiento invasivo y sin la necesidad de sustratos exógenos (*Bouabe, H., Liu, Y. et al. 2011*).

Para la cuantificación de células $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ se leyeron las muestras a 651 nm para células $\text{CD4}^+\text{-APC}$ y a 489 nm para células EGFP^+ , pues a estas longitudes de onda estos fluorocromos exhiben una mayor excitación. En la tesis de licenciatura *José Carlos Blanco Camarillo et al. 2016* en donde obtienen una cepa de ratón doble transgénica $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}/\text{IFN-}\gamma$, las células $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ de las diferentes generaciones reportan porcentajes entre 8-12%, sin embargo en nuestras generaciones no ocurre lo mismo pues este porcentaje se expresa en un rango del 5-12% en promedio y esto se debe a que como se puede observar en nuestros plots y en comparación con el número total de células analizadas en la tesis antes mencionada, el número de células es mucho mayor y esto podría tener una repercusión en el porcentaje de células EGFP^+ por dificultades en la estandarización de la técnica de citometría de

flujo lo cual pudo enmascarar esta fluorescencia. Sin embargo, una vez que se logró estandarizar la técnica el número de células aumentó y los porcentajes de células $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ se mantuvieron más homogéneos como se puede ver en los plots de la F3 y F4. Errores en la fase preanalítica y analítica contribuyen directamente en la obtención de datos. Aún así, la presencia del gen EGFP se identificó mediante la amplificación PCR de la secuencia residual loxP, formada en la generación de ratones $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$.

A causa del confinamiento actual provocado por la pandemia COVID-19, la inducción de CAC en esta cepa de ratón no pudo ser concluida, sin embargo se quiere realizar una indagación bibliográfica de la relación entre STAT6 y células Foxp3^+ hasta ahora reportada.

En un modelo de inducción de CAC se encontró un aumento en los niveles de IL10 en ratones $\text{STAT6}^{-/-}$. Esta es una citocina inmunorreguladora que es importante en la modulación de las respuestas inflamatorias durante el cáncer. La ausencia de STAT6 puede promover el reclutamiento de una población de células productoras de IL10, como es el caso de las Tregs. Las Treg son esenciales para mantener la tolerancia y modular a la baja las respuestas inmunitarias al secretar IL-10 tras su activación (*Leon-Cabrera, S. A. et al. 2017*). Otro estudio reportó bajos niveles de Tregs Foxp3^+ en etapas tempranas de inducción de cáncer en ratones $\text{Foxp3}^{\text{EGFP}}$ y que la activación del fenotipo de estas células es gradual y dependiente a la cronicidad del estímulo inflamatorio mediada por la expresión de PD-1, TIM-3 y CD127,

ejerciendo su actividad sobre células CD4⁺ y CD8⁺ (Olguín, J. E., Medina-Andrade, I. et al. 2018). La ablación transitoria de las células Treg mediante su depleción en ratones, suprimió el tamaño del tumor de colon; sin embargo, la tasa de mortalidad de estos ratones aumentó (Pastille, E. et al. 2014). Además las células Tregs Foxp3⁺ IL-17⁺ ó Th17, son más supresoras contra las células activadas por T CD8⁺ y, sorprendentemente, esta supresión se revirtió en presencia de un anticuerpo bloqueante anti-IL-17 (Ma, C. et al. 2011). Estos resultados son de especial interés pues en nuestro laboratorio se demostró que en la inducción de CAC se muestra un mayor porcentaje de células Foxp3⁺ en etapas tempranas en ratones STAT6^{-/-}.

In vitro, se ha demostrado que la inhibición de IL-4 ó STAT6 aumenta los niveles de células Foxp3⁺ inducidas por TGF- β , sugiriendo que Th2 anulan la diferenciación de iTregs, y de esta manera proponen que STAT6 reprime directamente la actividad del promotor de Foxp3 en la etapa de determinación del linaje temprano (Takaki, H. et al. 2008). Otro estudio revela que la inducción de FOXP3, un paso importante en el compromiso de iTreg, es inhibida por GATA3, que es el regulador clave para la polarización hacia las células Th2. Después de la diferenciación, las células efectoras Th2 se vuelven refractarias para convertirse en un fenotipo FOXP3⁺ (Mantel, P. Y. et al. 2007). Dardalhon, V. et al. 2008 mostraron que cuando se activan células T vírgenes en presencia de IL-4 y TGF- β , se inhibe la expresión de Foxp3 y se genera un subconjunto de células T que produce selectivamente IL-10 e IL-9. Aunque se sabe que las células productoras de IL-10 tienen propiedades

reguladoras, las células productoras de IL-9-IL-10 descritas aquí no regulan pero inducen la inflamación tisular. Por el contrario, *Yang, W. C. et al. 2017* exhiben que la presencia de IL-4 fue asociada con un incremento en la sobrevivencia celular y expresión de granzimas de Tregs, sugiriendo el papel esencial de IL-4 en apoyo a la supresión inmune mediada por células Tregs.

