



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

Estudio de la inhibición de IL -17 durante
el cáncer de colon asociado a colitis
experimental en roedores deficientes en

STAT1

TESIS

Que para obtener el título de:

BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

Presenta:

ITZEL BALTAZAR PÉREZ

Director 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

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 el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Estudio de la inhibición de IL-17 durante el cáncer de colon asociado a colitis experimental en roedores deficientes en STAT1

Que presenta la pasante: **Itzel Baltazar Pérez**

Con número de cuenta: **313075386** para obtener el título de: **Licenciada 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 04 de octubre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	<u></u>
VOCAL	<u>Dr. Salvador Fonseca Coronado</u>	<u>_____</u>
SECRETARIO	<u>Dra. Sonia Andrea León Cabrera</u>	<u>_____</u>
1er. SUPLENTE	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	<u>_____</u>
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón</u>	<u>_____</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

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 el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Estudio de la inhibición de IL-17 durante el cáncer de colon asociado a colitis experimental en roedores deficientes en STAT1

Que presenta la pasante: **Itzel Baltazar Pérez**

Con número de cuenta: **313075386** para obtener el título de: **Licenciada 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 04 de octubre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
VOCAL	<u>Dr. Salvador Fonseca Coronado</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Sonia Andrea León Cabrera</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón</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

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 el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Estudio de la inhibición de IL-17 durante el cáncer de colon asociado a colitis experimental en roedores deficientes en STAT1

Que presenta la pasante: **Itzel Baltazar Pérez**

Con número de cuenta: **313075386** para obtener el título de: **Licenciada 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 04 de octubre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
VOCAL	<u>Dr. Salvador Fonseca Coronado</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Sonia Andrea León Cabrera</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón</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

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 el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Estudio de la inhibición de IL-17 durante el cáncer de colon asociado a colitis experimental en roedores deficientes en STAT1

Que presenta la pasante: **Itzel Baltazar Pérez**

Con número de cuenta: **313075386** para obtener el título de: **Licenciada 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 04 de octubre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo</u>	
VOCAL	<u>Dr. Salvador Fonseca Coronado</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Sonia Andrea León Cabrera</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón</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**

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 el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

Estudio de la inhibición de IL-17 durante el cáncer de colon asociado a colitis experimental en roedores deficientes en STAT1

Que presenta la pasante: **Itzel Baltazar Pérez**

Con número de cuenta: **313075386** para obtener el título de: **Licenciada 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 04 de octubre de 2021.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
SECRETARIO	Dra. Sonia Andrea León Cabrera	
1er. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
2do. SUPLENTE	M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón	

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

LMCF/javg

Índice

1. RESUMEN	8
2. ANTECEDENTES	9
2.1. Cáncer colorrectal.....	9
2.2. Enfermedades inflamatorias y el CCR: el papel de la inflamación en la promoción de tumores	13
2.3. Vía JAK/STAT1	15
2.4. STAT1 y Cáncer de colon	16
2.3. IL17 en la respuesta inmune del cáncer.....	19
2.4. IL17 induce una respuesta inflamatoria y cáncer	20
2.5. Células Supresoras mieloides en el cáncer	23
2.6. STAT1 e IL17.....	26
2.7. Inducción de Cáncer de Colon.....	27
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVO GENERAL	30
5.1. Objetivos específicos.....	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1. Material biológico	31
6.2. Genotipo	32
6.3. Inducción del cáncer colorectal	34
6.4. Inhibición de IL-17	34
6.5. Valoración de la progresión tumoral	35
6.6. Sacrificio.....	36
6.7. Análisis macroscópico.....	36

6.8. Análisis histológico	37
6.9. Inmunohistoquímica	38
6.10. Citometría de flujo.....	39
6.11. Análisis estadístico	40
7. RESULTADOS	41
7.1. Genotipo de STAT1	41
7.2. Síntomas de la enfermedad y análisis en el cambio de peso en los grupos STAT1 ^{-/-} y BALB/c durante CCR.....	42
7.3. Análisis del índice de daño de la enfermedad (DAI).....	43
7.4. Análisis de cambios morfométricos en el intestino	44
7.5. Análisis del número y tamaño de tumores en los diferentes grupos	47
7.6. La neutralización de IL-17 en las etapas tempranas del CAC disminuye la expresión de pSTAT3 en el intestino en deficiencia de STAT1	49
7.7. La neutralización de IL-17 en las etapas tempranas del CAC disminuye el reclutamiento de neutrófilos en el intestino en deficiencia de STAT1.....	52
7.8. La neutralización de IL-17 en ratones deficientes en STAT1 disminuye el reclutamiento de células CD11b+Ly6C ^{low} Ly6G+.....	55
8. DISCUSIÓN	59
9. CONCLUSIONES	64
10. LITERATURA CITADA	65
Anexo	71

Índice de figuras

Figura 1. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer.....	9
Figura 2. Incidencia de los principales tipos de cáncer en México.	10
Figura 3. Incidencia del CCR por genero	10
Figura 4. Esquema de la progresión del cáncer de colon tomado	14
Figura 5. La vía JAK / STAT..	16
Figura 6. Funciones antitumorales y pro tumorales de las células Th17.....	21
Figura 7. Papel de las MDSC en la patogenia de EII.	24
Figura 8. Esquema de administración de AOM/DSS	34
Figura 9. Gel de electroforesis para STAT1-/- y BALB/c	41
Figura 10. Cambios en el peso corporal expresado en porcentaje.....	42
Figura 11. Índice de daño de la enfermedad (DAI).....	43
Figura 12. Tamaño del colon de los diferentes grupos sometidos a tratamiento.....	45
Figura 13. Longitud del colon en los grupos con tratamiento al día 77	46
Figura 14. Análisis del número de tumores en los grupos con tratamiento al día 77.....	47
Figura 15. Análisis del tamaño de tumores en los grupos con tratamiento al día 77	48
Figura 16. Inmunohistoquímica de pSTAT3 en los grupos sometidos a CCR	50
Figura 17. Análisis de células pSTAT3+ en los grupos sometidos a CCR	51
Figura 18. Inmunohistoquímica de Ly6G en los grupos sometidos a CCR	53
Figura 19. Análisis de células Ly6G+ en los grupos en los grupos sometidos a CCR	54
Figura 20. Estrategia de análisis para CD11b+ y finalmente a los neutrófilos usando Ly6G/Ly6C en células de bazo.	56
Figura 21. Porcentaje de células CD11b+Ly6G+ al día 20 en células de bazo.....	57
Figura 22. Porcentaje de células CD11b+Ly6G+ al día 77 en células de bazo	58

Índice de tablas

Tabla 1. Distribución de los grupos experimentales.....	31
Tabla 2. Condiciones utilizadas en las etapas de PCR.	33
Tabla 3. Secuencias de los primers utilizados para genotipo STAT1.	33
Tabla 4. Puntuación del índice de daño de la enfermedad (DAI) para la colitis inducida por DSS.....	35
Tabla 5. Separación de grupos para la evaluación del desarrollo del cáncer en etapa temprana y tardía.	36
Tabla 6. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.....	40

Dedicatoria

A mis queridos padres, Ulises y Gloria que fueron mi mayor apoyo, porque este logro no es solo mío sino también de ustedes, quienes fueron mi principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, sentando en mí las bases de responsabilidad y deseos de superación, porque incluso cuando suelte su mano, nuestras huellas siempre estarán grabadas en nuestra mente, miro el presente y estoy cambiando, he crecido y ustedes han sido el impulso, así que vamos a reimaginar nuestro mundo y soñemos de nuevo.



Agradecimientos

A mis hermanos Cynthia, Diana y Brian, que a su manera me han demostrado su cariño y apoyo, volemós tan alto como soñamos, convirtamos los sueños que creímos espejismos en realidad, porque los sueños son los que dan color a la existencia.

A mis abuelos Candida y Eufemio, que a pesar de que la vida se lo haya llevado, continua aquí, en mi corazón, así que vamos a hacer cosas buenas y vivir feliz en esta vida, le aseguro que en mi corazón estará su nombre y lo nombrará, espero que mi voz llegue hasta usted sin importar lo lejos que este.

A mis amigas Karen, Nancy, Miriam y Janeth, con quien compartí un sueño, que logramos ante las miradas negativas, los malos recuerdos y las múltiples dificultades, sigan caminando conmigo.

A mis compañeros de laboratorio Yamileth, Yael, Eduardo y Catalina que con su energía influyen positivamente a la gente, que me guiaron y ayudaron a lo largo de este proyecto, juntos construimos diferentes versiones de la misma historia y me enseñaron que el trabajo en equipo hace que los sueños funcionen.

A mi directora de tesis la Doctora Sonia Andrea León, por haberme permitido integrarme a su grupo de investigación, trabajar con usted, guiarme y ayudarme a concluir con éxito, además de enseñarme que el punto de partida de todo logro, es el deseo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, FES Cuautitlán y todos los académicos, por la formación y guía académica brindada.

A mis asesores que brindaron su tiempo, consejos y experiencia en la revisión y mejora de esta tesis.

A la UBIMED por permitirme usar sus instalaciones y la incorporación a este equipo de investigación.

El presente trabajo fue apoyado por subvenciones del Programa de Apoyo a proyectos de Investigación Científica y Tecnológica PAPIIT. UNAM. Proyecto IN215421

CONACYT A1-S- 23944

1. RESUMEN

Está ampliamente aceptado que la inflamación crónica juega un papel importante en el desarrollo del cáncer. El transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT1) controla mecanismos como proliferación y apoptosis en el intestino durante el cáncer de colon asociado a colitis (CAC) y, los pacientes con cáncer de colon tienen una reducción en la expresión y la actividad de STAT1 en la mucosa del colon. En un modelo experimental de CAC, los animales deficientes en STAT1 (STAT1^{-/-}) son más susceptibles al desarrollo de la enfermedad, presentando una menor supervivencia, un mayor daño histológico y una aparición temprana del crecimiento tumoral. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales STAT1 modula la respuesta inmune evitando la tumorigénesis no se conocen con claridad. El objetivo de este proyecto fue evaluar el efecto de la inhibición de IL-17 durante la deficiencia de STAT1 y analizar las repercusiones en el reclutamiento de células mieloides durante el transcurso del CAC experimental. Para ello, ratones silvestres (WT) y STAT1^{-/-} fueron sometidos a un régimen de AOM/DSS para inducir el CAC. La citocina IL-17 se neutralizó en las primeras etapas tempranas del desarrollo del cáncer; posteriormente, se evaluó la progresión tumoral por 77 días y se analizaron los cambios en el reclutamiento de las células supresoras mieloides (MDSCs) a nivel local y sistémico por citometría de flujo e inmunohistoquímica. Se determinó que la neutralización de IL-17 disminuyó significativamente la frecuencia de las células granulocíticas circulantes y de neutrófilos en el intestino en los ratones STAT1^{-/-}, lo que se relacionó con un menor desarrollo tumoral. Adicionalmente, la expresión de pSTAT3 después del bloqueo con anti-IL-17, se redujo significativamente en el colon de ratones STAT1^{-/-} CAC en comparación con ratones WT CAC. Estos resultados sugieren que en ausencia de STAT1, la IL-17 promueve el crecimiento tumoral a través de un mayor reclutamiento de células granulocíticas y neutrófilos y una mayor activación de la vía de señalización STAT3, por lo que tras la neutralización de IL-17 se previene el avance del tumor.

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es una afección global que ocupa el tercer lugar en incidencia mundial con un 10% y el segundo en mortalidad con un 9.4% en ambos sexos (Figura 1). El cáncer colorrectal ocupa el tercer lugar de incidencia en México con un 10% (Figuras 2 y 3) (1). El CCR es uno de los tipos de cáncer más comunes en el mundo. Varios factores contribuyen al desarrollo de este cáncer como la edad, enfermedades inflamatorias del intestino y diabetes tipo 2. Algunos factores relacionados con el estilo de vida, como la obesidad, la dieta, el consumo excesivo de alcohol, el tabaquismo y la falta de ejercicio también se han atribuido al aumento del riesgo de CCR (2).

En el mundo, el número de casos nuevos de cáncer se prevé que aumente cerca de 23,6 millones para 2030. Las estimaciones mundiales predicen que las tasas de incidencia del CCR y el número total de muertes relacionadas con el CCR aumentarán en un 77% y un 80%, respectivamente para dicho año y llegará a ser la neoplasia más frecuente en el siglo XXI, constituyendo un problema sanitario de gran magnitud, debido a su elevada morbilidad y mortalidad (3).

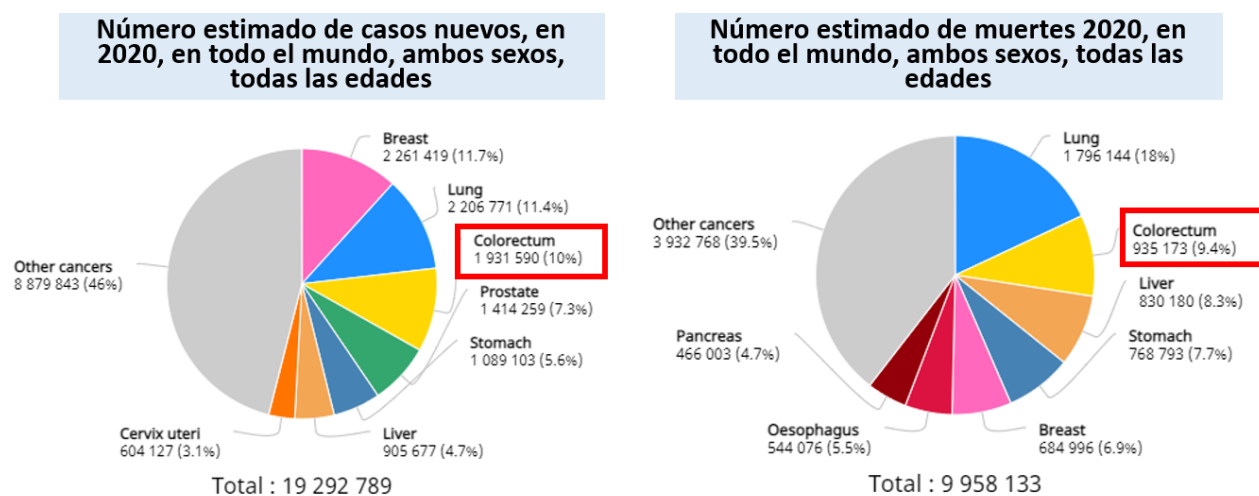


Figura 1. Incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer; el cáncer colorrectal tiene una incidencia de 10% de 19.3 millones de casos y corresponde al 9.4% de 9.9 millones de muertes por cáncer (GLOBOCAN 2020).

Número estimado de casos nuevos en 2020, en todo el mundo, México, ambos sexos, todas las edades

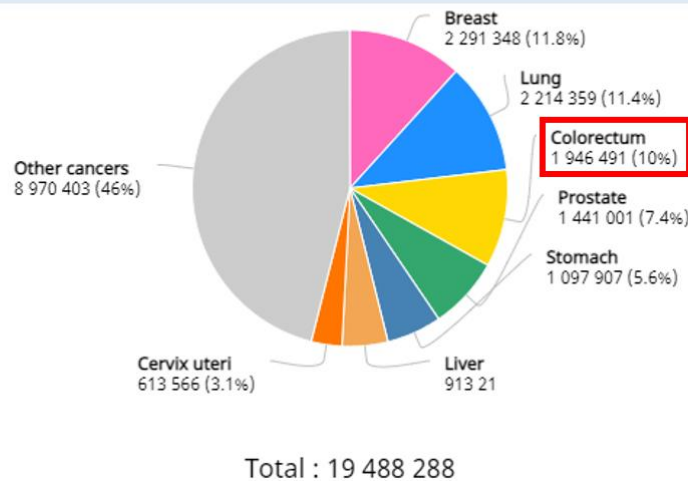
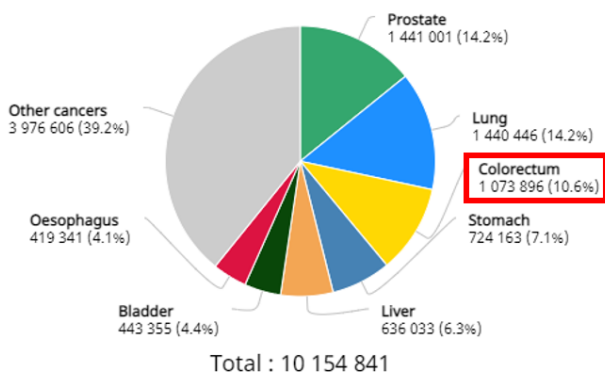


Figura 2. Incidencia de los principales tipos de cáncer; el cáncer colorrectal tiene una incidencia de 10% de 19.5 mil casos en México, siendo este el tercer tipo de cáncer más frecuente en México (GLOBOCAN 2020).

Números estimado de caso nuevos en 2020, en todo el mundo, México, hombres, todas las edades



Números estimado de caso nuevos en 2020, en todo el mundo, México, mujeres, todas las edades

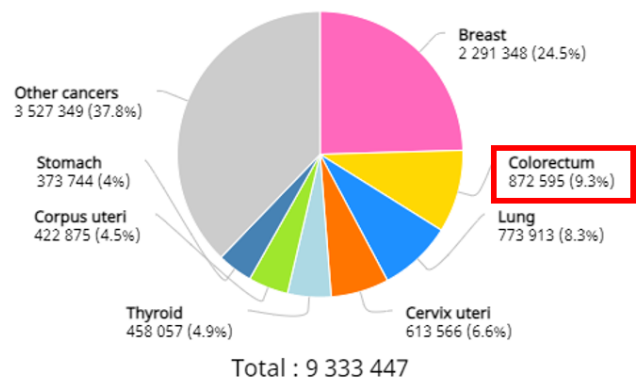


Figura 3. El cáncer colorrectal tiene una incidencia de 10.6% de casos en pacientes masculinos siendo este el tercer cáncer más frecuente en hombres y el segundo más frecuente en mujeres con una incidencia 9,3% en México (GLOBOCAN 2020).

El desarrollo del CCR es multifactorial, y los factores de riesgo incluyen el estilo de vida, factores genéticos y ambientales, se ha estimado que al menos la mitad de los casos de CCR podrían prevenirse mediante una reducción de los factores de riesgo modificables conocidos relacionados con el estilo de vida (4).

Las mutaciones en genes específicos pueden provocar la aparición de cáncer colorrectal, dependiendo del origen de la mutación, los carcinomas colorrectales se pueden clasificar en esporádicos, hereditarios y familiares.

Los cánceres derivados de mutaciones puntuales se denominan cánceres esporádicos y representan el 70% de todos los CCR y no se asocian con síndromes heredados y solo afectan a las células individuales y sus descendientes, es heterogéneo, ya que las mutaciones pueden dirigirse a diferentes genes. La primera mutación que ocurre en la poliposis coli adenomatosa (APC), un gen supresor de tumores que desencadena la formación de adenomas no malignos, también llamados pólipos y se espera que aproximadamente el 15% de esos adenomas pasen al estado de carcinoma en un período de diez años (5).

Los cánceres hereditarios representan el 5% en los casos de CCR y son causados por mutaciones hereditarias que afectan a uno de los alelos del gen mutado, lo que significa que una mutación puntual en el otro alelo desencadenará la aparición de la célula tumoral y, posteriormente, el carcinoma. Se han establecido dos grupos, la variante de poliposis involucra la poliposis adenomatosa familiar (PAF), caracterizada por la formación de múltiples pólipos potencialmente malignos en el colon. Por el contrario, el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC) cuya causa principal es el síndrome de Lynch, causado por mutaciones hereditarias en uno de los alelos que codifican proteínas reparadoras del ADN.