Por último se quiere hacer mención de la importancia de las células no hematopoyéticas en el desarrollo de CAC. *Lin, Y et al. 2019* revela un papel directo de STAT6 en la interrupción de la integridad de la unión estrecha epitelial y el desarrollo de colitis. Estos datos sugieren a STAT6 como un objetivo terapéutico y profiláctico potencial para la IBD y CAC (*Lin, Y et al. 2019*) (*Leon-Cabrera, S. A. et al. 2017*).

11. CONCLUSIONES

El presente trabajo tuvo como objetivo principal obtener una cepa de ratón doble transgénica, la cual expresara EGFP después del factor de transcripción Foxp3 y que además no expresara el factor de transcripción STAT6. Este ratón STAT6^{-/-}/Foxp3^{EGFP} fue obtenido mediante cruza y retrocruza entre los ratones BALB/c Foxp3^{EGFP} y BALB/c STAT6^{-/-}. Futuras investigaciones en esta cepa de ratón nos permitirá entender el papel que juega STAT6 en el desarrollo de las células Tregs durante el inicio, desarrollo y la progresión del CAC.

La estandarización óptima de las técnicas utilizadas en el laboratorio de investigación es de vital importancia para la obtención de datos, pues su calidad

requiere de una gran cantidad de trabajo de documentación y de una capacitación continua del personal técnico, administrativo y profesional. La normativa internacional exige que la persona que efectúa un análisis o realiza un procedimiento, sepa el fundamento científico de lo que está haciendo, lo que conduce a la exigencia de capacitar constantemente y certificar al personal.

Los ratones transgénicos representan una poderosa herramienta para que la comunidad científica estudie eventos genéticos, moleculares, bioquímicos y fisiológicos en tiempo real, con resolución y especificidad similar a la obtenida en cultivo celular. El uso de genes reporteros como EGFP representa múltiples ventajas en comparación con otros genes pues su uso no requiere de sustratos, lisis o permeabilización de la célula y además tienen límites de detección altos, por esta razón las proteínas autofluorescentes son los indicadores más utilizados porque su expresión puede detectarse a nivel de una sola célula sin ningún tratamiento invasivo y sin la necesidad de sustratos exógenos. Los animales transgénicos son claves para encontrar la cura de varias enfermedades, mejorar la calidad de los alimentos, reducir los costos de productos farmacéuticos, cumpliendo las normas éticas que aseguren las condiciones necesarias para el bienestar animal. Para que la confianza del público se fortalezca, será imprescindible realizar una mejor difusión pública de los beneficios de obtener animales transgénicos, para el bienestar de la humanidad.

Existen una gran cantidad de cepas endogámicas para investigar prácticamente cualquier fenotipo de interés, y aprovechar esto requiere el uso eficiente de la información de estas cepas y el reconocimiento y mantenimiento de su diversidad.

12. REFERENCIAS

1. Aittomäki, S., & Pesu, M. (2014). Therapeutic targeting of the Jak/STAT pathway. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 114(1), 18–23.
2. Aluvihare, V. R., Kallikourdis, M., & Betz, A. G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature immunology*, 5(3), 266–271.
3. Angel Aldair Ocaña Soriano (2019). Análisis de células T reguladoras dependientes de STAT6 durante el cáncer de colon asociado a colitis. Tesina de Licenciatura. UNAM, Cd. Universitaria.
4. Arneth B. (2019). Tumor Microenvironment. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56(1), 15.
5. Axelrad, J. E., Lichtiger, S., & Yajnik, V. (2016). Inflammatory bowel disease and cancer: The role of inflammation, immunosuppression, and cancer treatment. *World journal of gastroenterology*, 22(20), 4794–4801.
6. Bayarsaihan D. (2011). Epigenetic mechanisms in inflammation. *Journal of dental research*, 90(1), 9–17.
7. Beck, J. A., Lloyd, S., Hafezparast, M., Lennon-Pierce, M., Eppig, J. T., Festing, M. F., & Fisher, E. M. (2000). Genealogies of mouse inbred strains. *Nature genetics*, 24(1), 23–25.
8. Becker C, Stoll S, Bopp T, Schmitt E, Jonuleit H. Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Med Microbiol Immunol*. 2006 Sep;195(3):113-24.
9. Ben-Neriah, Y., & Karin, M. (2011). Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nature immunology*, 12(8), 715–723.
10. Bollrath, J., Pheesse, T. J., von Burstin, V. A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, O., Schwitalla, S., Matthews, V., Schmid, R. M., Kirchner, T., Arkan, M. C., Ernst, M., & Greten, F. R. (2009). gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer cell*, 15(2), 91–102.
11. Bouabe, H., & Okkenhaug, K. (2013). Gene targeting in mice: a review. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1064, 315–336.
12. Bouabe, H., Liu, Y., Moser, M., Bösl, M. R., & Heesemann, J. (2011). Novel highly sensitive IL-10-beta-lactamase reporter mouse reveals cells of the

- innate immune system as a substantial source of IL-10 in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(6), 3165–3176.
13. Bousoik, E., & Montazeri Aliabadi, H. (2018). "Do We Know Jack" About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway. *Frontiers in oncology*, 8, 287.
 14. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394–424.
 15. Brooks, A. J., Dai, W., O'Mara, M. L., Abankwa, D., Chhabra, Y., Pelekanos, R. A., Gardon, O., Tunny, K. A., Blucher, K. M., Morton, C. J., Parker, M. W., Sierecki, E., Gambin, Y., Gomez, G. A., Alexandrov, K., Wilson, I. A., Doxastakis, M., Mark, A. E., & Waters, M. J. (2014). Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6185), 1249783.
 16. Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paepfer, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F., & Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics*, 27(1), 68–73.
 17. Chen, J., Gong, C., Mao, H., Li, Z., Fang, Z., Chen, Q., Lin, M., Jiang, X., Hu, Y., Wang, W., Zhang, X., Chen, X., & Li, H. (2018). E2F1/SP3/STAT6 axis is required for IL-4-induced epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. *International journal of oncology*, 53(2), 567–578.
 18. Chen, W., Daines, M. O., & Hershey, G. K. (2004). Methylation of STAT6 modulates STAT6 phosphorylation, nuclear translocation, and DNA-binding activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(11), 6744–6750.
 19. Chen, X., Vinkemeier, U., Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Darnell, J. E., Jr, & Kuriyan, J. (1998). Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell*, 93(5), 827–839.
 20. Chinen, T., Kannan, A. K., Levine, A. G., Fan, X., Klein, U., Zheng, Y., Gasteiger, G., Feng, Y., Fontenot, J. D., & Rudensky, A. Y. (2016). An essential role for the IL-2 receptor in T_{reg} cell function. *Nature immunology*, 17(11), 1322–1333.
 21. Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S., & Lukyanov, K. A. (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological reviews*, 90(3), 1103–1163.
 22. Collison, L. W., Pillai, M. R., Chaturvedi, V., & Vignali, D. A. (2009). Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(10), 6121–6128.