El cáncer colorrectal familiar representa el 25% de los casos de CCR y es causado por mutaciones hereditarias, aunque no se clasifican como cánceres hereditarios, ya que no pueden incluirse en ninguna variante de cáncer hereditaria (5).

Alrededor del 20% de los casos de CCR pueden atribuirse genéticamente a antecedentes familiares. El cáncer asociado a colitis (CAC) es el tipo de cáncer de colon que está precedido por una enfermedad inflamatoria intestinal (EII) clínicamente detectable, como la enfermedad de Crohn (EC) o la colitis ulcerosa (CU).

Otras asociaciones con el cáncer colorrectal incluyen la etnia afroamericana, el sexo masculino, la enfermedad inflamatoria intestinal: colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, obesidad, estilo de vida sedentario, consumo de carnes rojas y carne procesada, tabaco,

alcohol, antecedentes de radiación abdominal, trasplante renal con uso de medicamentos inmunosupresores, diabetes mellitus y resistencia a la insulina, etc. (6).

Los factores de edad, genéticos y ambientales juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer colorrectal. Los síndromes de cáncer colorrectal hereditario incluyen el síndrome de Lynch (cáncer colorrectal hereditario sin poliposis), poliposis adenomatosa familiar (FAP), poliposis asociada a MUTYH (MAP). El síndrome de Lynch y la poliposis adenomatosa familiar contribuyen a la gran mayoría del síndrome de cáncer colorrectal hereditario.

Los factores de protección que se han asociado con una disminución en la incidencia de CCR incluyen actividad física regular, dieta rica en frutas y verduras, dieta alta en fibra, dieta rica en folato, calcio, productos lácteos, vitamina D, vitamina B6, ingesta de magnesio, consumo de pescado , ajo, uso regular de aspirina, antiinflamatorios no esteroideos (AINE). (6).

2.2. Enfermedades inflamatorias y CCR: el papel de la inflamación en la promoción de tumores

Las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD) tales como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de colon asociado a colitis (CAC) y la respuesta inflamatoria juega un papel importante en la tumorigénesis (7). En general, se acepta que la mayoría de los tumores sólidos, incluido el CCR, están relacionados con la inflamación crónica.

La enfermedad inflamatoria intestinal es un factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer de colon. Se caracteriza por una inflamación de la mucosa intestinal que conduce a la destrucción de la lámina propia, con complicaciones como perforaciones y fístulas. También es probable que la inflamación esté relacionada con otras formas de cáncer de colon esporádico y hereditario (8). El cáncer asociado a colitis (CAC) es difícil de tratar y tiene una alta mortalidad, Más del 20% de los pacientes con IBD desarrollan CAC dentro de los 30 años posteriores al inicio de la enfermedad, y > 50% de estos morirán por CAC. Incluso los tumores colorrectales que no están asociados con IBD clínicamente detectable muestran una fuerte infiltración inflamatoria y una mayor expresión de citocinas proinflamatorias (8).

La progresión del CCR es un proceso que involucra interacciones entre el tumor y la inmunidad celular del huésped en el microambiente tumoral (2). La inflamación crónica, que conduce a CAC, se caracteriza por la producción de citocinas proinflamatorias que pueden inducir mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores (APC, p53, K-ras) e inestabilidad genómica a través de varios mecanismos (8).

La inflamación persistente facilita la promoción de tumores al activar la proliferación y las propiedades antiapoptóticas de las células premalignas, así como la progresión y metástasis del tumor (8). Las células inmunitarias innatas y adaptativas también promueven el desarrollo de tumores.

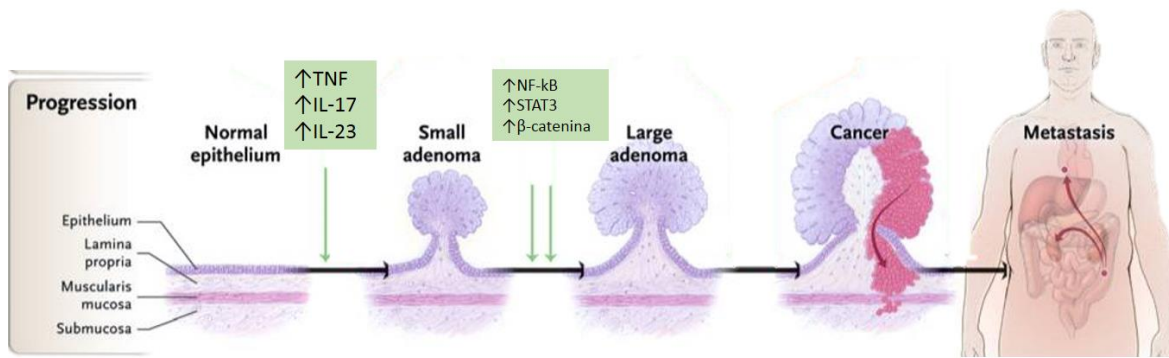


Figura 4. Esquema de la progresión del cáncer de colon tomado y modificado de Markowitz y Bertagnalli, 2009.

Las células del sistema inmunitario adaptativo se reclutan en tumores colorrectales y asociados a colitis, donde tienen funciones pro o antitumogénicas. Las células T, por ejemplo, son necesarias para la inflamación, el desarrollo del cáncer y la progresión del tumor, así como para la inmunidad contra el cáncer. Las células del sistema inmunológico innato, como los neutrófilos, los mastocitos, las células asesinas naturales (NK), las células dendríticas (DC) y los macrófagos asociados a tumores, pueden detectarse fácilmente en estos tumores (8).

Otros factores en el intestino, como la microbiota intestinal y los compuestos dietéticos, pueden influir en el desarrollo del cáncer de colon, en particular por su capacidad para regular las redes de señalización proinflamatorias. La microbiota intestinal tiene importantes funciones homeostáticas inmunes y metabólicas, afecta la proliferación y supervivencia de las células epiteliales y proporciona protección contra patógenos. También se requieren bacterias gastrointestinales para desencadenar la producción de IL-10 (tolerogénica) e IL-17 (proinflamatoria), que podrían promover el desarrollo de CCR esporádico o especialmente de CCR.

Dado que la promoción de tumores en humanos lleva mucho tiempo (a veces, décadas) y precede a la progresión y diseminación del tumor, atacar la inflamación en la etapa de promoción del tumor creará una ventana preventiva y terapéutica única para extender la línea de tiempo cuando se puede detectar y extirpar un tumor antes de que se propague (8).

2.3. Vía JAK/STAT1

Los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) son una familia de proteínas nombradas por su doble función de transducir señales de citocinas y promover la transcripción de genes específicos. Hay siete STAT en mamíferos (STAT1-4, STAT5a, STAT5b y STAT6) y cada uno contiene varias características conservadas; una región N-terminal seguida de un dominio en espiral, un dominio de unión al ADN, una región enlazadora, un dominio SH2 y un dominio de transactivación C-terminal. Situado entre el dominio SH2 y el dominio de transactivación hay un único residuo de tirosina conservado que es el sitio en el que las proteínas STAT son fosforiladas por las JAK y es esencial para su activación (10).

Una vez la citocina se une a su receptor específico en la superficie de su célula diana los dominios intracelulares que están constitutivamente asociados con miembros de la familia de proteínas-cinasas Janus (JAK) se fosforilan (10).

Las proteínas JAK están inactivas antes de la exposición a las citocinas, sin embargo, la unión de las citocinas a su receptor induce su autoactivación por transfosforilación, las JAK activadas fosforilan las tirosinas en los dominios intracelulares del receptor reclutando a STAT (10). Las STAT forman dímeros que se traslocan al núcleo en donde se unen a elementos de respuesta específicos donde impulsan la expresión de genes que responden a citocinas a menudo conduciendo a la proliferación y / o diferenciación.

Las proteínas SOCS son objetivos directos de STAT y actúan como inhibidores de retroalimentación negativa para desactivar la cascada de señalización (10).

2.4. STAT1 y Cáncer de colon

El primer miembro de la familia STAT, STAT1, es un componente de la señalización del interferón (IFN), que interviene en varias funciones celulares en respuesta a la estimulación de citocinas, factores de crecimiento y hormonas. El papel y la importancia de STAT1 en la biología del cáncer se han estudiado y la mayoría de las evidencias muestran que la activación de STAT1 desempeña un papel supresor de tumores en las células cancerosas. En algunos fenotipos malignos, STAT1 puede funcionar como oncoproteína o como supresor de tumores (11).

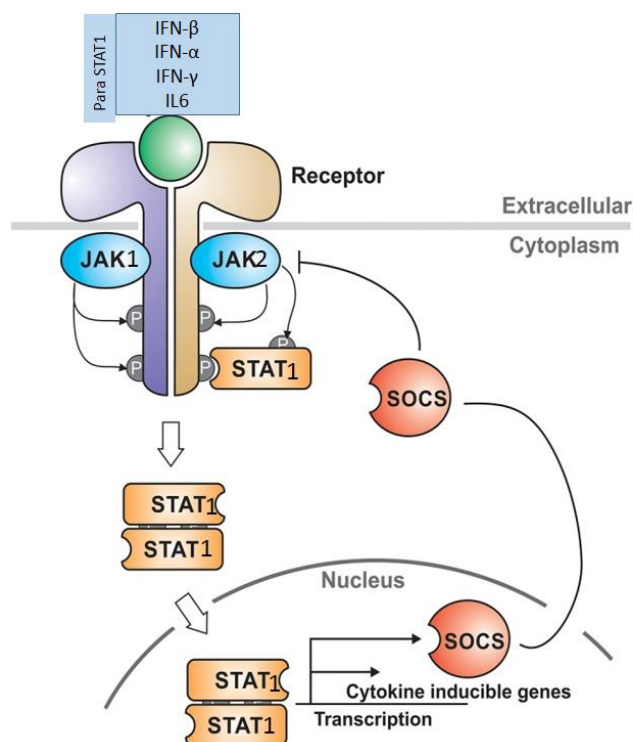


Figura 5. La vía JAK / STAT. Esquema de la cascada de señalización inducida por citocinas que señalizan a través de la vía JAK / STAT para STAT1, tomada y modificada de Morris, 2018.

STAT1 se activa por varios ligandos como interferón alfa (IFN α), interferón gamma (IFN γ), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), interleucina 6 (IL-6) o IL-27 que activan la expresión de varios genes relacionados con la apoptosis, inflamación, ciclo celular y angiogénesis (12).

STAT1 realiza varias funciones biológicas importantes en las células normales, como la promoción de la muerte celular, la inhibición del crecimiento celular, la estimulación del sistema inmunológico y la regulación de la diferenciación celular (11).

El primer paciente con mutación confirmada en la vía JAK / STAT se informó en 2003 (13), se sabe que la pérdida de activación y / o expresión de STAT1 ocurre en células malignas derivadas de varios tipos histológicos de tumores, en los pacientes con cáncer con una expresión alta de STAT1 tienden a tener un mejor resultado clínico que aquellos con una expresión baja o negativa de STAT1, estas observaciones se correlacionaron fuertemente con la teoría actual de que STAT1 representa un supresor de tumores importante (11).

En pacientes que padecen enfermedades inflamatorias del intestino se encontró regulado positivamente en la mucosa del colon (14). STAT1 inhibe la proliferación y promueve la apoptosis de las células tumorales (15).

En los tumores, la activación de STAT1 por IFNs afecta a la expresión de genes relacionados con funciones antiproliferativos y apoptóticos tales como la regulación por disminución de c-myc, inducción de caspasas y la muerte superficie ligandos tales como TRAIL. Además, se ha demostrado que STAT1 es importante para la inmunovigilancia al mejorar la expresión de MHCII que se requiere para la presentación eficaz del antígeno a los linfocitos citolíticos (12).

STAT1 regula la muerte celular a través de mecanismos dependientes e independientes de la transcripción, STAT1 regula la expresión de varios genes, como las caspasas y BCL2, además de interactuar con otras proteínas, como p53 y TRADD, además promueve la muerte celular en varios tipos de células cancerosas. STAT1 puede aumentar la expresión de varios genes proapoptosis. Por ejemplo, el IFN- γ induce las caspasas 1 y 8 de una manera dependiente de STAT1 para la leucemia de células T y el carcinoma de células epiteliales. Además, STAT1 también puede regular genes pro supervivencia y pro apoptosis, incluidos NO, BCL-2 y BCL-X_L en carcinoma pancreático y melanoma (11).

La pérdida de STAT1 en las células cancerosas a menudo se correlaciona con un mal pronóstico en los pacientes con cáncer. Hay al menos cuatro mecanismos que contribuyen a

esta característica: 1) degradación de proteínas, 2) metilación del promotor, 3) activación aberrante del regulador negativo STAT1 y 4) activación constitutiva de STAT3 (11).

Se ha pensado que el control del crecimiento tumoral por STAT1 está principalmente relacionado con la capacidad de inducir apoptosis y proporcionar inmunovigilancia de tumores. STAT1 puede reprimir el crecimiento tumoral al limitar la acumulación de MDSC y la expresión de genes proangiogénicos como la arginasa1, Cxcl1 y Mmp9 (12). Los estudios murinos han demostrado que STAT1 promueve la colitis. La colitis inducida por DSS se redujo en ratones knockout STAT1 (14).

La deficiencia de STAT1 promueve la diferenciación de Th17 *in vitro*. Es de destacar que la metástasis incontrolada encontrada en ratones STAT1 -/- se puede restaurar a niveles basales tras el bloqueo de IL-17, lo que sugiere una regulación negativa de STAT1 en genes inducidos por IL-17 implicados en la metástasis tumoral (12).

2.3. IL17 en la respuesta inmune del cáncer

La IL-17 es una citocina inflamatoria producida por una amplia variedad de leucocitos incluidos las células T, las células asesinas naturales (células NK), eosinófilos, macrófagos células dendríticas y neutrófilos (2). Entre estas células, se informa que la IL-17 es producida predominantemente por células T CD4 + activadas (células Th17). Una gran cantidad de evidencia sugiere que la IL-17 es una citocina proinflamatoria esencial debido a que induce la secreción de citocinas y quimiocinas por distintos tipos de células, como las células mesenquimales y las células mieloides, que reclutan monocitos y neutrófilos en el sitio de inflamación (16).

Además de las células Th17, la secreción de la

IL-17 también puede ser inducida por IL-6, IL-1 β , TGF- β e IL-23 en otras células T como las células T CD8 + (células Tc17), células T reguladoras (Células Treg17), células T gamma delta (células T17 $\gamma\delta$) y células T asesinas naturales invariantes (células iNKT). Además, se ha informado que las células de Paneth intestinales son capaces de producir IL-17.

Se han demostrado que la IL-17 tiene un papel pro tumor o antitumoral en diferentes modelos de cáncer. Además, muchas pruebas han demostrado que la IL-17 causa notablemente el crecimiento tumoral y la angiogénesis, lo que indica que la IL-17 desempeña un papel en la promoción de tumores (17). Su expresión está elevada en varios tumores humanos, como el cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer de mama, carcinoma hepatocelular, cáncer de esófago, cáncer gástrico y CCR. Sin embargo, en el CCR, la mayoría de los estudios consideran que la IL-17 actúa como promotor en la iniciación y progresión tumoral (16). Además, IL-17 induce la producción de IL-6, que a su vez activa Stat3 y promueve la supervivencia de las células cancerosas.

La familia de citocinas IL-17 consta de seis proteínas homólogas (desde IL-17A a IL-17F). La deficiencia de IL17 produce una reducción en el control de ciertas infecciones extracelulares y fúngicas, su sobreproducción puede constituir la base patogénica de varias enfermedades mediadas por el sistema inmune (18).

2.4. LA IL17 induce una respuesta inflamatoria y cáncer

La actividad crónica de la IL-17 conduce a un microambiente protumoral, este efecto depende de su capacidad para inducir la producción de mediadores inflamatorios, movilizand o células mieloides y remodelar el fenotipo de las células estromales (19).

Se ha comprobado que el intestino de los pacientes afectados por la IBD contiene una elevada infiltración de linfocitos Th17 que producen grandes cantidades de IL-17A e IL-17F, así como de otras citocinas como la IL-21, IL-22, IL-23 e IL-26, las cuales generan y amplifican el proceso inflamatorio promocionando la respuesta de las células Th1 y Th17. La IL-17A puede actuar de forma conjunta con otras citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), IL-1b, IL-22, interferón gamma (IFN- γ) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), conduciendo a la producción de mediadores inflamatorios como la IL-6 e IL-8 (18).

La IL-17A se incrementó considerablemente a lo largo de la secuencia adenoma-carcinoma, el nivel de IL-17A se asoció con la progresión de la displasia de grado bajo a grado alto en el adenoma. Curiosamente, se ha encontrado que el aumento de la expresión de IL-17A está asociado con los resultados clínicos en los CCR esporádicos; los pacientes con CCR con un nivel elevado de IL-17A pueden tener un pronóstico precario. Además, varios estudios han revelado que IL-17A puede promover la formación de tumores colorrectales, a través de una mayor angiogénesis y el efecto sobre la célula iniciadora del tumor mientras que la interrupción de la señal de IL-17A puede suprimir el desarrollo de CCR en ratones.

Se ha demostrado que la IL-6 es un potente factor pro-tumor y es esencial para el crecimiento, expansión y metástasis del CCR humano. Por tanto, el aumento de IL-6 en los tejidos adyacentes no tumorales no solo pueden estimular la diferenciación de células hacia Th17 y producción de IL-17A, y también puede inhibir la hospedar inmunidad antitumoral y promover la expansión y metástasis (20).

La IL-17 también es importante para el reclutamiento de MDSC. Estas pueden inhibir la activación de células T específica y no específica de antígeno, utilizando varios mecanismos para inhibir la inmunidad antitumoral, como el aumento del nivel de óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS) y arginasa1 (Arg1). Además, la IL-17 estimula la producción de prostaglandina E2 (PGE2), que participa en la migración de las células CRC.

IL-17 también puede promover la angiogénesis al aumentar la producción de VEGF, Por tanto, IL-17 puede contribuir a la metástasis del CCR al inducir angiogénesis (2).

Las células TH17 poseen doble función, funciones antitumorales al inducir el reclutamiento de otras células inmunitarias, incluidas los linfocitos T citotóxicos (CTL), las células NK y los neutrófilos y funciones pro-tumorales al aumentar la infiltración de Treg en el tejido tumoral y promover la diferenciación de macrófagos M2 que pueden ayudar al crecimiento del tumor, aumentando la proliferación de células tumorales y la metástasis (21).

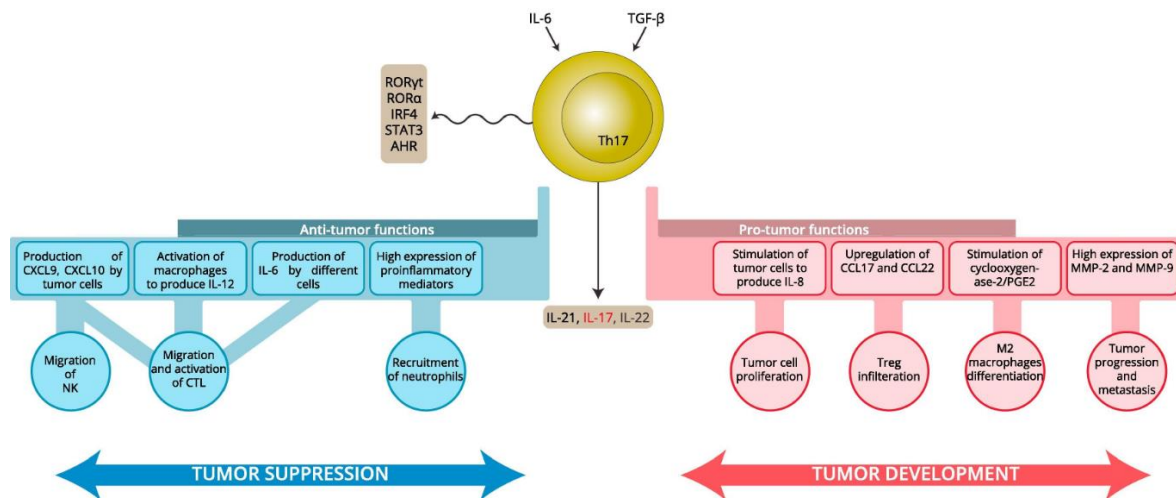


Figura 6. Funciones antitumorales y pro tumorales de las células Th17. Obtenido de Asadzadeh, 2017.