23. Conticello, C., Pedini, F., Zeuner, A., Patti, M., Zerilli, M., Stassi, G., Messina, A., Peschle, C., & De Maria, R. (2004). IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *172*(9), 5467–5477.
24. Cosín-Roger, J., Ortiz-Masiá, D., Calatayud, S., Hernández, C., Esplugues, J. V., & Barrachina, M. D. (2016). The activation of Wnt signaling by a STAT6-dependent macrophage phenotype promotes mucosal repair in murine IBD. *Mucosal immunology*, *9*(4), 986–998.
25. Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, *420*(6917), 860–867.
26. Crawley, J. N., Belknap, J. K., Collins, A., Crabbe, J. C., Frankel, W., Henderson, N., Hitzemann, R. J., Maxson, S. C., Miner, L. L., Silva, A. J., Wehner, J. M., Wynshaw-Boris, A., & Paylor, R. (1997). Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology*, *132*(2), 107–124.
27. Curotto de Lafaille, M. A., & Lafaille, J. J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?. *Immunity*, *30*(5), 626–635.
28. Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R. A., Mitsdoerffer, M., Strom, T. B., Elyaman, W., Ho, I. C., Khoury, S., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nature immunology*, *9*(12), 1347–1355.
29. Das, M., Zhu, C., & Kuchroo, V. K. (2017). Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunological reviews*, *276*(1), 97–111.
30. Das, S., Roth, C. P., Wasson, L. M., & Vishwanatha, J. K. (2007). Signal transducer and activator of transcription-6 (STAT6) is a constitutively expressed survival factor in human prostate cancer. *The Prostate*, *67*(14), 1550–1564.
31. De Oliveira, T., Ramakrishnan, M., Diamanti, M. A., Ziegler, P. K., Brombacher, F., & Greten, F. R. (2019). Loss of Stat6 affects chromatin condensation in intestinal epithelial cells causing diverse outcome in murine models of inflammation-associated and sporadic colon carcinogenesis. *Oncogene*, *38*(11), 1787–1801.
32. Delgado-Ramirez, Y., Colly, V., Gonzalez, G. V., & Leon-Cabrera, S. (2020). Signal transducer and activator of transcription 6 as a target in colon cancer therapy. *Oncology letters*, *20*(1), 455–464.
33. Dembic Z. (2008). Beginning of the end of (understanding) the immune response. *Scandinavian journal of immunology*, *68*(4), 381–382.
34. Di Stefano, A. B., Iovino, F., Lombardo, Y., Eterno, V., Höger, T., Dieli, F., Stassi, G., & Todaro, M. (2010). Survivin is regulated by interleukin-4 in colon cancer stem cells. *Journal of cellular physiology*, *225*(2), 555–561.

35. Dickensheets, H., Vazquez, N., Sheikh, F., Gingras, S., Murray, P. J., Ryan, J. J., & Donnelly, R. P. (2007). Suppressor of cytokine signaling-1 is an IL-4-inducible gene in macrophages and feedback inhibits IL-4 signaling. *Genes and immunity*, 8(1), 21–27.
36. Dorsey, N. J., Chapoval, S. P., Smith, E. P., Skupsky, J., Scott, D. W., & Keegan, A. D. (2013). STAT6 controls the number of regulatory T cells in vivo, thereby regulating allergic lung inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(4), 1517–1528.
37. Eming, S. A., Wynn, T. A., & Martin, P. (2017). Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6342), 1026–1030.
38. Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L., & Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature immunology*, 4(12), 1206–1212.
39. Farraye, F. A., Odze, R. D., Eaden, J., Itzkowitz, S. H., McCabe, R. P., Dassopoulos, T., Lewis, J. D., Ullman, T. A., James, T., 3rd, McLeod, R., Burgart, L. J., Allen, J., Brill, J. V., & AGA Institute Medical Position Panel on Diagnosis and Management of Colorectal Neoplasia in Inflammatory Bowel Disease (2010). AGA medical position statement on the diagnosis and management of colorectal neoplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 138(2), 738–745.
40. Fletcher, R., Wang, Y. J., Schoen, R. E., Finn, O. J., Yu, J., & Zhang, L. (2018). Colorectal cancer prevention: Immune modulation taking the stage. *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer*, 1869(2), 138–148.
41. Fontenot, J. D., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature immunology*, 4(4), 330–336.
42. Francescone, R., Hou, V., & Grivennikov, S. I. (2015). Cytokines, IBD, and colitis-associated cancer. *Inflammatory bowel diseases*, 21(2), 409–418.
43. Francipane, M. G., Alea, M. P., Lombardo, Y., Todaro, M., Medema, J. P., & Stassi, G. (2008). Crucial role of interleukin-4 in the survival of colon cancer stem cells. *Cancer research*, 68(11), 4022–4025.
44. Fu, C., Jiang, L., Hao, S., Liu, Z., Ding, S., Zhang, W., Yang, X., & Li, S. (2019). Activation of the IL-4/STAT6 Signaling Pathway Promotes Lung Cancer Progression by Increasing M2 Myeloid Cells. *Frontiers in immunology*, 10, 2638.
45. Georgiev, P., Charbonnier, L. M., & Chatila, T. A. (2019). Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3. *Journal of clinical immunology*, 39(7), 623–640.
46. Gershon, R. K., & Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 18(5), 723–737.