Dado el papel que desempeñan los linfocitos Th17 y la IL-17 en la EII, se han propuesto varias estrategias de tratamiento. Unas van encaminadas a bloquear la diferenciación y amplificación de las células Th17, como por ejemplo, mediante el bloqueo de citocinas implicadas en el proceso, como la IL-21 o la IL-23, o incluso bloqueando el receptor de la IL-21. Otra estrategia implica la inhibición de factores de transcripción específicos de los linfocitos Th17, como STAT3, o incluso la reducción de respuestas tanto de las células Th1 como de Th17, incrementando las de iTreg. Finalmente, una tercera estrategia consiste en la inhibición de las citocinas expresadas por los linfocitos Th17, como la IL-17A y la IL-17F (18). En humanos, se ha demostrado que el bloqueo de la actividad de IL-17 exacerba la actividad de la enfermedad en pacientes con enfermedad de Crohn (19).

La IL-17A se asocia con la iniciación tumoral en la carcinogénesis asociada a colitis, se demostró el papel de la IL-17A como factor estimulante de tumores intestinales. Si se bloquea

la señalización de IL-17A induce un cambio significativo en el entorno de la inflamación y los tumores relacionados con IL-17A y las citocinas proinflamatorias que se originan en el sistema inmunitario innato, tales como IL-6, IFN- γ y TNF- α , disminuyen con la inhibición de IL-17A. De hecho, se ha confirmado a través de muchos estudios que el número de células Th17 residentes que producen IL-17A es mayor en los tejidos tumorales que en los tejidos periféricos (22).

La inhibición selectiva de IL-17A en un modelo de ratón de CAC inhibe la inflamación intestinal y el desarrollo de tumores. El mecanismo detrás de este proceso es una disminución de la inflamación a través del bloqueo de IL-17A, que finalmente conduce a la inhibición del inicio del desarrollo del tumor. Por tanto, los inhibidores de molécula pequeña de IL-17A pueden ser excelentes candidatos para el tratamiento y la prevención del cáncer de colon (22).

La IL-17A se ha demostrado recientemente como una importante citocina pro-tumorigénica en varios modelos de CAC, incluido el modelo AOM + DSS. Aunque tanto la IL-17A como la IL-17F son necesarias para la tumorigénesis espontánea del CRC, en la colitis inducida químicamente y en la tumorigénesis del CAC desempeñan papeles bastante opuestos. Los ratones con deficiencia de IL-17A desarrollan menos tumores CAC de menor tamaño, lo que subraya el papel de IL-17A en la regulación de la inflamación intestinal y el crecimiento tumoral (23).

En las respuestas proinflamatorias, IL-17 juega un papel importante en la activación y reclutamiento de neutrófilos. Además, el número de neutrófilos que se infiltran en el tumor se correlaciona con la expresión de IL-17 en el CCR (2). Los neutrófilos que se infiltran en el tumor liberan mieloperoxidasa e hidróperóxido que tienen actividad antitumoral. Otro estudio representó que la expresión de IL-17 no es correlacionado directamente con el reclutamiento de neutrófilos, pero puede inducir la expresión de algunos mediadores proinflamatorios, como la liberación de quimiocinas CXC de las células estromales, lo que da como resultado el reclutamiento de neutrófilos (2).

2.5. Células Supresoras mieloides en el cáncer

A pesar de la gran cantidad de información que implica la inflamación en el desarrollo de tumores, el papel específico de las células mieloides, en este proceso sigue siendo poco claro. Las células mieloides son un componente importante de la inflamación. En la actualidad existe una amplia evidencia de anomalías en el compartimento mieloides en el cáncer (24).

Las células supresoras mieloides (MDSCs) se acumulan progresivamente en los tumores donde establecen un microambiente inflamatorio que es favorable para el crecimiento y la diseminación del tumor. Estas células se componen principalmente de células supresoras derivadas de mieloides monocíticas (M-MDSC) y granulocíticas (PMN-MDSC). Las MDSC son precursores de macrófagos, granulocitos, células dendríticas (DC) y células mieloides en las primeras etapas de diferenciación (25). Las MDSCs y macrófagos asociados a tumores (TAM) promueven la progresión tumoral al estimular la inmunosupresión, angiogénesis, la metástasis y la resistencia a la terapia contra el cáncer (26).

Las células mieloides son un componente importante de la inflamación. Las MDSC se acumulan en la sangre, el bazo, los ganglios linfáticos, la médula ósea y los tumores de los pacientes y animales portadores de tumores.

En ratones, las MDSC se caracterizan uniformemente por la expresión de Gr1 y CD11b que incluye el reconocimiento de subconjuntos polimorfonucleares (PMN-MDSC) y mononucleares (M-MDSC) basados en la expresión de marcadores Ly6C y Ly6G (23) de macrófagos y neutrófilos, respectivamente, mientras que CD11b (también conocido como integrina α M) es característico del linaje de células mieloides (26).

MDSC consta de dos subconjuntos principales de Ly6G⁺ Ly6C^{low} granulocítica (PMN-MDSC) y Ly6G⁻ Ly6C^{high} células monocíticas (M-MDSC). Las MDSC granulocíticas tienen un mayor nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un nivel indetectable de óxido nítrico (NO), mientras que las MDSC monocíticas tienen un nivel elevado de NO pero niveles indetectables de ROS (25).

Las células tumorales malignas expresan quimioatrayentes de células mieloides, las células inmunes que se infiltran en el tumor también expresan una variedad de factores quimiotácticos, que pueden fomentar aún más el reclutamiento y la acumulación de células mieloides en el microambiente tumoral (25). El desarrollo de CAC se regula a través de

células inflamatorias, y varias citocinas secretadas por las células inflamatorias promueven la supervivencia y proliferación de las células tumorales.

Está ampliamente aceptado que el nivel de MDSC circulantes aumenta en la etapa tardía del cáncer, lo que se correlaciona con la progresión de la enfermedad y la formación de metástasis, la función supresora de las MDSC en el CCR se asocia principalmente con su capacidad para inhibir la proliferación de células T y estimular el desarrollo de Treg.

Además las MDSC en la inmunosupresión pueden estimular directamente el crecimiento del tumor y las metástasis, induciendo, en cooperación con VEGF, angiogénesis, pueden regular negativamente la respuesta inmune innata afectando la actividad de las células NK (27).

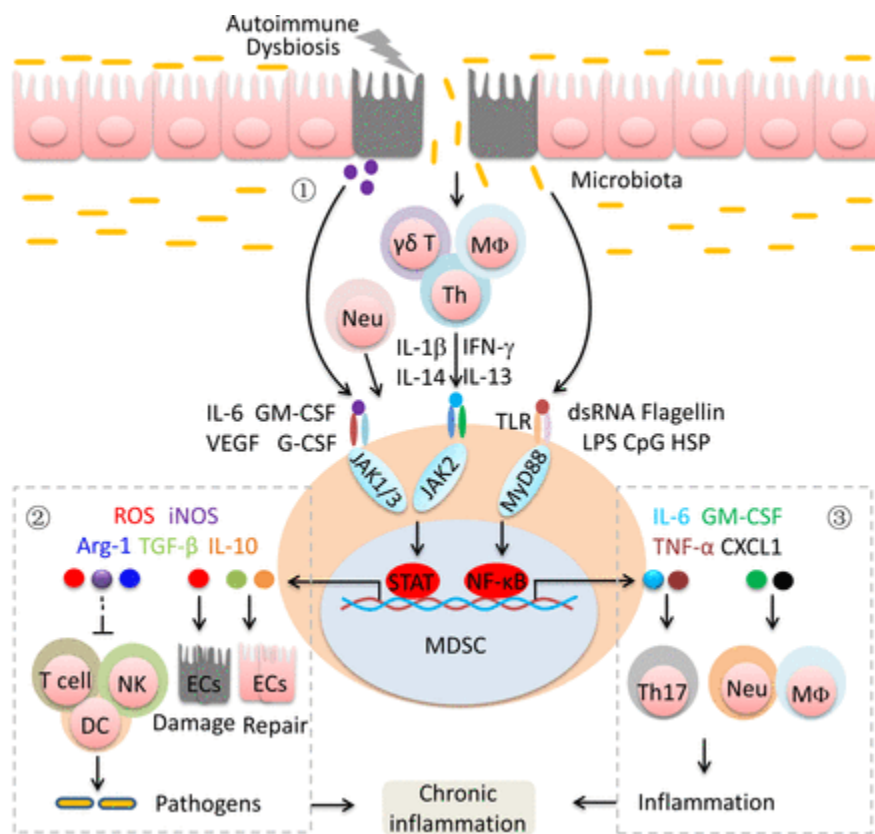


Figura 7. Papel de las MDSC en la patogénesis de EII, ① El estrés inmunológico, el daño y el microbioma conducen al reclutamiento y activación de MDSC. ② Las MDSC inducen daño y reparación de IEC mediante la secreción de moléculas efectoras. ③ Las MDSC promueven la diferenciación y el reclutamiento de células inflamatorias. Recuperado de Wang, 2020.

Las MDSC se reclutan y activan en el tejido intestinal cuando se enfrentan a la inflamación, sin embargo, las MDSC colónicas no inhiben la respuesta inflamatoria y, en cambio, promueven la expansión de las células T efectoras. Citocinas derivadas de IEC y derivadas

de células inmunes activadas y factores derivados de la microbiota intestinal conducen al reclutamiento y activación de MDSC en el intestino. En ratones con colitis crónica, las G-MDSC del colon adquieren funciones estimulantes de presentación de antígenos e inducen la activación de las células T y la producción de IL-17. Las células Ly6C^{hi} se convierten en células proinflamatorias y promueven la inflamación intestinal (27).

Las MDSC modulan varios aspectos diferentes del crecimiento tumoral y la metástasis, incluida la inmunosupresión, la invasión local y la formación de PMN, entre ellos los neutrófilos. El papel de los neutrófilos en el cáncer es controvertido, que es el resultado de la actividad aparentemente contradictoria de estas células capaces de promover el crecimiento tumoral o ejercer efectos antitumorales, se sugiere que algunos neutrófilos que se acumulan en el cáncer y la inflamación crónica contribuyen al desarrollo y progresión del tumor sin provocar actividad inmunosupresora (28).

Una característica fundamental de los neutrófilos es su capacidad para migrar a sitios de inflamación. Este proceso está dirigido por quimiocinas, moléculas de patrón de moléculas asociadas al peligro, metabolitos de lípidos y otros (28). El reclutamiento de leucocitos como neutrófilos en el espacio extravascular es un paso crítico del proceso de inflamación y juega un papel importante en el desarrollo de diversas enfermedades.

El microambiente inflamatorio desencadena un proceso de varios pasos que eventualmente conduce a la trans migración de neutrófilos a través de la pared del vaso (también llamado extravasación). Obviamente, la acumulación de neutrófilos en el lugar extravascular requiere tanto un microambiente inflamatorio como la capacidad intrínseca de todas las células involucradas para conducir (neutrófilos) o apoyar (células endoteliales, pericitos) el proceso de extravasación (29).

A lo largo de la progresión del tumor, los neutrófilos asociados a tumores (TAN) cambian de una función antitumoral a un fenotipo pro-tumorigénico, bajo la influencia del microambiente tumoral (30).

2.6. STAT1 e IL17

Se ha aceptado ampliamente una estrecha relación entre la inflamación y el cáncer de colon, y la interleucina IL -17A desempeña un papel importante en el control de la inflamación del colon (22). Aunque se sabe que múltiples factores que influyen en las respuestas Th17, las citocinas han surgido como reguladores negativos clave, con IFN- γ , considerado uno de los inhibidores más potentes (31), tras el bloqueo de IL-17A disminuye significativamente la expresión de IL-6, STAT3, TNF- α e IFN- γ (22).

La delección de IFN- γ o su receptor conduce a un aumento de la producción de IL-17, el IFN- γ propaga una cascada de señalización Jak / STAT que conduce a una activación robusta de STAT1 y, en menor medida, de STAT3. Al igual que el IFN- γ , otras citocinas que activan STAT1 pueden afectar las respuestas de Th17. *in vitro* los estudios han demostrado que IFN- γ e IL-27 no pueden suprimir la producción de IL-17 en ausencia de STAT1, lo que sugiere un mecanismo común (31).

Además, la ausencia de STAT1 aumenta significativamente la producción de citocinas Th17 cuyas respuestas Th17 se ven afectadas por citocinas que activan STAT1, un estudio realizado anteriormente en ratones inducidos por STAT1 - / - CAC demostró que la ausencia de STAT1 aumenta significativamente la producción de citocinas Th17 (IL-17A, IL-17F e IL-22), mostrando un desequilibrio en la expresión y producción de estas citocinas (32).

Se encontraron niveles regulados al alza de IL-17A e IL-17F en ratones STAT1 - / - durante el desarrollo de CAC. Además, la IL-17A se ha asociado con la susceptibilidad al CAC, los niveles altos de IL-17A producidos por los esplenocitos de STAT1 - / - pueden favorecer el reclutamiento de granulocitos en el sitio del colon, que se han relacionado con mal pronóstico en diferentes tipos de cáncer, incluido el CAC.

STAT1 puede desempeñar múltiples funciones en la modulación del desarrollo de CAC, evitando las respuestas Th17, así como la diferenciación y el reclutamiento de neutrófilos (32).

2.7. Inducción de Cáncer de Colon

La reparación tisular sostenida instiga la proliferación de células premalignas que conducen a la formación de tumores, la producción de mediadores inflamatorios y activación de células proliferación, contribuyen a la formación y progresión del tumor (19).

El modelo utilizado en este experimento fue AOM/DSS. Este es un modelo de promoción iniciación potente, reproducible y relativamente económico que utiliza inducción química de daño en el ADN, seguido de ciclos repetidos de colitis (33). El AOM es un agente químico que puede iniciar un cáncer por alquilación del ADN, facilitando un apareamiento erróneo de bases nitrogenadas (34).

Una vez que el AOM ha sido inyectado en la cavidad celómica este es absorbido por los capilares del peritoneo y entra en la circulación sanguínea, el AOM (Metil-metilimino-oxidoazano, $\text{CH}_3 \text{N} = \text{N} (\rightarrow \text{O}) \text{CH}_3$) es un procarcinógeno que es metabolizado por el citocromo p450, dentro de los capilares sanguíneos es transportado hacia el hígado donde es metabolizado por enzimas del sistema CYP450, convirtiéndolo en metilazocimetanol (MAM), una especie alquilante altamente reactiva que induce O^6 Aductos de metilguanina en el ADN que dan como resultado transiciones $\text{G} \rightarrow \text{A}$ (33). El cual en sí mismo también es carcinogénico e inhibe la síntesis de proteínas, este es excretado por los hepatocitos a través de los conductos biliares hasta desembocar en el conducto colédoco hacia la luz del intestino. Después de su excreción vía biliar, el metilazoximetanol es nuevamente metabolizado por la flora bacteriana intestinal antes de que pueda tener efecto colonotrópico, obteniéndose nuevamente un metabolito secundario llamado metildiazonio, el cual es extremadamente carcinogénico y permanece un tiempo considerable en la luz del colon hasta que es expulsado por las heces debido a movimientos peristálticos (34).

El DSS es un polisacárido similar a la heparina que se disuelve en el agua potable e inflige daño al epitelio colónico, induciendo colitis que imita algunas de las características de la EII. La combinación de AOM y DSS proporciona un modelo de tumor de dos pasos de CAC (33). Una vez ingerido el DSS pasa por la luz del canal gastrointestinal desde la boca hasta finalizar en el ano, que causará ligera inflamación en el tracto digestivo, sin embargo, tendrá su mayor acción proinflamatoria hasta llegar al colon donde va a interactuar electrostáticamente con cadenas largas de ácidos grasos formando vesículas que fácilmente pueden atravesar las

membranas plasmáticas de distintas células epiteliales del colon, una vez dentro de estas células epiteliales el DSS podría llegar a inhibir algunas enzimas necesarias para el correcto funcionamiento de la célula o unirse con receptores intracelulares iniciado así la generación de citocinas proinflamatorias, mientras que las cadenas largas de ácidos grasos podrían interferir con el correcto funcionamiento de distintas claudinas explicando en parte así el aumento de la permeabilidad (35).

Las características clave del modelo AOM / DSS incluyen su cronograma relativamente corto y un modelo preciso de CAC. El desarrollo de tumores puede ocurrir en tan solo 10 semanas. Además, la histopatología de los tumores inducidos por AOM / DSS recapitula facetas clave del CAC humano, como los tumores de localización distal y los adenocarcinomas invasivos (33). En las similitudes con la CCR humana se encuentran por ejemplo la ubicación de tumores que en ratón y humanos que se concentra en la parte distal del colon. Muy frecuentemente ellos se desarrollan a partir de pólipos (crecimiento polipoide) y frecuentemente exhiben rasgos histopatológicos muy semejantes a los que se observan en CCR humano (34), con la diferencia que los tumores inducidos por AOM raramente muestran metástasis e invasividad de la mucosa (37).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Previamente en el grupo de trabajo se demostró que STAT1 actúa como una molécula supresora de tumores en la carcinogénesis asociada a la inflamación. Los ratones STAT1^{-/-} presentan un incremento en la proliferación de las células epiteliales colónicas, una disminución de la apoptosis y una sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en el colon durante las primeras etapas del inicio del CAC, lo que se relaciona con una aparición más rápida de los tumores. Además, la deficiencia de STAT1 promueve una mayor acumulación de células granulocíticas en el bazo y un aumento en la producción de citocinas IL-17A, IL-17F e IL-22 en el colon en comparación con los ratones WT. Estos cambios están asociados a una mayor susceptibilidad de los animales STAT1^{-/-} a desarrollar mayor inflamación y por ende la aparición de tumores más agresivos en etapas más tempranas en comparación con animales WT (32). Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales STAT1 regula las respuestas inmunitarias durante el inicio del CAC no se conocen con claridad.

4. HIPÓTESIS

La inhibición de la citocina IL-17 en animales deficientes en STAT1 disminuirá el desarrollo tumoral, al impedir el reclutamiento de neutrófilos y de células mieloides granulocíticas.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la inhibición de la IL-17 en el reclutamiento de células mieloides durante las etapas iniciales del CAC en animales STAT1^{-/-}.

5.1. Objetivos específicos

- Inducir el cáncer de colon a animales silvestres (WT) y deficientes en STAT1^{-/-} mediante el uso de azoximetano (AOM) y dextrán sulfato de sodio (DSS).
- Administrar el anticuerpo anti-IL17 durante las etapas tempranas del desarrollo tumoral en el modelo experimental.
- Evaluar cambios en el reclutamiento de neutrófilos en el colon en animales WT y STAT1^{-/-} bajo el esquema de inhibición de IL-17 en diferentes etapas del desarrollo del CAC.
- Determinar alteraciones en las poblaciones de células supresoras mieloides (MDSCs) circulantes y en el bazo bajo el esquema de inhibición de IL-17 en diferentes etapas del desarrollo del CAC.
- Estudiar los cambios en la expresión de pSTAT3 en el colon en respuesta a la inhibición de IL-17.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Se utilizaron ratones hembras, silvestres (WT) BALB/c y ratones deficientes en STAT 1^{-/-} de fondo genético BALB/c de 8 a 10 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y con agua y alimento *ad libitum* en el Bioterio de la FES-Iztacala, UNAM.