47. Globocan, (2018). Estimate cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. Retrieved Junio 03, 2020, from <https://gco.iarc.fr/> .
48. Goenka, S., & Kaplan, M. H. (2011). Transcriptional regulation by STAT6. *Immunologic research*, 50(1), 87–96.
49. Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G. Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L., & Karin, M. (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer cell*, 15(2), 103–113.
50. Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Tollefsen, B. L., Kemper, C., Atkinson, J. P., & Ley, T. J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, 104(9), 2840–2848.
51. Haribhai, D., Lin, W., Relland, L. M., Truong, N., Williams, C. B., & Chatila, T. A. (2007). Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(5), 2961–2972.
52. Hill, J. A., Feuerer, M., Tash, K., Haxhinasto, S., Perez, J., Melamed, R., Mathis, D., & Benoist, C. (2007). Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity*, 27(5), 786–800.
53. Hirakata, E., Tomita, N., Tamada, Y., Suguro, T., Nakajima, M., Kambe, Y., Yamada, K., Yamamoto, K., Kawakami, M., Otaka, A., Okumura, H., & Suzuki, S. (2016). Early tissue formation on whole-area osteochondral defect of rabbit patella by covering with fibroin sponge. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 104(7), 1474–1482.
54. Hsieh, C. S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J. D., & Rudensky, A. Y. (2006). An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nature immunology*, 7(4), 401–410.
55. Jayakumar, A., & Bothwell, A. (2017). Stat6 Promotes Intestinal Tumorigenesis in a Mouse Model of Adenomatous Polyposis by Expansion of MDSCs and Inhibition of Cytotoxic CD8 Response. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 19(8), 595–605.
56. Jess, T., Rungoe, C., & Peyrin-Biroulet, L. (2012). Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 10(6), 639–645.
57. Jiang, Y., & Yu, Y. (2017). Transgenic and gene knockout mice in gastric cancer research. *Oncotarget*, 8(2), 3696–3710.
58. Johns, L. E., & Houlston, R. S. (2001). A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *The American journal of gastroenterology*, 96(10), 2992–3003.

59. Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Hohenbeck, A. E., Lerman, M. A., Naji, A., & Caton, A. J. (2001). Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature immunology*, 2(4), 301–306.
60. Jose Carlos Blanco Camarillo (2016). Obtención de un ratón doble transgénico (Foxp3EGFP/IFN-gammaKO) para el estudio de las células T reguladoras durante la toxoplasmosis. Tesis de Licenciatura. UNAM, Cd. Universitaria.
61. Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T., & Grusby, M. J. (1996). Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, 4(3), 313–319.
62. Konopacki, C., Pritykin, Y., Rubtsov, Y., Leslie, C. S., & Rudensky, A. Y. (2019). Transcription factor Foxp1 regulates Foxp3 chromatin binding and coordinates regulatory T cell function. *Nature immunology*, 20(2), 232–242.
63. Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M. C., & von Boehmer, H. (2005). Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nature immunology*, 6(12), 1219–1227.
64. Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15065.
65. Kuperman, D. A., & Schleimer, R. P. (2008). Interleukin-4, interleukin-13, signal transducer and activator of transcription factor 6, and allergic asthma. *Current molecular medicine*, 8(5), 384–392.
66. Lakso, M., Pichel, J. G., Gorman, J. R., Sauer, B., Okamoto, Y., Lee, E., Alt, F. W., & Westphal, H. (1996). Efficient in vivo manipulation of mouse genomic sequences at the zygote stage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), 5860–5865.
67. Lasry, A., Zinger, A., & Ben-Neriah, Y. (2016). Inflammatory networks underlying colorectal cancer. *Nature immunology*, 17(3), 230–240.
68. Lefrançois, E., Ortiz-Muñoz, G., Caudrillier, A., Mallavia, B., Liu, F., Sayah, D. M., Thornton, E. E., Headley, M. B., David, T., Coughlin, S. R., Krummel, M. F., Leavitt, A. D., Passegué, E., & Looney, M. R. (2017). The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature*, 544(7648), 105–109.
69. Leon-Cabrera, S. A., Molina-Guzman, E., Delgado-Ramirez, Y. G., Vázquez-Sandoval, A., Ledesma-Soto, Y., Pérez-Plasencia, C. G., Chirino, Y. I., Delgado-Buenrostro, N. L., Rodríguez-Sosa, M., Vaca-Paniagua, F., Ávila-Moreno, F., Gutierrez-Cirlos, E. B., Arias-Romero, L. E., & Terrazas, L. I. (2017). Lack of STAT6 Attenuates Inflammation and Drives Protection against Early Steps of Colitis-Associated Colon Cancer. *Cancer immunology research*, 5(5), 385–396.
70. Li, B. H., Xu, S. B., Li, F., Zou, X. G., Saimaiti, A., Simayi, D., Wang, Y. H., Zhang, Y., Yuan, J., & Zhang, W. J. (2012). Stat6 activity-related Th2

- cytokine profile and tumor growth advantage of human colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Cellular signalling*, 24(3), 718–725.
71. Li, B. H., Yang, X. Z., Li, P. D., Yuan, Q., Liu, X. H., Yuan, J., & Zhang, W. J. (2008). IL-4/Stat6 activities correlate with apoptosis and metastasis in colon cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 369(2), 554–560.
 72. Li, Y., Deuring, J., Peppelenbosch, M. P., Kuipers, E. J., de Haar, C., & van der Woude, C. J. (2012). STAT1, STAT6 and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (cAMP) signaling drive SOCS3 expression in inactive ulcerative colitis. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 18(1), 1412–1419.
 73. Liang, B., Workman, C., Lee, J., Chew, C., Dale, B. M., Colonna, L., Flores, M., Li, N., Schweighoffer, E., Greenberg, S., Tybulewicz, V., Vignali, D., & Clynes, R. (2008). Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(9), 5916–5926.
 74. Lieberman J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature reviews. Immunology*, 3(5), 361–370.
 75. Lin, W., Haribhai, D., Relland, L. M., Truong, N., Carlson, M. R., Williams, C. B., & Chatila, T. A. (2007). Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nature immunology*, 8(4), 359–368.
 76. Lin, X., Chen, M., Liu, Y., Guo, Z., He, X., Brand, D., & Zheng, S. G. (2013). Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells. *International journal of clinical and experimental pathology*, 6(2), 116–123.
 77. Lin, Y., Li, B., Yang, X., Liu, T., Shi, T., Deng, B., Zhang, Y., Jia, L., Jiang, Z., & He, R. (2019). Non-hematopoietic STAT6 induces epithelial tight junction dysfunction and promotes intestinal inflammation and tumorigenesis. *Mucosal immunology*, 12(6), 1304–1315.
 78. Lu Y, Zhou J, Xu C, Lin H, Xiao J, Wang Z, Yang B. JAK/STAT and PI3K/AKT pathways form a mutual transactivation loop and afford resistance to oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2008;21(4):305-14.
 79. Ma, C., & Dong, X. (2011). Colorectal cancer-derived Foxp3(+) IL-17(+) T cells suppress tumour-specific CD8+ T cells. *Scandinavian journal of immunology*, 74(1), 47–51.
 80. Ma, Y., Chen, L., Xie, G., Zhou, Y., Yue, C., Yuan, X., Zheng, Y., Wang, W., Deng, L., & Shen, L. (2016). Elevated level of interleukin-35 in colorectal cancer induces conversion of T cells into iTr35 by activating STAT1/STAT3. *Oncotarget*, 7(45), 73003–73015
 81. Maier, E., Duschl, A., & Horejs-Hoeck, J. (2012). STAT6-dependent and -independent mechanisms in Th2 polarization. *European journal of immunology*, 42(11), 2827–2833.