Se contó con 6 grupos experimentales, donde el primer grupo experimental está constituido por 6 ratones deficientes en STAT1^{-/-} sometidos a tratamiento con AOM/DSS y que además recibieron 7 inyecciones de 200 µg de anticuerpo anti-IL17A, el segundo grupo estaba constituido por 10 ratones STAT1^{-/-} sometidos a tratamiento con AOM/DSS, el tercer grupo estaba constituido por 5 ratones deficientes en STAT1^{-/-} sin ningún tratamiento usados como grupo control.

El cuarto grupo estaba constituido por 5 ratones de genotipo silvestre de la cepa BALB/c sometidos a tratamiento con AOM/DSS y que además recibieron 7 inyecciones de 200 µg de anticuerpo anti-IL17A, el quinto grupo lo constituyeron 9 ratones de genotipo silvestre BALB/c con tratamiento AOM/DSS, finalmente el sexto grupo lo constituyó 4 ratones de genotipo silvestre BALB/c sin ningún tratamiento usados como grupo control.

Tabla 1. Distribución de los grupos experimentales.

Grupos Experimentales			
STAT1 ^{-/-}	n	WT	n
STAT 1 ^{-/-} AOM/DSS anti-IL17A	6	BALB/c AOM/DSS anti-IL17A	5
STAT 1 ^{-/-} AOM/DSS	10	BALB/c AOM/DSS	9
STAT 1 ^{-/-} CTR	5	BALB/c	4

6.2. Genotipo

Con la finalidad de cerciorarse que efectivamente los ratones KO eran deficientes en STAT 1 se extrajo ADN del tejido mediante una digestión enzimática y se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para poder extraer el material genético de las colas de ratón, fueron cortadas al inicio del experimento, se extrajo aproximadamente 1 cm y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se adicionó 500µL de buffer de lisis celular adicionado con 10 microgramos de proteínasa K (colagenasa) que destruye diversos contenidos celulares y tisulares sin dañar el ADN, estos fueron dejados 12 horas a 55°C.

Una vez pasado las 12 horas se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 minutos a 4° C para dejar los restos celulares. Se extrajo la porción superior líquida (fase acuosa) que fue colocada en un nuevo tubo Eppendorf estéril, eliminando así los restos celulares. Se llevó a cabo la precipitación del material genético con 500 µL de isopropanol frío (-20°C) y se centrifugo a 12,000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se agregaron 1 mL de etanol al 75% (-20°C), con la finalidad de lavar la pastilla y resuspender, se centrifugó nuevamente y se decantó el sobrenadante. Finalmente se dejó secar la pastilla para eliminar los restos de etanol, se resuspendió en 200µL de agua Mili-Q, para poder ser secuenciado por medio de PCR.

El DNA se cuantificó con ayuda del *EpochTM Multi-Volume multi-sample Spectrophotometer System* y se verificó la integridad del ADN mediante una electroforesis en gel de agarosa y se procedió a hacer la PCR utilizando primers específicos.

La reacción de PCR se llevó a cabo usando el kit *Amplificasa Taq DNA polimerasa BioTechMol* en un volumen final de 25µL utilizando 2 µg de c ADN de tejido según el caso con la ayuda de un termociclador de ascenso y descenso rápido de temperatura bajo las condiciones indicadas en la tabla 2.

Tabla 2. Condiciones utilizadas en las etapas de PCR.

Proceso	Temperatura °C	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	94	1 min	1
Desnaturalización	95	30 s	35
Alineación	Tm específica	30 s	
Extensión	72	30s	
Extensión final	72	7 min	1

Tabla 3. Secuencias de los primers utilizados para genotipo *STAT1*.

<i>Gen</i>	Temperatura de alineación	Amplicon (pb)	Secuencia 5'-3'
<i>STAT1</i>	52°C	172	WT-R CTG ATC CAG GCA GGC GTT
			Común F TAA TGT TTC ATA GTT GGA TAT CAT
<i>Neo STAT1</i>	52°C	310	Mutante R GAG ATA ATT CAC AAA ATC AGA GAG

6.3. Inducción del cáncer colorectal

Para el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis (CAC), los ratones fueron inyectados vía intraperitoneal con 12,5 mg/Kg de Azoximetano (AOM) diluido en solución salina fisiológica. Cinco días más tarde, se administró en los bebederos Dextrán Sulfato de Sodio (DSS) al 2% disuelto en el agua potable durante 7 días. Después, los ratones se mantuvieron con agua normal durante 14 días y se sometieron a dos ciclos más de DSS. Los ratones fueron sacrificados los días 22 (etapa temprana del desarrollo tumoral) y 74 (etapa tardía del desarrollo) para la extracción de tumores.

6.4. Inhibición de IL-17

Se les administró intraperitonealmente el anticuerpo monoclonal InVivo MAb anti-mouse IL-17A (clone: 17F3), Bio X Cell, (Lebanon, NH, USA) a ratones STAT 1^{-/-} y BALB/c en una concentración de 200 µg por ratón al cuarto día de haber iniciado el tratamiento con AOM y dicho anticuerpo se administró cada dos días hasta completar un total de 7 dosis a cada uno.

Cronograma

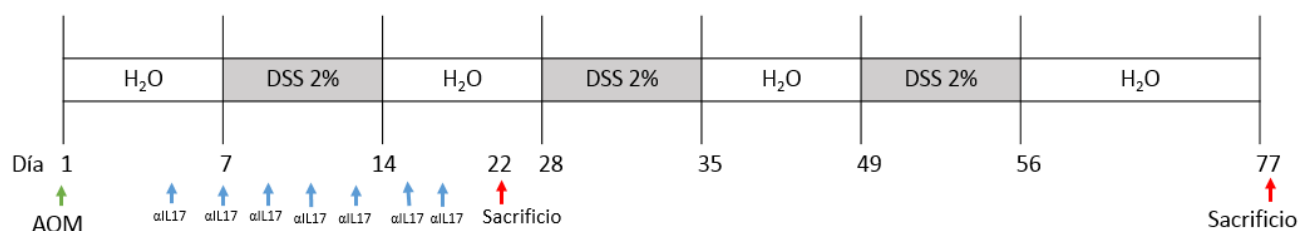


Figura 8. Esquema de administración de AOM/DSS en ratones BALB/c y STAT1^{-/-}, donde una semana corresponde DSS en el agua para beber seguido de dos semanas de agua regular estéril, la administración del anticuerpo neutralizante αIL17 se administró al quinto día después de la aplicación de AOM, día de por medio hasta completar 7 dosis.

6.5. Valoración de la progresión tumoral

Se evaluó el índice de daño de la enfermedad (DAI) siguiendo los criterios establecidos por Dae-Sung *et al.* (2013)(36). Monitoreando 2 veces por semana el progreso del cáncer asociado a colitis , registrando la pérdida o ganancia de peso por ratón de cada uno de los grupos y registrando observaciones de sangrado y consistencia de heces, calculando el DAI de la siguiente manera:

Tabla 4. Puntuación clínica de índice de daño de la enfermedad (DAI) para la colitis inducida por DSS basado en la pérdida de peso, sangrado y consistencia de las heces. Recuperado y modificado de Dae-Sung et al. 2013.

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

6.6. Sacrificio

Se dividió los grupos para realizar dos evaluaciones del desarrollo de cáncer, a los días 21 (etapa temprana) y al día 77 (etapa tardía) se realizó el sacrificio de los animales de la siguiente forma:

Tabla 5. Separación de grupos para la evaluación del desarrollo del cáncer en etapa temprana y tardía.

Tratamiento	Grupo	STAT 1-/-		n	WT		n
	Día	20	77		20	77	
Anti IL-17 AOM/DSS		2	4	6	2	3	5
AOM/DSS		5	5	10	3	6	9
CTR		2	3	5	2	2	4

De todos los modelos experimentales se tomó una muestra de sangre de la cola con el fin de obtener el suero presente en la circulación, una vez hecho esto, se procedió a sacrificar al ratón con CO₂ y se cubrió al ratón con etanol al 70% para evitar la contaminación con pelo durante la extracción del colon

En condiciones de esterilidad con pinzas de disección se realizó una incisión en la línea media abdominal para exponer el peritoneo, extendiendo la incisión a ambos lados del abdomen, así como a lo largo del mismo, del cual se extrajo el bazo y el colon completo

6.7. Análisis macroscópico

Una vez extraído el colon se mantuvo en hielo en todo el proceso de examinación. Se hizo un lavado con solución salina fisiológica (SSF) para remover el contenido fecal del colon, se registró la longitud y se procedió a abrir longitudinalmente para examinar la presencia de tumores, realizando el conteo del número y tamaño de los mismos.

Se cortó una muestra de 1 cm de región más distal (más próxima al ano) que se fijó en etanol al 100% para procesamiento histológico y otra sección fue almacenada en nitrógeno líquido a -70 °C.

6.8. Análisis histológico

Para evaluar el desarrollo de la enfermedad, se llevó a cabo la inclusión en parafina de los tejidos almacenados en alcohol absoluto para mantener la estructura morfológica de las células y los tejidos sin que ocurran cambios notables en ellos de acuerdo a la técnica estandarizada en el laboratorio para preparar y preservar los tejidos.

Para llevar a cabo la fijación de la muestra se utilizó alcohol absoluto (100%) durante 24 horas, al concluir la fijación, se llevó a cabo la deshidratación del tejido con alcohol absoluto mediante tres baños del tejido de 1 hora cada uno, seguido de la utilización de un líquido apolar, debido a que no son miscibles el alcohol y la parafina, en este caso Xilol, mediante tres baños del tejido de 1 hora cada uno, que sirve como aclarador para finalmente ser incluida por infiltración en parafina por medio de tres baños de 1 hora cada uno y una última para incluir en un bloque final por molde.

Resumiendo, este proceso registró en 4 etapas: deshidratación, aclaración, inclusión y la formación del bloque de parafina.

Una vez obtenido los bloques de los tejidos se realizó el corte mediante un micrótopo para realizar cortes de 3 micras de grosor, extendidos mediante un baño de flotación y adheridos a los portaobjetos y utilizados para tinciones de inmunohistoquímica.

6.9. Inmunohistoquímica

Se realizó una técnica inmunohistoquímica que permitió demostrar una variedad de antígenos presentes en los tejidos utilizando anticuerpos marcados en este caso el anticuerpo policlonal pSTAT3 (Phospho Tyr705) Genetex, Inc. (North America) y el anticuerpo monoclonal Ly6G (Anti-Ly6g antibody [RB6-8C5]) Abcam, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Esta técnica está basada en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a su antígeno correspondiente, los cuales posteriormente son identificados con anticuerpos secundarios acoplados a una enzima, que a su vez reacciona con el peróxido de hidrógeno que tornara el sustrato incoloro, revelando así la presencia y ubicación de la molécula blanco.

Se desparafinaron los cortes en dos baños de xilol de 10 minutos cada uno, se utilizó un lavado en OH-Xilol de cinco minutos para posteriormente hidratar los cortes con baños decrecientes de etanol (100%, y 96%) de tres minutos cada uno y se lavaron los tejidos en agua destilada por tres minutos.

Se hizo la recuperación antigénica en una olla de presión precalentada, en la cual se introdujo un vaso con buffer de citratos (DIVA) con las laminillas a tratar (30 min). Terminado el tiempo se sacó el vaso y se dejó enfriar a temperatura ambiente para evitar un choque térmico y el daño al tejido.

Se extrajeron las laminillas y se lavaron dos veces con PBS-Tween al 0.05%, se dejó 30 minutos con tritón al 0.1% cubierto con parafilm, se lavó dos veces con PBS-Tween se llevó el bloqueo con Tritón-BSA al 0.2% por 1 hora para lavar de nuevo con PBS-Tween.

Posteriormente se agregó anticuerpo primario (1:100 para pSTAT3 (phospho Tyr 705 GeneTex) y 1:50 (para Ly6G abcam)) 200µL por laminilla disuelto en Tritón al 0.01% durante toda la noche, cubierta cada laminilla con papel parafilm para evitar la desecación de la muestra, posteriormente se lavó con PBS-Tween y agregar anticuerpo secundario (1:500) por 1 hora disuelto en PBS y de nuevo lavar con PBS-Tween.

Para el revelado se utilizó diaminobencidina 3µL de reactivo/ 150µL de buffer por 30 minutos y un lavado con PBS-Tween, se colocó en agua destilada para poder contrateñir con hematoxilina (1 min) se lavó con agua corriente. Se deshidrataron los tejidos en baños crecientes de alcohol (96% y 100%) de tres minutos cada uno, se utilizó OH-Xilol durante

cinco minutos para poder realizar la aclaración del tejido usando dos baños de Xilol de 10 y 8 minutos cada uno. Se realizó el montaje de los tejidos utilizando entellan y un cubreobjetos sobre ellos.

6.10. Citometría de flujo

Para la extracción de células de bazo

Se extrajo el bazo, se perfundió con solución salina con el fin de extraer las células, se centrifugó a 250 rpm por 10 minutos para extraer el pellet y se resuspendió con 5 ml de buffer de lisis, se incubó por 10 minutos en agitación, se centrifugó nuevamente para obtener el pellet y se resuspendió en 5 mL de RPMI, se centrifugó y se volvió a resuspender el pellet en 3 mL de RPMI, se tomaron 10 μ L y 10 μ L de azul tripán para conteo en cámara de Neubauer, ajustando a un millón de células por tubo y agregando un mililitro de FACS.

Se centrifugaron las células a 2500 rpm durante 10 minutos, se agregó el CD16/CD32 BioLegend San Diego, CA, USA (0.5 μ L x 1 millón de células), donde se hizo un pool para todos los tubos con el anticuerpo y 25 μ L de FACS por tubo y se incubó 15 minutos a 4 °C.

Se usaron los anticuerpos específicos correspondientes a cada muestra dirigidos a los antígenos de membrana CD11b, Ly6C y Ly6G (anti-mouse, BioLegend) agregando 1 μ L por tubo y haciendo un pool en 25 μ L de FACS.

Se preparó un blanco, un control de FITC, control de APC, un control de PE y un control de isotipo, se homogeneizó en vórtex, se incubó una hora a 4 °C, se lavó dos veces con 500 μ L de FACS y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos.

Se agregó 50 μ L de paraformaldehído al 4% y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, se agregó 300 μ L de FACS a las muestras y 350 μ L de FACS al blanco y al control y se leyó en el citómetro de flujo *Attune Thermo Fisher Scientific*, los resultados se analizaron con el software *FLOWJo V10*.

Tabla 6. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo.

Anticuerpo	Información	Descripción
APC/cy7	Anti-mouse/ human CD11b BioLegend Clone: M1/70	CD11b de la familia de las integrinas, se expresa principalmente en granulocitos, monocitos / macrófagos, células dendríticas, células NK y subconjuntos de células T y B.
FITC	Antimouse ly6C Clone: HK1.4 BioLegend	Ly-6C es una proteína expresada en células de monocitos / macrófagos de ratón, células endoteliales, neutrófilos y algunos subconjuntos de células T.
PE	Antimouse ly6G Clone: 1 A8 BioLegend	El complejo de antígeno linfocítico 6, locus G (Ly-6G), una proteína expresada en la mayoría de las células mieloides de la médula ósea y los granulocitos periféricos.

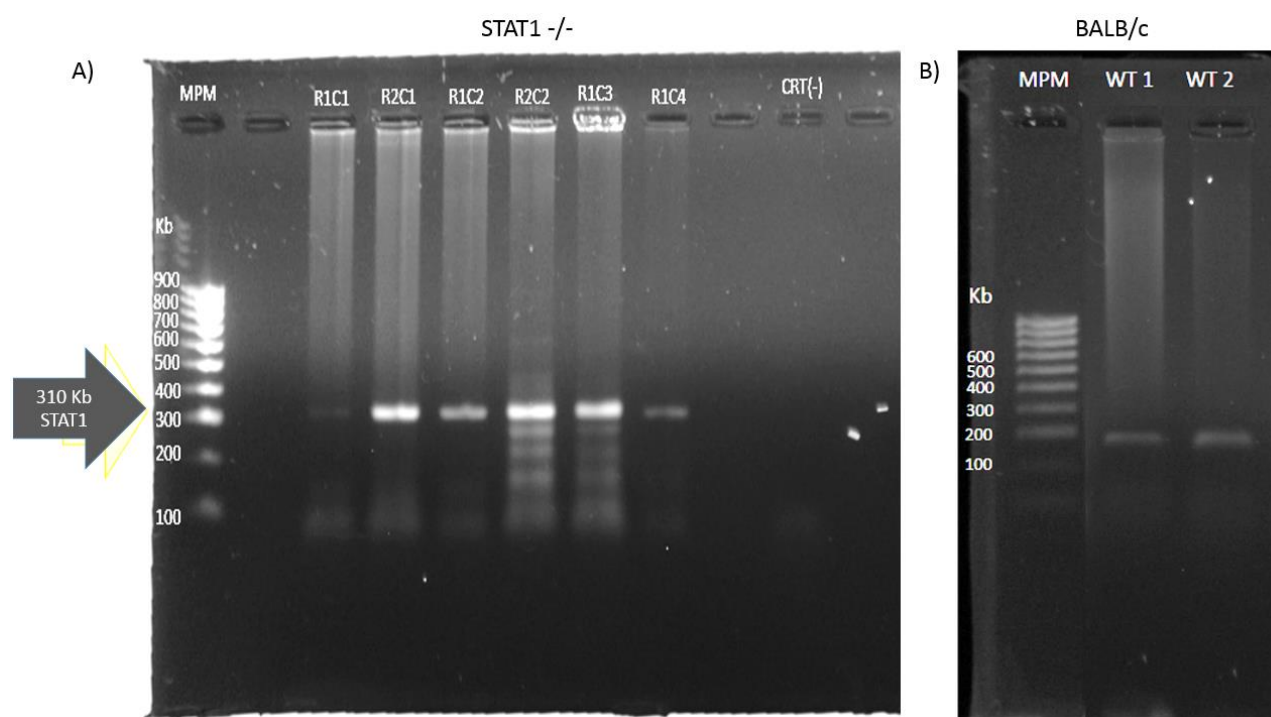
6.11. Análisis estadístico

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

7. RESULTADOS

7.1. Genotipo de STAT1

Todos los animales obtenidos del bioterio de la FES Iztacala, fueron genotipados para comprobar su estado Knock out (K.O), los animales de genotipo de la cepa STAT1 KO con fondo genético BALB/c, donde se comprobó que los ratones eran deficientes en STAT 1. Los animales considerados como STAT1 $-/-$ únicamente amplificaron las regiones Neo casete insertado en el gen codificante para STAT1, 310 Kb (figura 8), mientras que los animales WT amplificaron la secuencia codificante para la proteína STAT1 en 172 Kb, se usaron dos animales BALB/c (Wild Type) como control.



7.2. Síntomas de la enfermedad y análisis en el cambio de peso en los grupos STAT1^{-/-} y BALB/c durante CCR

Durante once semanas bajo el tratamiento de AOM/DSS en CCR, se registró sangrado en el recto y diarrea, considerados síntomas de CCR en los cuatro grupos experimentales con tratamiento. Durante la administración del tratamiento el grupo experimental WT AOM/DSS presentó sangrado, diarrea y disminución en el peso corporal mayor en comparación con los demás grupos.

Se registró el porcentaje de peso en los 4 grupos experimentales con el tratamiento AOM/DSS donde se observó que desde el día 20 que corresponde a una semana después del primer ciclo de DSS, los ratones STAT1^{-/-} AOM presentaron una disminución en la ganancia de peso, esto mismo se observa en los días siguientes al tratamiento, sin embargo, en los ratones STAT1^{-/-} AOM α IL-17 no tuvieron pérdida significativa en el peso corporal. (Figura 10).

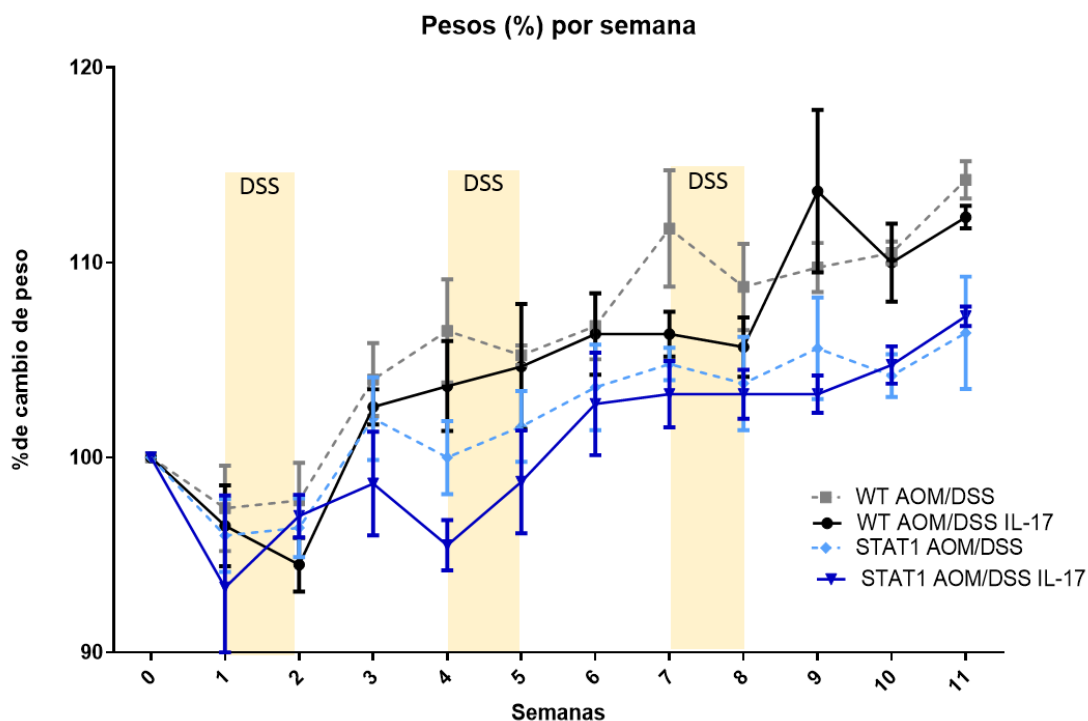


Figura 10. Cambios en el peso corporal expresado en porcentaje respecto al peso inicial donde la pérdida de peso corporal se asocia al desarrollo del CAC a lo largo del tratamiento con AOM/DSS en animales BALB/c (WT) y STAT1^{-/-}, durante los tres ciclos correspondientes a la inducción del CAC. Los datos fueron registrados dos veces por semana durante 77 días, los datos corresponden a 5 animales por grupo a los cuales representa el promedio \pm DS.

7.3. Análisis del índice de daño de la enfermedad (DAI)

Durante la inducción del CAC se registró el DAI mediante los parámetros descritos en materiales y métodos (Tabla 4), durante todo el tratamiento, los ratones BALB/c AOM/DSS presentaron menor daño en comparación con los demás grupos sometidos al tratamiento, los demás grupos (STAT1 -/- AOM/DSS α IL-17, STAT1 -/- AOM/DSS Y WT AOM/DSS α IL-17) presentaron un daño similar, aunque en la etapa final del CAC (semanas 9-12) los ratones STAT1-/-AOM/DSS anti IL-17 tuvieron un menor DAI.

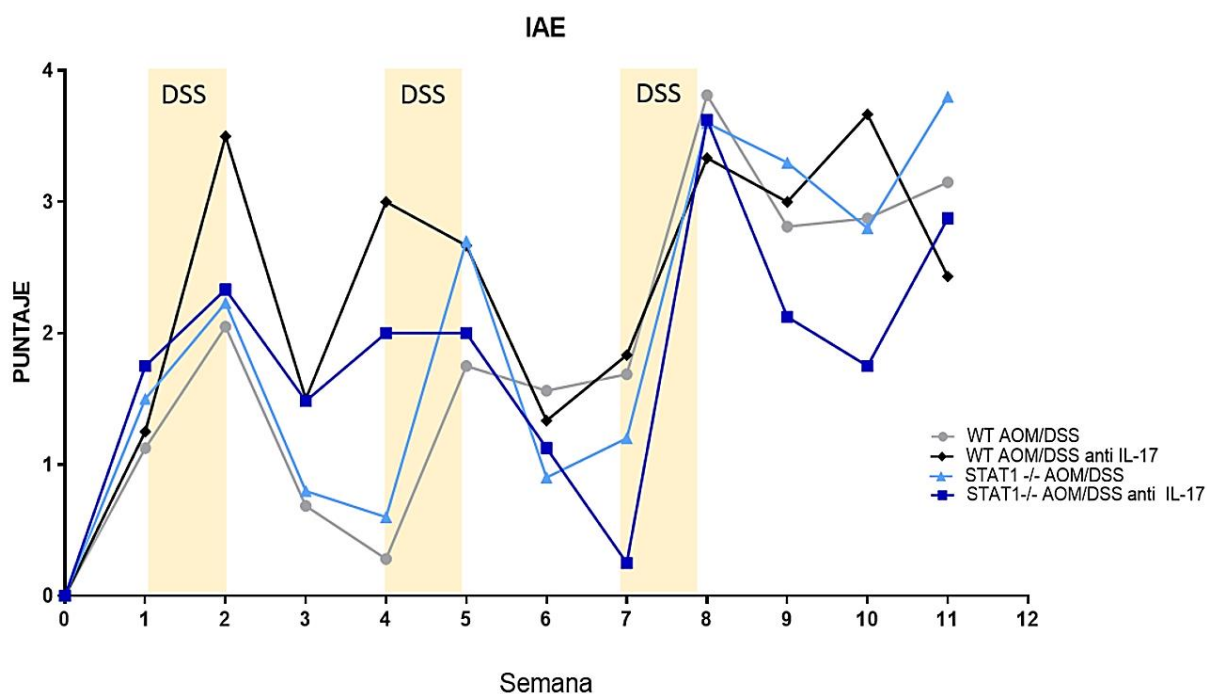


Figura 11. Índice de daño de la enfermedad (DAI) en los grupos sometidos a AOM/DSS durante los tres ciclos correspondientes a la inducción del CAC. Donde el daño fue menor en el grupo BALB/c AOM/DSS. Los datos fueron registrados dos veces por semana durante 77 días, los datos corresponden a 5 animales por grupo.

7.4. Análisis de cambios morfométricos en el intestino

En el modelo murino de CAC experimental el 100% de los animales BALB/c y STAT1 -/- con AOM/DSS desarrollaron tumores para el día 74, por lo que evaluamos y comparamos la presencia o ausencia de los mismos. Cuando realizamos la extracción del colon de los animales nos percatamos de que la longitud de los mismos era menor en los animales BALB/c AOM (figura 12a), el desarrollo de tumores se inició desde la zona media hasta la zona distal del colon (figura 12b).

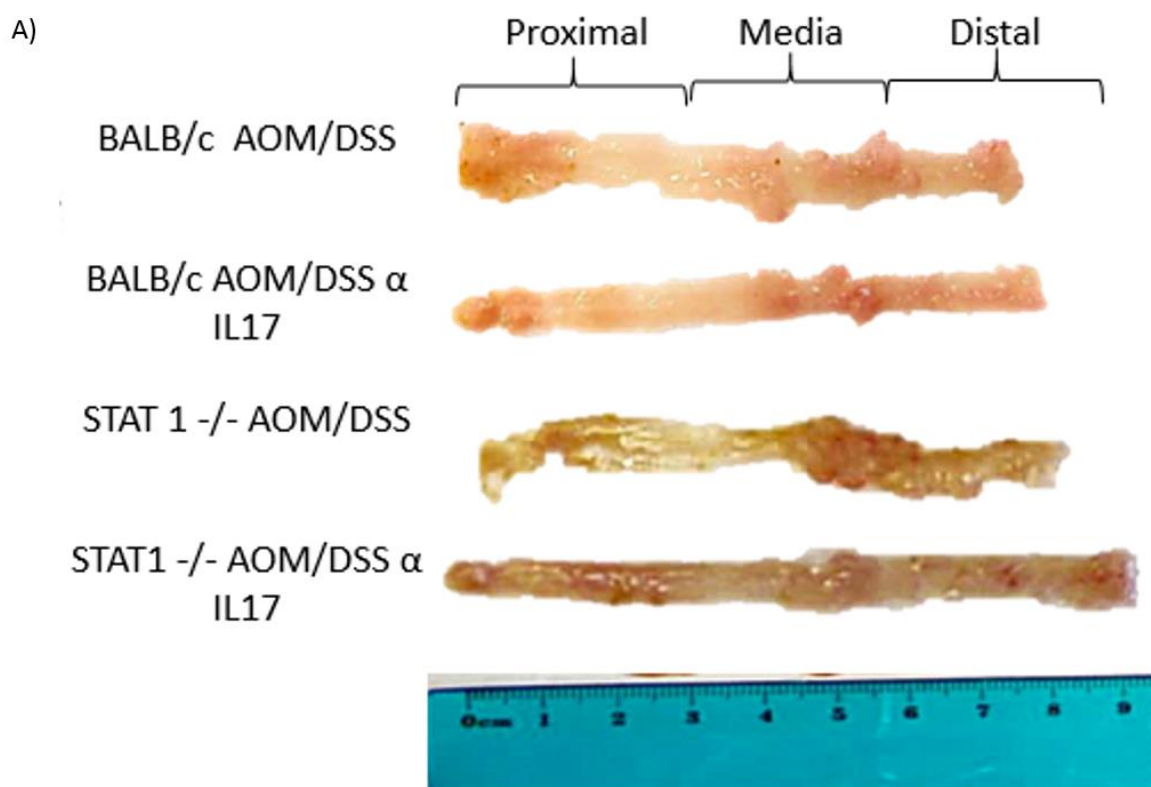




Figura 12. A) Esquema comparativo del tamaño del colon de los diferentes grupos sometidos a tratamiento, esquematizando las tres secciones del colon. B) Colon de ratones de los grupos BALB/c AOM/DSS α IL-17, BALB/C AOM/DSS, STAT 1 $-/-$ AOM/DSS α IL-17 y STAT1 $-/-$ AOM/DSS al día 77 del tratamiento, donde se muestran la presencia de tumores en la parte media-distal en los diferentes grupos.

Se registró la longitud del colon en los cuatro grupos experimentales al día 77, donde se observa que ambos grupos pertenecientes a BALB/c poseen un tamaño menor a los grupos STAT 1-/- principalmente el grupo STAT1 -/- AOM/DSS α IL17, aunque esta diferencia no fue significativa.

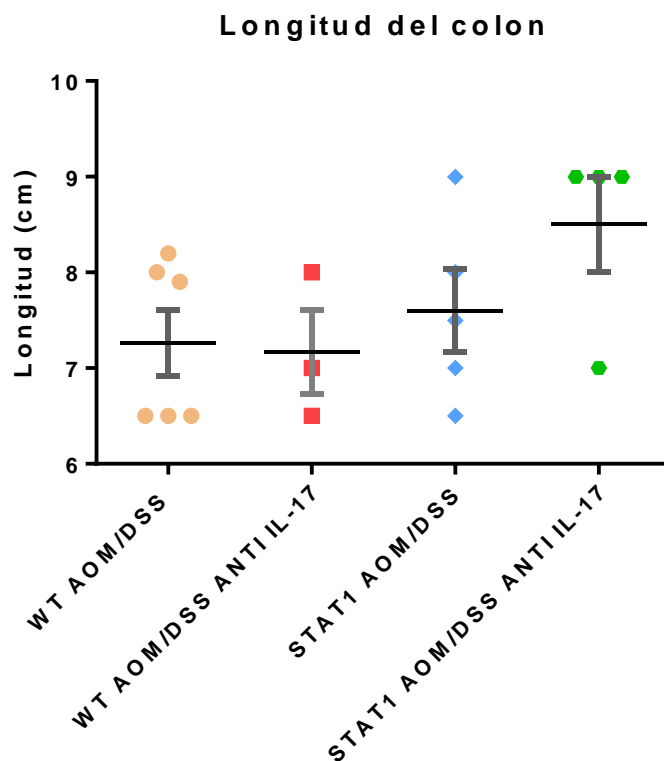


Figura 13. Longitud del colon en centímetros, en los grupos con tratamiento al día 77 de la inducción de AOM/DSS, donde el grupo STAT 1-/- AOM/DSS α IL-17 presento una mayor longitud en comparación con los demás grupos. Los datos corresponden a 4 animales por grupo y representa el promedio \pm Ds.

7.5. Análisis del número y tamaño de tumores en los diferentes grupos

Al término del experimento (día 77) se extrajo el colon donde se encontró que los ratones STAT1 -/- AOM/DSS α IL-17 presentaron un menor número de tumores y mayoritariamente pequeños (menor de 2mm), el grupo BALB/c AOM/DSS con α IL-17 presento un número mayor de tumores cuyo tamaño en su mayoría era mayor a 2 mm (figura 14a y 14b).

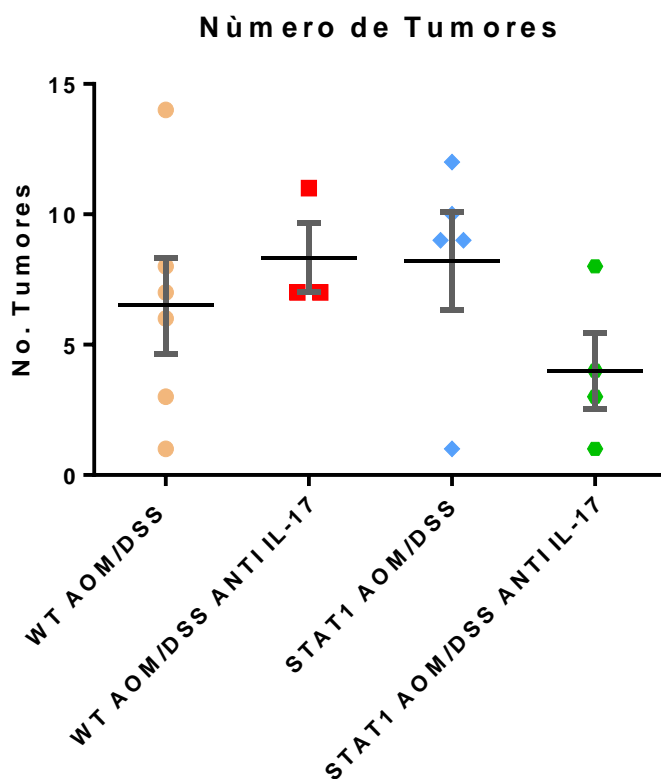


Figura 14. Análisis del número de tumores en los grupos STAT 1-/- y BALB/c con AOM/DSS y con α IL17, el número de tumores fue mayor en el grupo WT AOM/DSS con anti IL17 con un tamaño mayor a 2 mm, mientras que el grupo STAT 1 -/- anti IL17 presento menor número de tumores y mayoritariamente menor de 2 mm. Los datos corresponden a 5 animales por grupo y representa el promedio \pm DS.

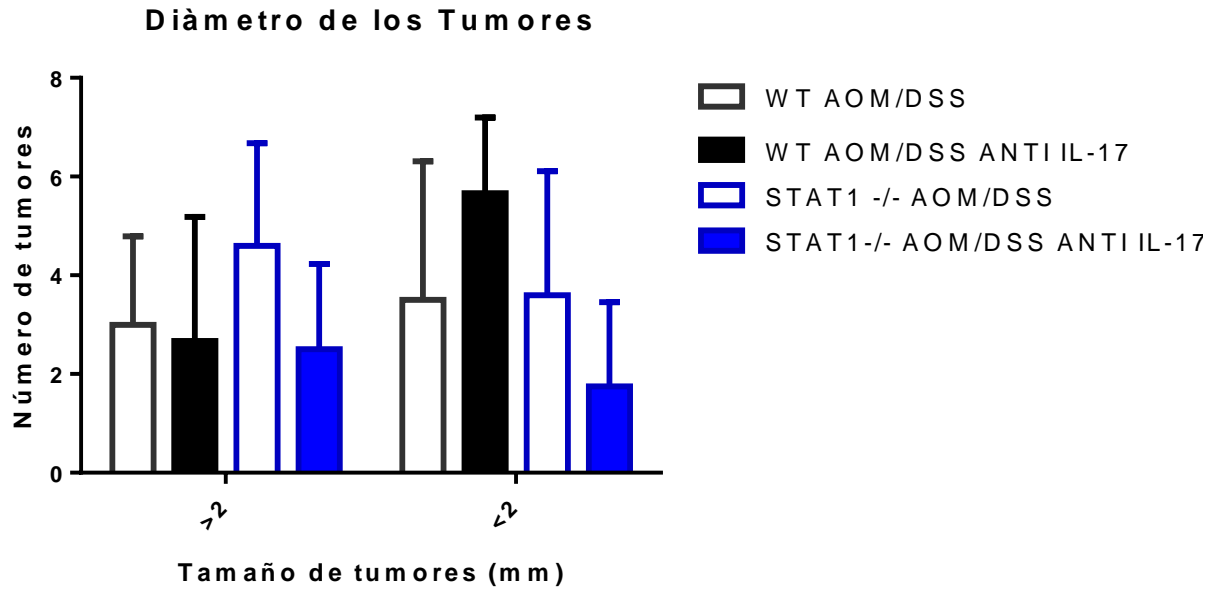


Figura 15. Análisis del tamaño de tumores en los grupos *STAT 1*^{-/-} y *BALB/c* con AOM/DSS y con α IL17, en el grupo WT AOM/DSS con anti IL17 los tumores presentaron un tamaño mayor a 2 mm, mientras que el grupo *STAT 1*^{-/-} anti IL17 presentó tumores mayoritariamente menor de 2 mm. Los datos corresponden a 5 animales por grupo y representa el promedio \pm DS.

7.6. La neutralización de IL-17 en las etapas tempranas del CAC disminuye la expresión de pSTAT3 en el intestino en deficiencia de STAT1

Análisis de la expresión del marcador pSTAT3

Para determinar los niveles de marcadores presentes en la mucosa del colon después del tratamiento de AOM/DSS se realizaron cortes histológicos y dos inmunohistoquímicas utilizando dos anticuerpos diferentes: pSTAT3 y Ly6G.

El objetivo del presente estudio fue examinar la relación entre la expresión de células tumorales de STAT1 y STAT3 mediante análisis inmunohistoquímico de STAT3 fosforilado en tejido de muestras de cáncer de colon en etapas tempranas (día 20) y tardías (día 77).

STAT3 fue la proteína STAT con mayor incidencia de actividad constitutiva en biopsias de cáncer colorrectal (38). Por lo tanto, nos concentramos en él y analizamos su estado de fosforilación en tejidos tumorales que abordamos mediante inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo para fosfo-STAT3.