82. Mantel, P. Y., Kuipers, H., Boyman, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Rückert, B., Karagiannidis, C., Lambrecht, B. N., Hendriks, R. W., Cramer, R., Akdis, C. A., Blaser, K., & Schmidt-Weber, C. B. (2007). GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS biology*, 5(12), e329.
83. Mariani, F., Sena, P., & Roncucci, L. (2014). Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. *World journal of gastroenterology*, 20(29), 9716–9731.
84. Miller R. L. (2011). Transgenic mice: beyond the knockout. *American journal of physiology. Renal physiology*, 300(2), F291–F300.
85. Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S., & Kishimoto, T. (1997). Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature*, 387(6636), 924–929.
86. Noble, A., Giorgini, A., & Leggat, J. A. (2006). Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. *Blood*, 107(11), 4475–4483.
87. Olguín, J. E., Medina-Andrade, I., Molina, E., Vázquez, A., Pacheco-Fernández, T., Saavedra, R., Pérez-Plasencia, C., Chirino, Y. I., Vaca-Paniagua, F., Arias-Romero, L. E., Gutierrez-Cirlos, E. B., León-Cabrera, S. A., Rodríguez-Sosa, M., & Terrazas, L. I. (2018). Early and Partial Reduction in CD4⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells during Colitis-Associated Colon Cancer Induces CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Activation Inhibiting Tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 9(2), 239–249.
88. Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T., & Sakaguchi, S. (2008). Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 10113–10118.
89. Ostrand-Rosenberg, S., Grusby, M. J., & Clements, V. K. (2000). Cutting edge: STAT6-deficient mice have enhanced tumor immunity to primary and metastatic mammary carcinoma. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(11), 6015–6019.
90. Ostroukhova, M., & Ray, A. (2005). CD25⁺ T cells and regulation of allergen-induced responses. *Current allergy and asthma reports*, 5(1), 35–41.
91. Park, H. J., Li, J., Hannah, R., Biddie, S., Leal-Cervantes, A. I., Kirschner, K., Flores Santa Cruz, D., Sexl, V., Göttgens, B., & Green, A. R. (2016). Cytokine-induced megakaryocytic differentiation is regulated by genome-wide loss of a uSTAT transcriptional program. *The EMBO journal*, 35(6), 580–594.
92. Pastille, E., Bardini, K., Fleissner, D., Adamczyk, A., Frede, A., Wadwa, M., von Smolinski, D., Kasper, S., Sparwasser, T., Gruber, A. D., Schuler, M., Sakaguchi, S., Roers, A., Müller, W., Hansen, W., Buer, J., & Westendorf, A.

- M. (2014). Transient ablation of regulatory T cells improves antitumor immunity in colitis-associated colon cancer. *Cancer research*, 74(16), 4258–4269.
93. Paul, W. E., & Zhu, J. (2010). How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?. *Nature reviews. Immunology*, 10(4), 225–235.
 94. Prendergast, F. G., & Mann, K. G. (1978). Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskålea*. *Biochemistry*, 17(17), 3448–3453.
 95. Rawlings, J. S., Rosler, K. M., & Harrison, D. A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of cell science*, 117(Pt 8), 1281–1283.
 96. Ren, X., Ye, F., Jiang, Z., Chu, Y., Xiong, S., & Wang, Y. (2007). Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell death and differentiation*, 14(12), 2076–2084.
 97. Rogler G. (2014). Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer letters*, 345(2), 235–241.
 98. Rudensky A. (2005). Foxp3 and dominant tolerance. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 360(1461), 1645–1646.
 99. Safinia, N., Scotta, C., Vaikunthanathan, T., Lechler, R. I., & Lombardi, G. (2015). Regulatory T Cells: Serious Contenders in the Promise for Immunological Tolerance in Transplantation. *Frontiers in immunology*, 6, 438.
 100. Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., & Masuda, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine*, 161(1), 72–87.
 101. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 155(3), 1151–1164.
 102. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T., & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133(5), 775–787.
 103. Salguero-Aranda, C., Sancho-Mensat, D., Canals-Lorente, B., Sultan, S., Reginald, A., & Chapman, L. (2019). STAT6 knockdown using multiple siRNA sequences inhibits proliferation and induces apoptosis of human colorectal and breast cancer cell lines. *PloS one*, 14(5), e0207558.
 104. Saveliev, A., & Tybulewicz, V. L. (2009). Lymphocyte signaling: beyond knockouts. *Nature immunology*, 10(4), 361–364.
 105. Shetty, G., Wu, Z., Lam, T., Phan, T. T., Orwig, K. E., & Meistrich, M. L. (2019). Effect of hormone modulations on donor-derived