Los resultados de pSTAT3 mostraron el marcaje se presenta de manera uniforme en las células de la mucosa e incluso en células del infiltrado de la lámina propia (figura 15), STAT3 es predominantemente activo en las células transformadas del epitelio desdiferenciado y, por tanto, es enormemente abundante en sus núcleos (39). Mediante el conteo celular se detectó una mayor expresión significativa de pSTAT3 en el grupo STAT1^{-/-} AOM/DSS al día 20 en comparación con los grupos que se les inhibió IL17.

Finalmente, al término del tratamiento (Día 77) se observó una disminución en la expresión de pSTAT3 en la capa de la mucosa, en el caso de STAT1^{-/-} se presentó una fuerte deformación en la estructura del intestino. Se encontró que la actividad constitutiva de STAT3 era abundante en células cancerosas desdiferenciadas y linfocitos infiltrantes de muestras de CCR (40), infiltrado que es prominente en las muestras del día 74 principalmente en los grupos tratados con AOM/DSS que no se les inhibió IL17 (figura 16).

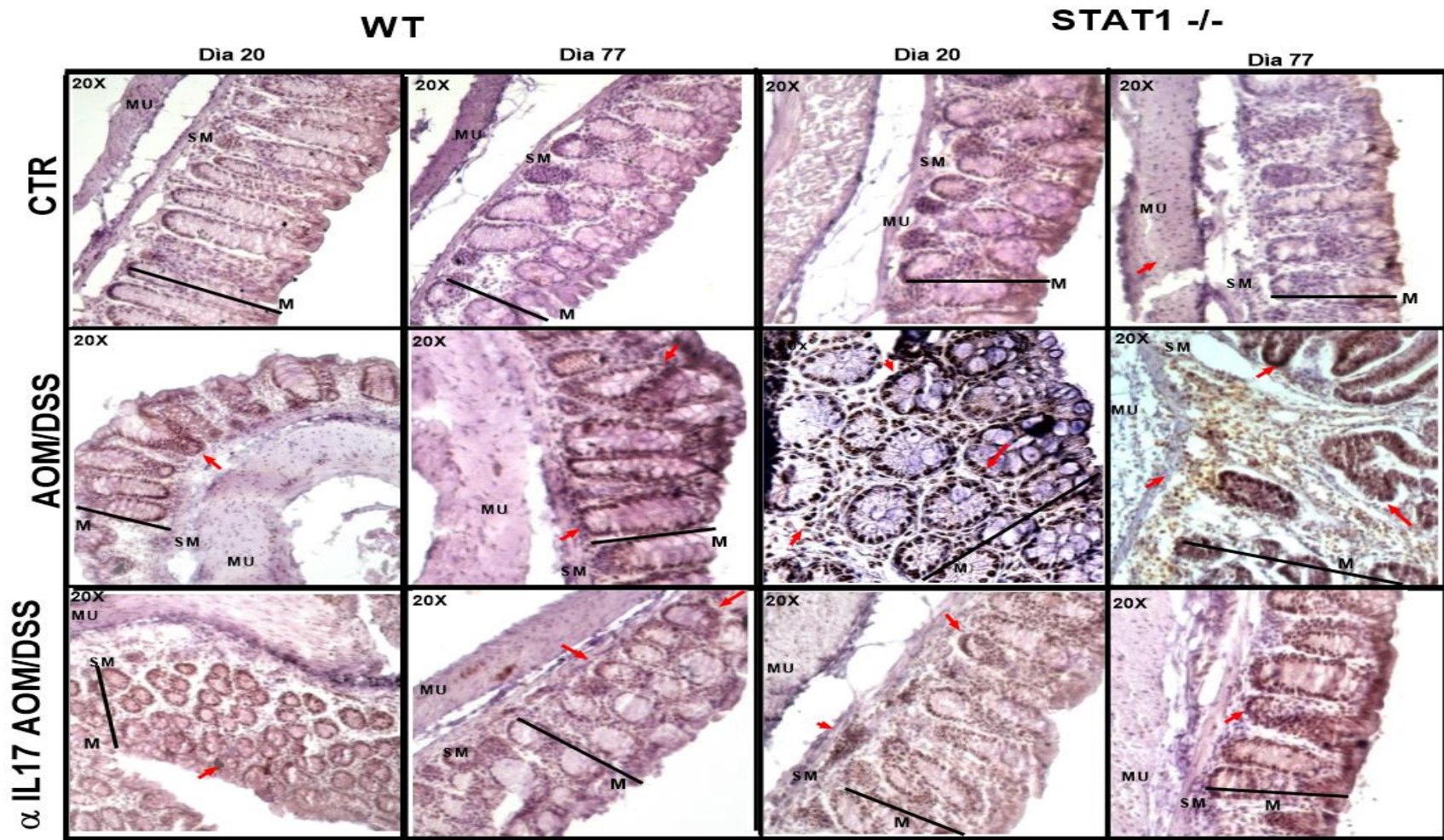


Figura 16. Inmunohistoquímica donde se muestra la expresión de pSTAT3 en CCR donde se tiñe de café. Se observa que el grupo STAT1^{-/-} AOM/DSS presenta una mayor expresión en contraste con los grupos BALB/c. En la imagen se señalan las partes del intestino usando (M) mucosa, (SM) submucosa y la capa muscular (MU).

Se realizó un conteo de células positivas a pSTAT3 en etapas tempranas (día 20) y tardías (Día 77), donde se observa una diferencia significativa en el número de células pSTAT3+ al día 20, mostrando un aumento considerable principalmente en el grupo STAT1 -/- AOM/DSS en comparación con el grupo WT AOM/DSS. Sin embargo, la inhibición de la IL-17 causó una disminución significativa en la expresión de pSTAT3 (figura 16A).

En etapas tardías hubo una disminución de células pSTAT3+ en todos los grupos en comparación con los resultados obtenidos en el día 20, mostrando un aumento en los grupos STAT1 -/- en comparación con los grupos WT, sin embargo, estos datos no muestran diferencia significativa entre sí al día 77.

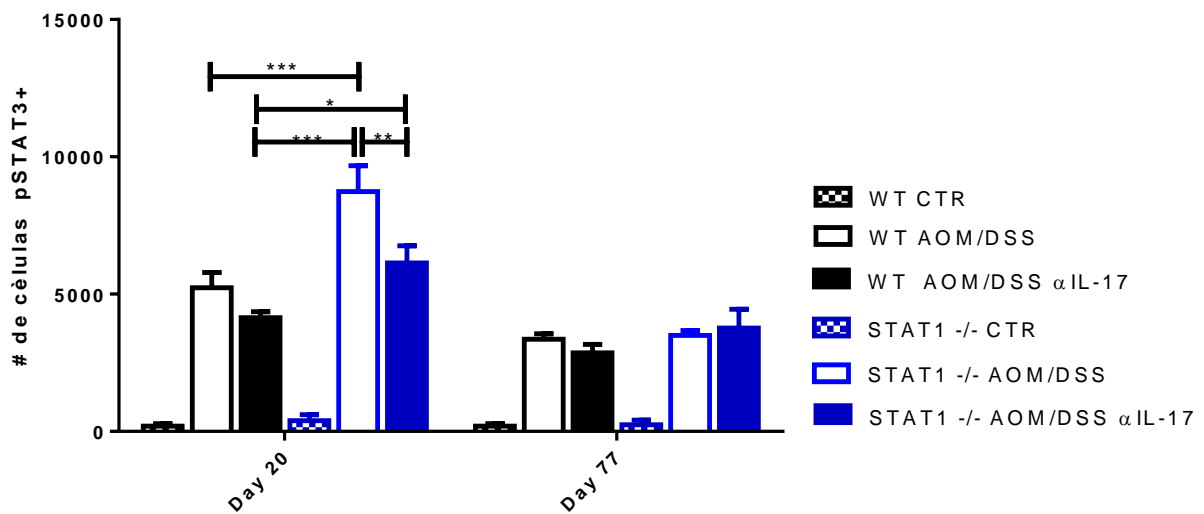


Figura 17. Análisis de células pSTAT3+ en los grupos STAT1 AOM/DSS, STAT1 -/- AOM/DSS αIL17, WT AOM/DSS y WT AOM/DSS αIL17. Los datos corresponden a 5 animales por grupo y representa el promedio ±DS. El análisis estadístico fue determinado utilizando una prueba de ANOVA con prueba de Tukey $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***).

7.7. La neutralización de IL-17 en las etapas tempranas del CAC disminuye el reclutamiento de neutrófilos en el intestino en deficiencia de STAT1

La respuesta inmune del tumor juega un papel crítico en la progresión neoplásica del cáncer de colon, los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son células mieloides del sistema inmunitario innato conocidas por su papel en la respuesta aguda del huésped, aunque la contribución principal de los PMN al inicio de la tumorigénesis del colon no está clara. La infiltración de PMN en la EII es un marcador de la gravedad y la progresión de la enfermedad y son células inmunes muy abundantes en el CCR.

Los PMN se encuentran entre los tipos de células inmunitarias más prevalentes en el microambiente del tumor de colon en el modelo AOM / DSS. Se ha sugerido en gran medida que la función de los PMN en la progresión del cáncer de colon inducido por inflamación es pro-tumorigénica (41).

Al realizar el análisis se observó que los grupos controles presentaban una apariencia normal, sin poseer alguna alteración morfológica detectable, sin embargo, los grupos sometidos a tratamiento presentaron alteraciones morfológicas con el transcurso de los días, hasta desarrollar un carcinoma principalmente en los grupos sometidos a AOM/DSS que no se les inhibió IL17.

Se analizó la expresión de Ly6G, una molécula que se expresa en granulocitos y neutrófilos en etapas tempranas (día 20) y tardías (día 77), donde se observa que el marcaje se presenta en las células del infiltrado de la lámina propia (figura 17), la cual muestra una mayor expresión de células Ly6G+ en el grupo STAT1 -/- sometido a tratamiento con AOM/DSS al día 77.

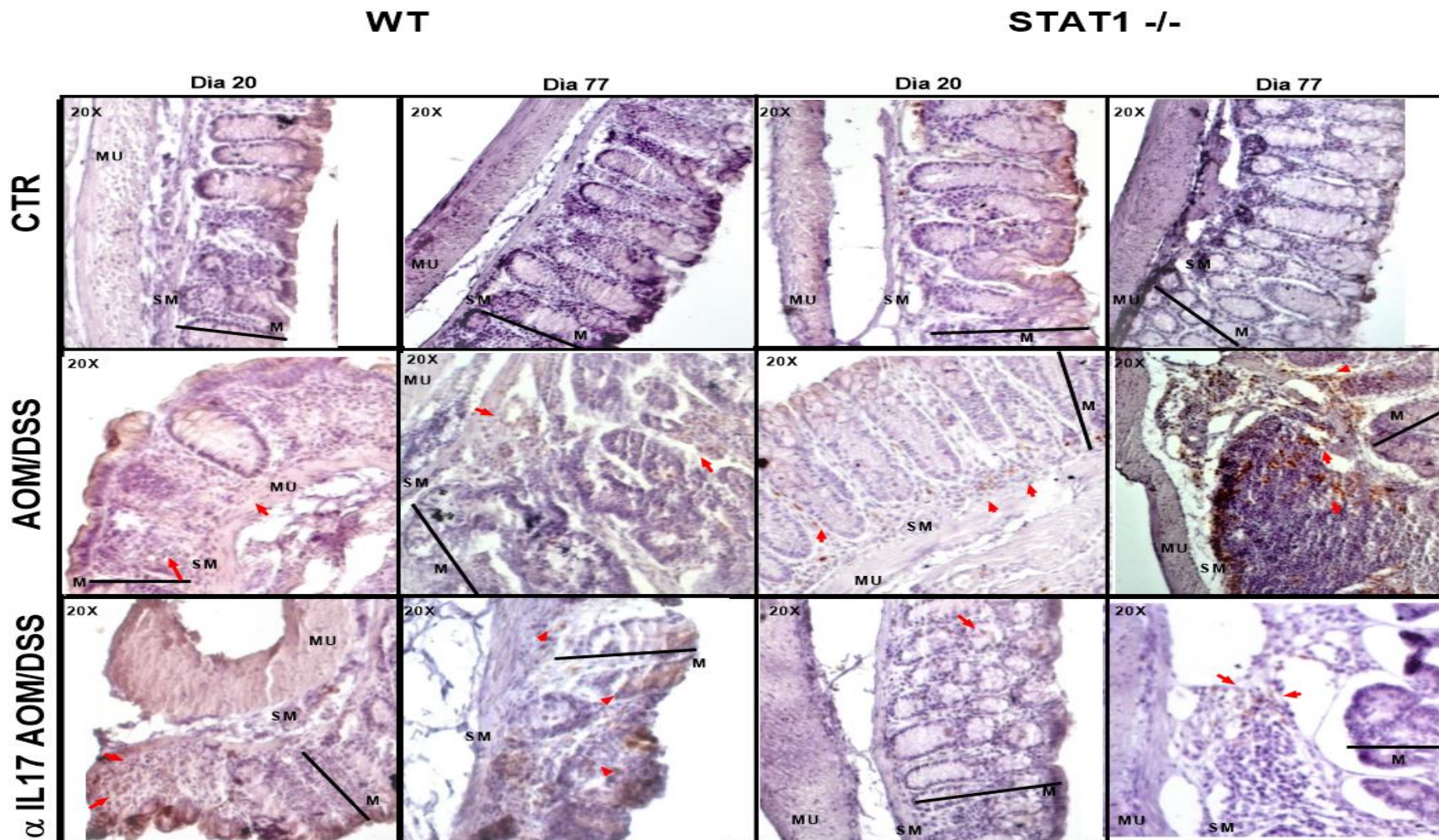


Figura 18. Inmunohistoquímica donde se muestra la expresión de Ly6G donde se muestra la expresión de Ly6G+ en CCR donde se tiñe de café. Se observa que el grupo STAT1-/- AOM/DSS presenta una mayor expresión en contraste con los grupos BALB/c. En la imagen se señalan las partes del intestino usando (M) mucosa, (SM) submucosa y la capa muscular (MU).

Se realizó un conteo celular de células Ly6G+ en etapas tempranas y tardías, donde se detectó una mayor expresión de neutrófilos Ly6G+ en el grupo STAT1^{-/-} AOM/DSS al día 20 en comparación con los grupos que se les inhibió IL17, mostrando así un aumento considerable de neutrófilos en las primeras etapas del desarrollo tumoral (figura 18).

Mientras que en etapas tardías hubo un aumento significativo de neutrófilos Ly6G+ (figura 18) en todos los grupos sometidos a tratamiento en comparación con los resultados obtenidos en el día 20, mostrando un aumento en los grupos STAT1^{-/-} en comparación con los grupos WT.

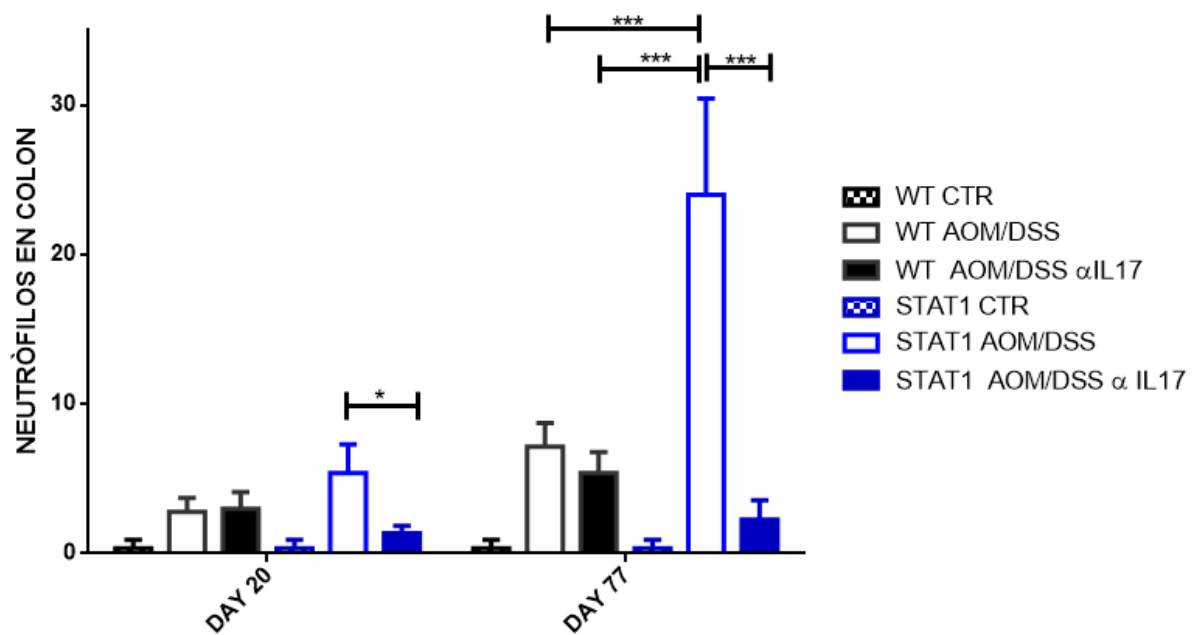


Figura 19. Análisis de células Ly6G+ en los grupos STAT1 AOM/DSS, STAT1^{-/-} AOM/DSS αIL17, WT AOM/DSS y WT AOM/DSS αIL17. Los datos corresponden a 5 animales por grupo y representa el promedio ±DS. . El análisis estadístico fue determinado utilizando una prueba de ANOVA con prueba de Tukey $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***) .

7.8. La neutralización de IL-17 en ratones deficientes en STAT1 disminuye el reclutamiento de células CD11b+Ly6C^{low}Ly6G⁺

Los precursores mieloides pueden diferenciarse en células granulocíticas dependiendo de la presencia o ausencia de factores de crecimiento (54), pueden diferenciarse en monocíticas (Mo-MDSC), definidos como CD11b⁺ Ly6C^{high} Ly6G⁻ y polimorfonucleares (PMN-MDSC), CD11b⁺ Ly6C^{low} Ly6G⁺ (42).

Al evaluar la distribución de las células CD11b⁺ Ly6C^{low} Ly6G⁺ a nivel de bazo se observó un incremento en la etapa temprana (día 20) del CAC en el grupo STAT1^{-/-} AOM/DSS, sugiriendo que la ausencia de STAT1^{-/-} en etapas tempranas favorece el desarrollo de esta población (figura 19), mismo efecto fue contrarrestado con la inhibición de IL17 recuperando así niveles semejantes con el grupo WT con tratamiento.

Con el análisis de citometría confirmamos que hubo una disminución en el reclutamiento de neutrófilos durante las primeras semanas del experimento en el grupo STAT1^{-/-} AOM/DSS que se le inhibió IL-17 en comparación con el grupo deficiente en STAT1 y que fue sometido a tratamiento.

El grupo STAT1^{-/-} αIL17 y WT AOM/DSS presentan un porcentaje de células CD11b+Ly6G⁺ similar, siendo el grupo STAT1^{-/-} AOM/DSS el que presenta un porcentaje mayor en etapas tempranas.

El análisis de citometría de flujo confirma una disminución en el reclutamiento de neutrófilos al inhibirse IL17. Al evaluar el porcentaje de células CD11b+Ly6G⁺ en etapas tardías de la inducción de cáncer, observamos un aumento en el reclutamiento en todos los grupos sometidos a tratamiento, siendo el grupo WT AOM/DSS el que presenta un mayor porcentaje de células CD11b+Ly6G⁺ y que al inhibirse IL17 este efecto se reduce llegando incluso al mismo porcentaje que el grupo control.

En el grupo STAT1^{-/-} por su parte a pesar de inhibirse IL17 observamos un mayor porcentaje de células CD11b+Ly6G⁺ en etapas tardías, en comparación con el grupo STAT1^{-/-} AOM/DSS e incluso WT αIL17 AOM/DSS.

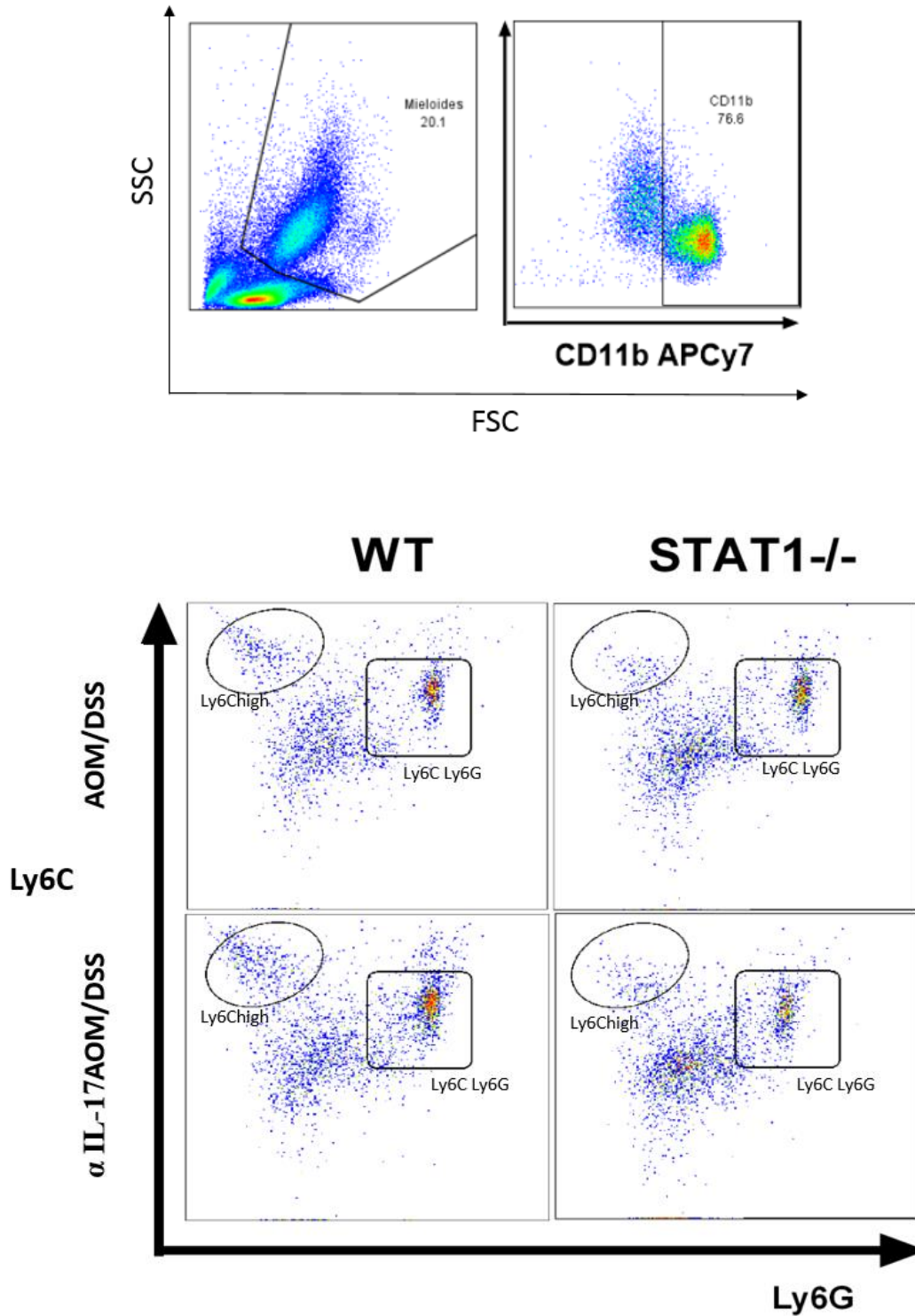


Figura 20. Estrategia de análisis. Se muestra la estrategia de análisis utilizada en las citometrías, donde se comparó granularidad contra tamaño para aislar a las células mieloides, después se seleccionó a las células que expresan el marcador CD11b y finalmente a los neutrófilos usando Ly6G/Ly6C para evaluar el porcentaje de células en bazo.

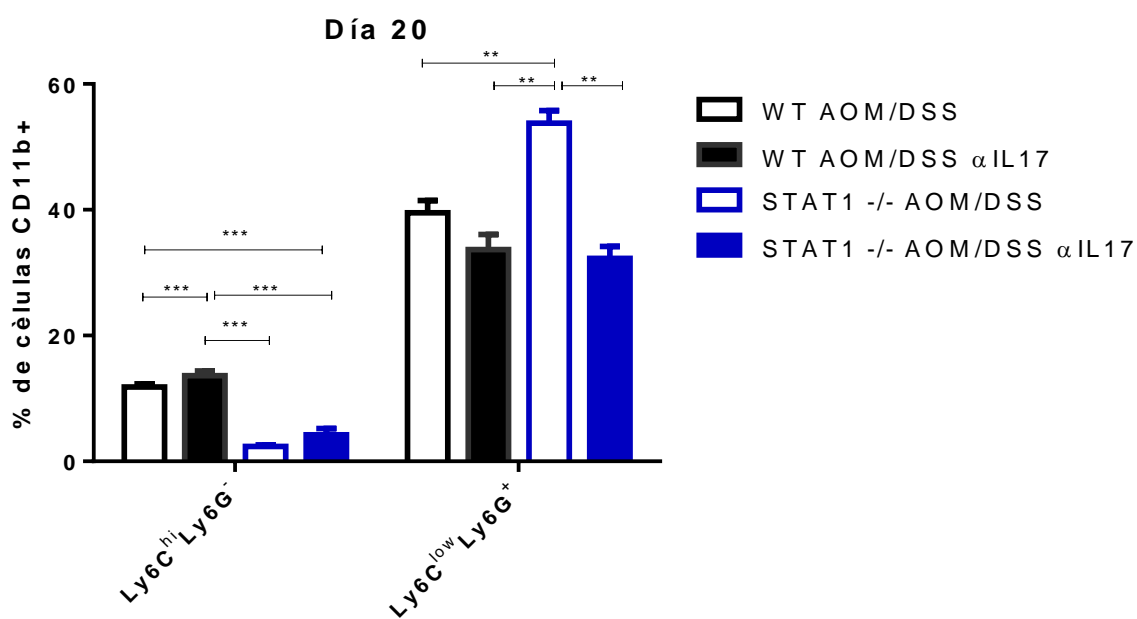


Figura 21. Porcentaje de células en bazo. En la presente imagen se muestra el porcentaje de células mieloides en el día 20, donde se observa que los neutrófilos marcados con CD11b+Ly6G+ se reducen al inhibirse IL 17. El análisis estadístico fue determinado utilizando una prueba de ANOVA con prueba de Tukey $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)).

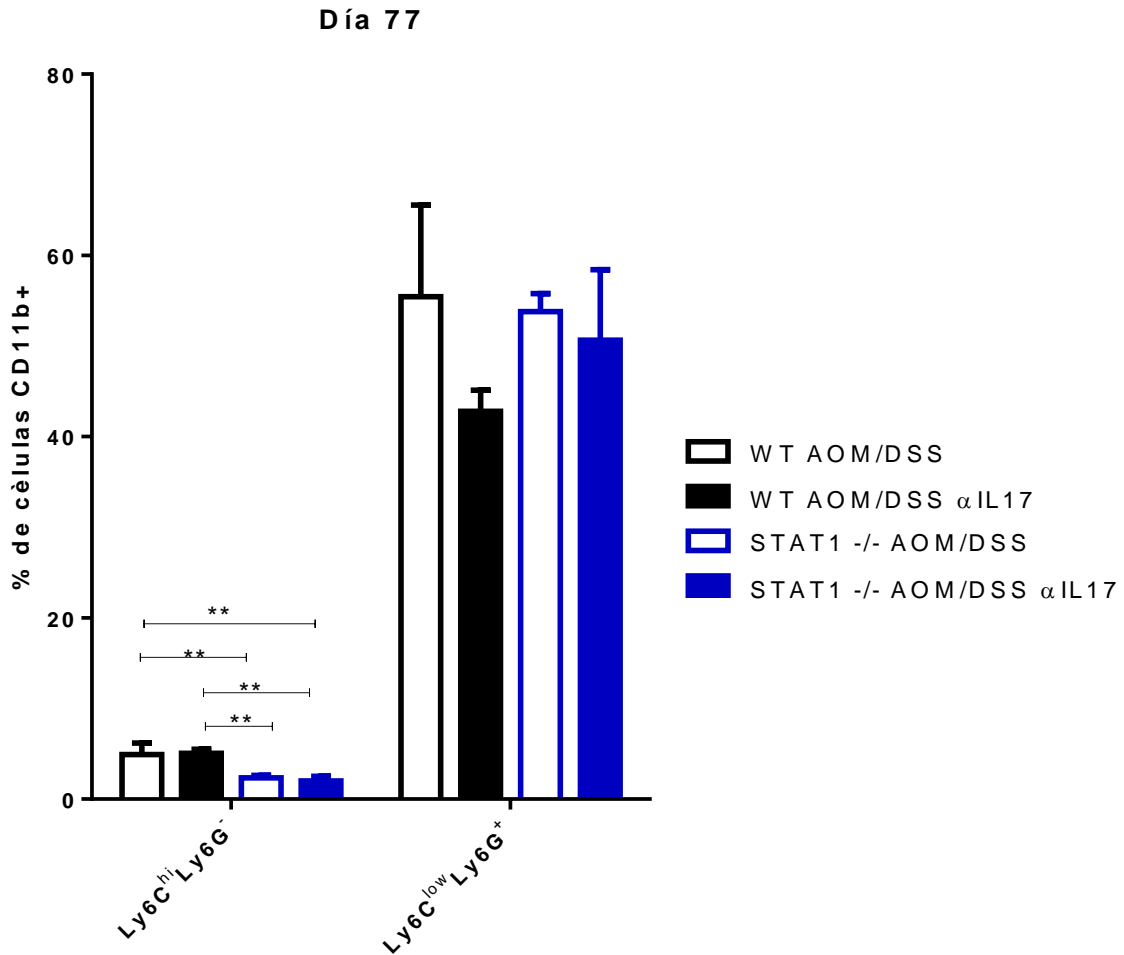


Figura 22. Porcentaje de células en bazo. En la presente imagen se muestra el porcentaje de células mieloides en el día 77 donde se observa que los neutrófilos marcados como CD11b+Ly6G^{high} se encuentran disminuidos en el grupo STAT1-/- AOM/DSS que se le inhibió IL17 en comparación con los demás grupos que recibieron tratamiento. El análisis estadístico fue determinado utilizando una prueba de ANOVA con prueba de Tukey $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), $P < 0.001$ (***)).

8. DISCUSIÓN

El cáncer de colon asociado a colitis (CAC) se ha asociado con varias vías de señalización que se encuentran desreguladas, principalmente aquellas que tienen que ver con el crecimiento celular, proliferación celular, apoptosis, etc.

Se sabe que ratones con delección específica de STAT1 en las células epiteliales intestinales son más susceptibles al CCR inducido por AOM-DSS, exhibiendo adenomas de mayor grado que los controles de tratados de manera similar (43).

En este trabajo utilizando el modelo de cáncer de colon asociado a colitis inducido por AOM/DSS se demostró que los animales con una deficiencia en STAT1 y que se le inhibe IL 17 desarrollan pocos tumores y de un tamaño menor a 2 mm en comparación con los ratones BALB/c. La disminución en el número y tamaño de tumores en los ratones STAT 1-/- que se le inhibió IL-17 se correlaciono con una menor frecuencia de células granulocíticas y de neutrófilos en el intestino usando la expresión del marcador Ly6G.

STAT3 ha sido vinculado a procesos de desarrollo tumoral. La STAT3 es una oncoproteína que se encuentra activa de manera constitutiva en cerca del 70 % de los tumores sólidos y hematológicos, incluidos el colorrectal (39). STAT1 es constitutivamente activo junto con STAT3 en leucemias y en tumores sólidos. Debido a que las actividades persistentes de STAT3 y STAT1 se encontraron juntas en muchas muestras de tumores investigadas, STAT3 puede contribuir a la oncogénesis en el epitelio del colon ejerciendo un efecto promotor sobre el ciclo celular (40).

Dado que la JAK puede desencadenar la fosforilación de tirosina tanto de STAT1 como de STAT3 y además STAT1 es un mediador central del interferón (IFN) de tipo I y de tipo II y que ambos IFN pueden activar STAT3 (38), se decidió evaluar a STAT3 ya que se ha encontrado que la disminución de la señalización de STAT3 provoca un aumento en la expresión de STAT1 y una reducción del crecimiento tumoral (32).

De acuerdo con nuestros hallazgos observamos una activación persistente de pSTAT3 a lo largo del tratamiento, especialmente en el grupo STAT1-/- AOM/DSS, que además presentaron más daño en comparación con el grupo WT y cuyo efecto fue revertido al inhibirse IL17. Se cree que STAT1 y STAT3 desempeñan funciones opuestas en la

tumorigénesis (38) y por lo tanto la deficiencia de STAT1 puede aumentar la activación de STAT3 y por lo tanto la tumorigénesis del colon.

La actividad de STAT3 también puede estar asociada con una mayor movilidad e invasividad celular. Se sabe que la activación de STAT3 pueda ocurrir antes de que las alteraciones histológicas del tejido intestinal sean detectables (40), como se determinó aquí, la fosforilación de STAT3 pese a que se encuentra activado durante todo el experimento, su expresión se encuentra aumentada desde etapas tempranas y aumenta a lo largo del desarrollo del cáncer, donde los ratones deficientes en STAT1 sometidos a tratamiento, presentan un aumento estadísticamente significativo en comparación con los ratones WT y cuyo activación decreció en ambos grupos al inhibir IL17.

Además se encontró que la actividad constitutiva de STAT3 era abundante en células cancerosas desdiferenciadas y linfocitos infiltrantes de muestras de CCR (40) en etapas tardías del desarrollo de cáncer, que se comprueba con la tinción inmunohistoquímica en la que en el grupo STAT1 -/- AOM/DSS hay mayor infiltrado de células pSTAT3+, desde las etapas tempranas, aumentando considerablemente hasta el desarrollo de tumores, hay evidencia que demuestra en células deficientes en STAT1 una activación de STAT3 mucho más fuerte en respuesta a IFN- γ y cuya proporción de expresión de STAT1 a STAT3 es un factor clave para regular el crecimiento celular y un predictor clínico en el cáncer colorrectal (38).

También es posible que los heterodímeros STAT1 / STAT3 interfieran con la inducción del gen diana STAT3 a través de la competencia del sitio de unión al ADN (55), lo que conduce a un crecimiento de CCR deficiente ya que STAT3 puede bloquear directamente la actividad de unión al ADN de STAT1 en células mieloides humanas, ciertas citocinas, como IL6, IL21 e IFN- γ , pueden activar tanto STAT1 como STAT3 en células normales (44).

La progresión del cáncer no se trata solo de la célula tumoral, sino también de otros factores involucrados, incluidas las células inmunitarias reclutadas por células cancerosas, sus factores proinflamatorios liberados (45). Como se informó anteriormente en ratones inducidos por STAT1 - / - CAC, la deficiencia de STAT1 aumentó significativamente la producción de IL-17A (32) e IL-17 promueve la activación de STAT3 en las células endoteliales para producir factores inflamatorios, que desempeñan funciones vitales en el

reclutamiento de neutrófilos (46). Los altos niveles de IL-17A pueden favorecer el reclutamiento de granulocitos en el sitio del colon que fue demostrado con la inmunohistoquímica de células Ly6G+ (45).

Además, se observó que en las citometrías ocurre una mayor acumulación de estas células en el bazo. En condiciones de cáncer y lesiones graves, los neutrófilos a menudo se asocian con la población granulocítica de células supresoras derivadas de mieloides (G-MDSC) (45), donde a los neutrófilos en ratones se reconocen como células CD11b + Ly6G + (47), donde en etapas tempranas del desarrollo del cáncer, el porcentaje de estas células aumenta significativamente en los ratones deficientes de STAT1 y cuyo valores se ven disminuidos al inhibir IL17, mientras que la sola deficiencia de STAT1 disminuye significativamente el porcentaje de células CD11b+Ly6C+ (población monocítica) en los grupos sometidos a tratamiento de cáncer, sin diferencia al inhibir IL17,

En etapas tardías el aumento de neutrófilos en bazo, aumenta en casi todos los grupos sometidos a tratamiento siendo el grupo WT AOM/DSS el que presenta un mayor aumento en estas células, sin diferencia estadísticamente significativa, al inhibirse IL17; mientras que los ratones deficientes en STAT1 se mantiene el porcentaje de neutrófilos comparado con el día 20, sin embargo, el grupo STAT1 α IL17 presenta un aumento de esta población en comparación con el día 20, que podemos explicar diciendo que IL17 fue inhibida en las primeras etapas del desarrollo de cáncer, sin embargo no es una inhibición total y definitiva.

Los PMN desempeñan un papel fundamental en la inhibición de la tumorigénesis de colon asociada a colitis al restringir el tamaño y el crecimiento del tumor (48). Sin embargo se encuentra un aumento significativo de todos los subconjuntos de leucocitos, especialmente neutrófilos, en ratones STAT1 KO (49).

El análisis del reclutamiento de neutrófilos en el tejido colónico se realizó mediante una inmunohistoquímica de Ly6G, en donde se observa un aumento estadísticamente significativo al día 20 de células granulocíticas en el grupo STAT1 α IL17 AOM/DS, en comparación con los ratones que se inhibió IL17 y donde el crecimiento tumoral se reduce notablemente. En etapas tardías del desarrollo tumoral, los ratones deficientes en STAT1 presentan un aumento de neutrófilos en comparación con las etapas tempranas y cuyo aumento es estadísticamente significativo comparado con los demás grupos experimentales al día 77. Sin embargo, los

grupos a los que se les inhibió IL17 no presentan un aumento significativo en comparación con etapas tempranas. Los neutrófilos asociados a tumores también pueden liberar otras citocinas proinflamatorias en el tumor (45), IL17 regulaba positivamente varios quimioatrayentes de neutrófilos en las células tumorales, lo que podría conducir a un circuito de retroalimentación positiva para reclutar más neutrófilos en el tumor (50), lo que podría explicar el aumento de neutrófilos en etapas avanzadas del cáncer.