- spermatogenesis or colonization after syngeneic and xenotransplantation in mice. *Andrology*, 7(2), 257–265.
106. Shevach E. M. (2006). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*, 25(2), 195–201.
 107. SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H., & SAIGA, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology*, 59, 223–239.
 108. Skinnider, B. F., Elia, A. J., Gascoyne, R. D., Patterson, B., Trumper, L., Kapp, U., & Mak, T. W. (2002). Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 99(2), 618–626.
 109. Slattery, M. L., Lundgreen, A., Kadlubar, S. A., Bondurant, K. L., & Wolff, R. K. (2013). JAK/STAT/SOCS-signaling pathway and colon and rectal cancer. *Molecular carcinogenesis*, 52(2), 155–166.
 110. Stagg, J., Divisekera, U., Duret, H., Sparwasser, T., Teng, M. W., Darcy, P. K., & Smyth, M. J. (2011). CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer research*, 71(8), 2892–2900.
 111. Takaki, H., Ichiyama, K., Koga, K., Chinen, T., Takaesu, G., Sugiyama, Y., Kato, S., Yoshimura, A., & Kobayashi, T. (2008). STAT6 Inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor. *The Journal of biological chemistry*, 283(22), 14955–14962.
 112. Todaro, M., Lombardo, Y., Francipane, M. G., Alea, M. P., Cammareri, P., Iovino, F., Di Stefano, A. B., Di Bernardo, C., Agrusa, A., Condorelli, G., Walczak, H., & Stassi, G. (2008). Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell death and differentiation*, 15(4), 762–772.
 113. Toscano, M. A., Bianco, G. A., Ilarregui, J. M., Croci, D. O., Correale, J., Hernandez, J. D., Zwirner, N. W., Poirier, F., Riley, E. M., Baum, L. G., & Rabinovich, G. A. (2007). Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nature immunology*, 8(8), 825–834.
 114. Tsien R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, 67, 509–544.
 115. Vasen, H. F., Tomlinson, I., & Castells, A. (2015). Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 12(2), 88–97.
 116. Viljoen J. G., H. L. Nel y J. R. Crowther. 2005. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. Springer Publishers, EE.UU.
 117. Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, 10(8), 789–799.

118. Volonté, A., Di Tomaso, T., Spinelli, M., Todaro, M., Sanvito, F., Albarello, L., Bissolati, M., Ghirardelli, L., Orsenigo, E., Ferrone, S., Doglioni, C., Stassi, G., Dellabona, P., Staudacher, C., Parmiani, G., & Maccalli, C. (2014). Cancer-initiating cells from colorectal cancer patients escape from T cell-mediated immunosurveillance in vitro through membrane-bound IL-4. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *192*(1), 523–532.
119. Wagner, M. A., & Siddiqui, M. A. (2012). The JAK-STAT pathway in hypertrophic stress signaling and genomic stress response. *JAK-STAT*, *1*(2), 131–141.
120. Walford, H. H., & Doherty, T. A. (2013). STAT6 and lung inflammation. *JAK-STAT*, *2*(4), e25301.
121. Wang, C. G., Ye, Y. J., Yuan, J., Liu, F. F., Zhang, H., & Wang, S. (2010). EZH2 and STAT6 expression profiles are correlated with colorectal cancer stage and prognosis. *World journal of gastroenterology*, *16*(19), 2421–2427.
122. Yan SJ, Lim SJ, Shi S, Dutta P, Li WX. Unphosphorylated STAT and heterochromatin protect genome stability. *FASEB J.* 2011 Jan;25(1):232-41.
123. Yang, J., Liao, X., Agarwal, M. K., Barnes, L., Auron, P. E., & Stark, G. R. (2007). Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes & development*, *21*(11), 1396–1408.
124. Yang, W. C., Hwang, Y. S., Chen, Y. Y., Liu, C. L., Shen, C. N., Hong, W. H., Lo, S. M., & Shen, C. R. (2017). Interleukin-4 Supports the Suppressive Immune Responses Elicited by Regulatory T Cells. *Frontiers in immunology*, *8*, 1508.
125. Yuan, Q., Li, P. D., Li, B. H., Yang, X. Z., Xu, S. B., Liu, X. H., Zhou, F. X., & Zhang, W. J. (2009). Differential IL-4/Stat6 activities correlate with differential expression of regulatory genes SOCS-1, SHP-1, and PP2A in colon cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*, *135*(1), 131–140.
126. Zhang, X., Izikson, L., Liu, L., & Weiner, H. L. (2001). Activation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells by oral antigen administration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *167*(8), 4245–4253.
127. Zhou, G., Noordam, L., Sprengers, D., Doukas, M., Boor, P., van Beek, A. A., Erkens, R., Mancham, S., Grünhagen, D., Menon, A. G., Lange, J. F., Burger, P., Brandt, A., Galjart, B., Verhoef, C., Kwekkeboom, J., & Bruno, M. J. (2018). Blockade of LAG3 enhances responses of tumor-infiltrating T cells in mismatch repair-proficient liver metastases of colorectal cancer. *Oncoimmunology*, *7*(7), e1448332.
128. Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L., & Paul, W. E. (2006). GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms:

induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell research*, 16(1), 3–10.