Los neutrófilos, que acompañan a la inflamación crónica, participan en la creación de un entorno mutagénico capaz de iniciar y promover el desarrollo de tumores (51) y donde existen algunos factores proinflamatorios en el microambiente tumoral que prolongan el tiempo de supervivencia de los neutrófilos, como el interferón gamma ($IFN\gamma$). Si bien las células tumorales son capaces de secretar quimioatrayentes de neutrófilos, otras células en el microambiente del tumor también pueden contribuir al reclutamiento de neutrófilos. Por ejemplo, las células T helper tipo 17 (Th17) que infiltran el tumor y la IL-17 inducen la expresión de G-CSF, lo que conduce a la movilización de células mieloides inmaduras y al reclutamiento en el microambiente tumoral, mientras que la IL-17 secretada por las células Th17 inducen el reclutamiento de neutrófilos, las células Th17 pueden modular aún más la actividad de los neutrófilos a través de la secreción de $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ y GM-CS (52) y como ya se mencionó anteriormente, $IFN\gamma$ puede activar tanto STAT1 como STAT3 en células normales (44) y la inhibición de STAT1 aumenta la producción de IL-17 que a su vez va a promover la activación de STAT3 para producir factores inflamatorios que desempeñan funciones vitales en el reclutamiento de neutrófilos, se sabe que STAT3 sufre fosforilación activada por varias citocinas proinflamatorias, incluida la interleucina-17 y se ha demostrado que la actividad de STAT3 e IL-17 en las células tumorales podría actuar como un regulador de la progresión tumoral al mejorar la invasividad o promover la transición epitelio-mesenquimal (53) lo que podría ayudar a explicar que los ratones deficientes en STAT1 presenten mayor daño, una mayor fosforilación de STAT3 y un aumento en el reclutamiento de neutrófilos en el tejido colónico, mismos efectos que tras el bloqueo de IL17 se vieron disminuidos y en algunos casos casi restituidos a niveles expresados por el grupo control que no fueron sometidos a tratamiento y por ende no hay desarrollo del cáncer.

Hay estudios en cánceres colorrectales donde se encuentra la pérdida de expresión de STAT1 y está asociada con el crecimiento tumoral. STAT1 tiene dos caras en el cáncer humano, puede ser un supresor de tumores o una oncoproteína y por ende, su papel pronóstico en la supervivencia de pacientes con cáncer sigue siendo controvertido (54).

Como citocina proinflamatoria secretada por las células Th17, se ha reconocido que la IL17 desempeña un papel importante en la tumorigénesis, la angiogénesis, la metástasis, la resistencia inmunitaria y la actividad antitumoral (53) a través del reclutamiento de neutrófilos en el microambiente tumoral que juegan un papel pro tumoral a través de la formación de NET, la liberación de ROS, la secreción de citocinas y quimiocinas pro tumorales y la promoción de la inmunosupresión (45), se ha demostrado que los neutrófilos promueven directamente la tumorigénesis al causar inestabilidad genómica con la inducción de daño oxidativo del ADN (52).

En este estudio, establecimos que la deficiencia de STAT1 desregula el reclutamiento de células granulocíticas a través de IL-17 durante las primeras etapas del desarrollo del tumor y tras el bloqueo de IL-17 se previene el avance del tumor casi por completo, demostrando un vínculo entre la deficiencia de STAT1 y la IL-17 en el desarrollo de CAC. Considerando que la IL-17A se encuentra aumentada en la etapa de adenoma y su nivel permanece alto en la etapa de cáncer, un tratamiento que inhiba la expresión de la IL-17 junto con un agonista de STAT1 podría utilizarse como terapia contra CAC, sin embargo se requieren más estudios que demuestren la efectividad de este posible tratamiento contra el cáncer.

Esta investigación sirvió para la elaboración del artículo “*STAT1 Is Required for Decreasing Accumulation of Granulocytic Cells via IL-17 during Initial Steps of Colitis-Associated Cancer*” en la cual se colaboró.

9. CONCLUSIONES

- Los ratones deficientes en STAT1, sometidos a tratamiento con AOM/DSS y con inhibición de la IL-17 presentaron una reducción en los signos de la enfermedad, menor infiltrado de neutrófilos en el tejido intestinal, disminución en el porcentaje de células granulocíticas en bazo y una menor expresión de pSTAT3 que se asocia con un menor daño epitelial y menor crecimiento tumoral.
- La ausencia de STAT1 desregula el reclutamiento de células granulocíticas al aumentar la producción de la IL-17 que promueve el crecimiento tumoral a través de un mayor reclutamiento de células granulocíticas y neutrófilos, además de promover la activación de STAT3 en las primeras etapas del desarrollo tumoral, que junto a la inflamación crónica participan en la creación de un entorno mutagénico capaz de iniciar y promover el desarrollo de tumores.
- Tras el bloqueo de IL-17 se previene el avance del tumor casi por completo en deficiencia de STAT1.

10. LITERATURA CITADA

1. Globocan (2020). Cáncer en México [Internet]. *World Health Organization*. [citado el 25 de junio de 2021]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-fact-sheets.pdf>
2. Razi, S., Baradaran Noveiry, B., Keshavarz-Fathi, M., Rezaei, N. (2019). IL-17 and colorectal cancer: From carcinogenesis to treatment. *Cytokine*, 116, 7–12.
3. Rodríguez Hernández, N., Romero Pérez, T., López Prieto, ML., Cobas López Santos, CA., Martínez Carmona, Y. (2019). Nivel de conocimiento sobre exámenes diagnósticos para la detección precoz del cáncer colorrectal. *Rev cienc médicas Pinar Río*, 23(2), 286–94.
4. Miles, A., van Duijnhoven, F., McQueen, A., Oliphant, R. (2015). Colorectal cancer: Advances in prevention and early detection. *Biomed Res Int*. 2015, 518068.
5. Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, A., Cerrada, E., Rodriguez Yoldi, MJ. (2017). Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*, 18(1), 197.
6. Thanikachalam, K., Khan, G. (2019). Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients* [Internet]. 11(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/nu11010164>.
7. Ramírez, M. (2018) Factores involucrados en la diferenciación de macrófagos durante el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis en dependencia de STAT1. Tesis de licenciatura, UNAM, Tlanepantla de Baz, Edo. De México.
8. Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2101–2114.
9. Markowitz, SD., Bertagnolli, MM. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 361(25), 2449–60.
10. Morris, R., Kershaw, NJ., Babon, JJ.(2028). The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway: Cytokine Signaling via the JAK/STAT Pathway. *Protein Sci*, 27(12), 1984–2009.
11. Zhang, Y. & Liu, Z. (2017). STAT1 in cancer: friend or foe?. *Discovery Medicine*, 24(130), 19–29.

12. Varikuti, S., Oghumu S, Elbaz M, Volpedo G, Ahirwar DK, Alarcon PC, *et al.*(2017). STAT1 gene deficient mice develop accelerated breast cancer growth and metastasis which is reduced by IL-17 blockade. *Oncoimmunology*, 6(11), e1361088.
13. Bousoik, E., Montazeri Aliabadi, H. (2028). “¿conocemos a Jack” sobre JAK? Una mirada más cercana a la vía de señalización JAK / STAT. *Front Oncol* [Internet], Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2018.00287>.
14. Crnčec, I., Modak, M., Gordziel, C., Svinka, J., Scharf I, Moritsch, S., et al. (2018). STAT1 is a sex-specific tumor suppressor in colitis-associated colorectal cancer. *Mol Oncol*, 12(4), 514–28.
15. Kaler, P., Benjamin, Y., Owusu, Augenlicht Leonard, and Klampfe Lidija, (2014). “The Role of STAT1 for Crosstalk between Fibroblasts and Colon Cancer Cells”: *Front Oncol*, 4, 88.
16. Wu, D., Wu, P., Huang, Q., Liu, Y., Ye, J., Huang, J. (2013). Interleukin-17: a promoter in colorectal cancer progression. *Clin Dev Immunol*, 2013, 436307.
17. Song, Y., Yang, M., Zhang, H., Sun, Y., Tao, Y., Li, H., et al. (2020). IL-17 affects the progression, metastasis, and recurrence of laryngeal cancer via the inhibition of apoptosis through activation of the PI3K/AKT/FAS/FASL pathways. *J Immunol Res.*, 2020, 2953191.
18. Queiro-Silva, R. (2018). Rol de la interleucina-17 en otras enfermedades y comorbilidades. *Reumatol. clín.(Barc.)*, 28-34.
19. Zhao, J., Chen, X., Herjan, T. y Li, X. (2010). El papel de la interleucina-17 en el desarrollo y la progresión tumoral. *Revista de Medicina Experimental*, 217 (1).
20. Cui, G., Yang, H., Zhao, J., Yuan, A., Florholmen, J. (2015). Elevated proinflammatory cytokine IL-17A in the adjacent tissues along the adenoma-carcinoma sequence. *Pathol Oncol Res*, 21(1),139–46.
21. Asadzadeh, Z., Mohammadi, H., Safarzadeh, E., Hemmatzadeh, M., Mahdian-Shakib, A., Jadidi-Niaragh, F., ... y Baradaran, B (2017). La paradoja de las funciones de las células Th17 en la inmunidad tumoral. *Inmunología celular* , 322, 15-25.
22. Hyun, YS., Han, DS., Lee, AR., Eun, CS., Youn, J., Kim, H-Y. (2012). Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis*, 33(4), 931–6.

23. Grivennikov, SI. (2013). Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol*, 35(2), 229–44.
24. Ortiz, ML., Kumar, V., Martner, A., Mony, S., Donthireddy, L., Condamine, T., et al. (2015). Immature myeloid cells directly contribute to skin tumor development by recruiting IL-17-producing CD4+ T cells. *J Exp Med*, 212(3), 351–67.
25. Youn, J-I., Nagaraj, S., Collazo, M., Gabrilovich, DI. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*, 181(8), 5791–802.
26. Schmid, MC., Varner, JA. (2012). Myeloid cells in tumor inflammation. *Vasc Cell*. 4(1), 14.
27. Wang, Y., Ding, Y., Deng, Y., et al. (2020). Papel de las células supresoras derivadas de mieloides en la promoción e inmunoterapia del cáncer asociado a colitis. *Revista de inmunoterapia del cáncer*, 8, e000609.
28. Patel, S., Fu, S., Mastio, J., Domínguez, GA, Purohit, A., Kossenkov, A., Lin, C., Alicea-Torres, K., Sehgal, M., Nefedova, Y. , Zhou, J., Languino, LR, Clendenin, C., Vonderheide, RH, Mulligan, C., Nam, B., Hockstein, N., Masters, G., Guarino, M., Schug, ZT,... Gabrilovich , DI. (2018). Patrón único de migración y función de neutrófilos durante la progresión del tumor. *Nature immunology*.
29. Mócsai, A., Walzog, B., Lowell, CA. (2015). Intracellular signalling during neutrophil recruitment. *Cardiovasc Res*, 107(3), 373–85.
30. Burgos-Panadero, R., Lucantoni, F., Gamero-Sandemetrio, E., Cruz-Merino, L de la, Álvaro, T., Noguera, R. (2019). The tumour microenvironment as an integrated framework to understand cancer biology. *Cancer Lett*, 461, 112–22.
31. Villarino, Alejandro V et al. “STAT1-activating cytokines limit Th17 responses through both T-bet-dependent and -independent mechanisms.” *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) vol. 185,11 (2010): 6461-71.
32. Leon-Cabrera, S., Vázquez-Sandoval, A., Molina-Guzman, E., Delgado-Ramirez, Y., Delgado-Buenrostro, N. L., Callejas, B. E., Chirino, Y. I., Pérez-Plasencia, C., Rodríguez-Sosa, M., Olguín, J. E., Salinas, C., Satoskar, A. R., & Terrazas, L. I. (2018). Deficiency in STAT1 signaling predisposes gut inflammation and prompts colorectal cancer development. *Cancers*, 10(9), 341.



33. Parang, B., Barrett, CW., Williams, CS. (2016). AOM/DSS model of colitis-associated cancer. *Methods Mol Biol*, 1422, 297–307.
34. Zamorano-Ponce, E., Muñoz, P. L., Caamaño, P. R., & Romero, J. F. (2008). Un modelo experimental inducible en ratón para conducir estudios en quimioprevención y anticarcinogénesis. *Theoria*, 17(1), 71-86.
35. Laroui, H., Ingersoll, SA., Liu, HC., Baker, MT., Ayyadurai, S., Charania, MA, et al. (2012). Dextran sodium sulfate (DSS) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PLoS One*, 7(3), e32084.
36. Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., & Mori, H. (2003). Anovel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Science*, 94(11), 965–973.
37. De Robertis, M., Massi, E., Poeta, ML., Carotti, S., Morini, S., Cecchetelli, L., et al. (2011). The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog*, 10(1), 9.
38. Gujam, FJA., McMillan, DC., Edwards, J. (2016). The relationship between total and phosphorylated STAT1 and STAT3 tumour cell expression, components of tumour microenvironment and survival in patients with invasive ductal breast cancer. *Oncotarget*, 7(47), 77607–21.
39. Ortega, Ó., Ondo-Méndez, A., Garzón, R.(2017). STAT3 activation by hypoxia in in vitro models of cervix cancer and endothelial cells. *Biomedica*, 37(1), 119–30.
40. Corvinus, FM., Orth, C., Moriggl, R., Tsareva, SA., Wagner, S., Pfitzner, EB., et al. (2005). Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. *Neoplasia*, 7(6), 545–55.
41. Triner, D., Devenport, SN., Ramakrishnan, SK., Ma, X., Frieler, RA., Greenson, JK., et al. (2019). Neutrophils restrict tumor-associated Microbiota to reduce growth and invasion of colon tumors in mice. *Gastroenterology*, 156(5), 1467–82.
42. Sieminska, I., Baran, J. (2020). Myeloid-derived suppressor cells in colorectal cancer. *Front Immunol*, 11, 1526.

43. Flood, B., Manils, J., Nulty, C., Flis, E., Kenealy, S., Barber, G., *et al.* (2019). Caspase-11 regulates the tumour suppressor function of STAT1 in a murine model of colitis-associated carcinogenesis. *Oncogene*, 38(14), 2658–74.
44. Zhang, X., Zhang, W., Yuan, X., Fu, M., Qian, H., Xu, W. (2016). Neutrophils in cancer development and progression: Roles, mechanisms, and implications (Review). *Int J Oncol*, 49(3), 857–67.
45. Wu, L., Saxena, S., Awaji, M., Singh, RK. (2019). Tumor-associated neutrophils in cancer: Going pro. *Cancers (Basel)*, 11(4), 564.
46. Yuan, S., Zhang, S., Zhuang, Y., Zhang, H., Bai, J., Hou, Q. (2015). Interleukin-17 stimulates STAT3-mediated endothelial cell activation for neutrophil recruitment. *Cell Physiol Biochem*, 36(6), 2340–56.
47. Fridlender, Z. G., & Albelda, S. M. (2012). Tumor-associated neutrophils: friend or foe?. *Carcinogenesis*, 33(5), 949–955
48. Triner, D., & Shah, Y. M. (2019). Hypoxic Regulation of Neutrophils in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4189.
49. Jung, SR., Ashhurst, TM., West, PK., Viengkhou, B., King, NJC., Campbell, IL, *et al.* (2020). Contribution of STAT1 to innate and adaptive immunity during type I interferon-mediated lethal virus infection. *PLoS Pathog*, 16(4), e1008525.
50. Li, T-J., Jiang, Y-M., Hu, Y-F., Huang, L., Yu, J., Zhao, L-Y, *et al.* (2017). Interleukin-17-producing neutrophils link inflammatory stimuli to disease progression by promoting angiogenesis in gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 23(6), 1575–85.
51. Hagerling, C., Werb, Z. (2016). Neutrophils: Critical components in experimental animal models of cancer. *Semin Immunol*, 28(2), 197–204.
52. Sionov, RV., Fridlender, ZG., Granot, Z. (2015). The multifaceted roles neutrophils play in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron*, 8(3), 125–58.
53. Chen, X-K., Gu, C-L., Fan, J-Q., Zhang, X-M. (2020). P-STAT3 and IL-17 in tumor tissues enhances the prognostic value of CEA and CA125 in patients with lung adenocarcinoma. *Biomed Pharmacother*, 125(109871), 109871.
54. Wu, L., Saxena, S., Singh, RK. (2020). Neutrophils in the tumor microenvironment. *Adv Exp Med Biol*, 1224,1–20.

55. Nivarthi, H., Gordziel, C., Themanns, M., Kramer, N., Eberl, M., Rabe, B, et al. (2016). The ratio of STAT1 to STAT3 expression is a determinant of colorectal cancer growth. *Oncotarget*, 7(32), 51096-106.

Article

STAT1 Is Required for Decreasing Accumulation of Granulocytic Cells via IL-17 during Initial Steps of Colitis-Associated Cancer

Yael Delgado-Ramirez ¹, Itzel Baltazar-Perez ¹, Yamileth Martinez ¹, Blanca E. Callejas ¹, Itzel Medina-Andrade ^{1,2}, Jonadab E. Olguín ^{1,2}, Norma L. Delgado-Buenrostro ¹, Yolanda I. Chirino ¹ , Luis I. Terrazas ^{1,2} and Sonia Leon-Cabrera ^{1,3,*} 

¹ Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, Edo. De México, Mexico; sonr_sanjlv@hotmail.com (Y.D.-R.); itzel.bp.050997@gmail.com (I.B.-P.); stat1kowitz@gmail.com (Y.M.); aletse_bianca@hotmail.com (B.E.C.); itzelmedina.andrade@gmail.com (I.M.-A.); je.olguin@iztacala.unam.mx (J.E.O.); nlbuenrostro@gmail.com (N.L.D.-B.); irasemachirino@gmail.com (Y.I.C.); literrazas@unam.mx (L.I.T.)

² Laboratorio Nacional en Salud, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, Edo. De México, Mexico

³ Carrera de Médico Cirujano, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla 54090, Edo. De México, Mexico

* Correspondence: soleonca@comunidad.unam.mx; Tel: +52-55-5623-1138



Citation: Delgado-Ramirez, Y.; Baltazar-Perez, I.; Martinez, Y.; Callejas, B.E.; Medina-Andrade, I.; Olguín, J.E.; Delgado-Buenrostro, N.L.; Chirino, Y.I.; Terrazas, L.I.; Leon-Cabrera, S. STAT1 Is Required for Decreasing Accumulation of Granulocytic Cells via IL-17 during Initial Steps of Colitis-Associated Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7695. <https://doi.org/10.3390/ijms22147695>

Academic Editor: Luigi Racioppi

Received: 15 June 2021

Accepted: 16 July 2021

Published: 19 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) acts as a tumor suppressor molecule in colitis-associated colorectal cancer (CAC), particularly during the very early stages, modulating immune responses and controlling mechanisms such as apoptosis and cell proliferation. Previously, using an experimental model of CAC, we reported increased intestinal cell proliferation and faster tumor development, which were consistent with more signs of disease and damage, and reduced survival in STAT1^{-/-} mice, compared with WT counterparts. However, the mechanisms through which STAT1 might prevent colorectal cancer progression preceded by chronic inflammation are still unclear. Here, we demonstrate that increased tumorigenicity related to STAT1 deficiency could be suppressed by IL-17 neutralization. The blockade of IL-17 in STAT1^{-/-} mice reduced the accumulation of CD11b+Ly6C^{low}Ly6G+ cells resembling granulocytic myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in both spleen and circulation. Additionally, IL-17 blockade reduced the recruitment of neutrophils into intestinal tissue, the expression and production of inflammatory cytokines, and the expression of intestinal STAT3. In addition, the anti-IL-17 treatment also reduced the expression of Arginase-1 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the colon, both associated with the main suppressive activity of MDSCs. Thus, a lack of STAT1 signaling induces a significant change in the colonic microenvironment that supports inflammation and tumor formation. Anti-IL-17 treatment throughout the initial stages of CAC related to STAT1 deficiency abrogates the tumor formation possibly caused by myeloid cells.

Keywords: colitis-associated cancer; STAT1; IL-17; MDSCs

1. Introduction

Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) is part of the Janus kinase (JAK/STAT) signaling pathway and mediates important events associated with mucosal homeostasis, intestinal immune function, and cancer progression. Many lines of evidence suggest that STAT1 acts as a tumor suppressor molecule in various malignancies [1,2], prompting antiproliferative and proapoptotic responses and enhancing antitumor immunity [2].

Colitis-associated colorectal cancer (CAC) frequently develops in subjects with inflammatory bowel diseases (IBDs), such as ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease