



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Factores involucrados en la diferenciación de
macrófagos durante el desarrollo del cáncer de colon
asociado a colitis en dependencia de STAT1

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

MEGAN ZAIRE RAMIREZ MEDINA

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. SONIA ANDREA LEÓN CABRERA



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA EDO. DE MÉXICO., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



“Amo a aquellos capaces de sonreír en mitad de los problemas”.

DA VINCI

“Nada resulta más insoportable que tener que admitirse a uno mismo los propios errores”.

BETHOVEN

Nada en este mundo debe ser temido... solo entendido. Ahora es el momento de comprender más, para que podamos temer menos.

MARIE CURIE



AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se llevó a cabo en el laboratorio 4-8 de Inmunoparasitología de la unidad de Biomedicina (UBIMED) de la Fes Iztacala, UNAM.

A la Universidad Autónoma de México, FES- Iztacala, por permitirme ser parte de esta gran casa, por dejarme crecer personal y profesionalmente como bióloga y así poder cumplir uno de mis más grandes sueños.

Al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdez por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y por su apoyo.

A mi directora y de Tesis la Dra. Sonia Andrea León Cabrera por haberme permitido trabajar con usted, por el apoyo, la confianza, la ayuda y la paciencia, durante todo este proceso, sin usted no hubiese logrado completar con éxito este trabajo.

A la Dra. Yadira Ledesma Soto por tu comprensión y consejos, además de siempre estar al pendiente de nosotros.

A mis compañeros de laboratorio Yael, Lesly, Aramando, Emmanuel, Ilse, Ángel, Blanca, Sandy, Diana porque siempre que tenía una duda estaban ahí para mí, por su apoyo y su gran compañía.

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

Esta tesis fue financiada por Proyecto PAPIIT RA204218 y por el Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para Favorecer Grupos de Investigación 2016 FESI-DIP-PAPCA 2016-2

Dedicatorias

A muy queridos padres Verónica y Jesús, porque han sido mi inspiración siendo los compañeros más incondicionales durante todo este tiempo, ya que sin su apoyo y comprensión nada de esto podría ser posible, porque a pesar de no estar de acuerdo me han dejado ser yo misma, seguir mis propios ideales y no dejarme abandonar mis sueños, porque este logro no solo es mío también es de ustedes. LOS AMO

A mi hermana Jeny que a pesar de estar lejos sigues siendo parte de mis logros porque siempre has sido un gran apoyo para no caer y más que una hermana has sido una amiga para mí.

A Xchel gracias ya que te has vuelto tan importantes en mi vida y una de mis más grandes inspiraciones, por estar a mi lado en las buenas y en las malas, aunque no siempre estemos de acuerdo, porque siempre me impulsa a seguir, me has enseñado que por ningún motivo puedes rendirte. No me queda más que agradecerte por hacer que a tu lado todo sea mejor.

A toda mi familia en general, por ser un gran apoyo y me han mostrados su cariño. Especialmente mi abuelita Celia y Christian.

A mis amigos que más que amigos se volvieron cómplices, por los viajes, las aventuras, las borracheras y por todo lo que nos falta por vivir David, Omarcito, Hugo, Ivette, Ada, Nancy, Kenya. Los quiero.

A mis amigos de la carrera sin ustedes no hubiese sido lo mismo gracias por los buenos y los malos momentos, Viry, Beto, Itzel Bravo, Scarlett, Charly, Ali, Ali Tlahutzin, Itzia, Agus, Ángel, Ilse, Itzel Bp, Britz, Jatziri, por los que siguen en mi vida y los que ya no aun así los quiero. Fueron parte importante en este camino y a los que me faltan gracias.

Por último, pero no menos importante a ustedes chicas que hemos estado en lo bueno, lo malo y lo feo del laboratorio, agradezco haber llegado por casualidad, porque se han vuelto mis amigas, mis confidentes, mis cómplices y por todo el apoyo que me han brindado, aun que nuestros caminos se separen siempre estarán conmigo las quiero mucho Lesly y Yael.

ÍNDICE

Resumen.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
1.- GENERALIDADES.....	5
1.1.-Cáncer de colon y recto	5
1.2.-Enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal	7
1.2.1.-Cáncer e inflamación.....	7
2.-Los Macrófagos y cáncer colorrectal.	8
2.1.-Macrófagos.....	8
2.1.1.-Macrófagos clásicamente activados o M1	9
2.1.2.- Macrófagos alternativamente activados o M2	9
2.2.-Macrófagos Asociados a Tumores (TAM's)	10
2.3.-Macrófagos Asociados a Tumores en el Cáncer Colorrectal.....	12
3.-Vía JAK / STAT.....	13
3.1.- STAT1 en la inflamación y el cáncer colorrectal.....	14
3.2.-STAT1 y su relación con los TAM's	16
4.-HIPOTESIS	17
4.1.-Objetivo general:	17
4.1.2.-Objetivos específicos:.....	17
5.-MATERIALES Y METODOS.....	18
5.1.-Material Biológico	18
5.2.-Inducción del cáncer experimental	18
5.3.-Porcentaje de peso corporal y DAI de los ratones	18
5.4.-Obtención de macerados de tumores de etapa temprana y tardía... ..	19
5.5.-Diferenciación de macrófagos a partir de células de la médula ósea.	20
5.6.-Administración de los diferentes estímulos	20
5.7.-Análisis por citometría de flujo.....	21
5.8.- Extracción de RNAm y RT-PCR.....	21

5.9.-Determinación de nitritos en los sobrenadantes.....	23
5.10.-Análisis estadístico.....	23
6.-Resultados	24
6.1.-Inducción del cáncer de colon asociado a colitis.....	24
6.2.-Análisis del índice de daño de la enfermedad (DAI) durante el CAC	26
6.3.-Obtención de tumores de etapas temprana (TE) y tardías (TA) del desarrollo tumoral.	27
6.4.-Cuantificación e integridad de las proteínas en los macerados tumorales.	28
6.5.-Diferenciación y estimulación de células de la médula ósea (CMO).30	
6.6.-Macrófagos silvestres estimulados con macerados tumorales de etapas tempranas y tardías.....	31
6.7.-Determinación de la producción de Óxido Nítrico en los sobrenadantes de los cultivos.	34
6.8.-Evaluación de cambios en la expresión de marcadores asociados a macrófagos M1 o M2 en respuesta a los diferentes estímulos, en células diferenciadas a partir de medula ósea de animales WT.	36
6.9.-El estímulo con macerados tumorales altera la expresión de TNF- α en los macrófagos.....	41
6.10.-Macrófagos STAT1-/- estimulados con macerados tumorales de etapas tempranas y tardías.....	42
6.10.1.-Evaluación de cambios en la expresión de marcadores asociados a macrófagos M1 o M2 en respuesta a los diferentes estímulos, en células diferenciadas a partir de medula ósea de animales deficientes en STAT1 (STAT1-/-).....	43
Discusión.....	48
Conclusión	51
Literatura citada.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Número estimado de muertes para ambos sexos a nivel mundial por cada 100000 habitantes; (GLOBOCAN; 2018)</i>	5
Figura 2: <i>Número estimado de muertes en hombres a nivel mundial por cada 100 000 habitantes; (GLOBOCAN; 2018).</i>	6
Figura 3: <i>Número estimado de muertes en mujeres a nivel mundial por cada 100 000 habitantes; (GLOBOCAN; 2018).</i>	6
Figura 4: <i>La polarización fenotípica de los macrófagos en el microambiente tumoral.</i>	11
Figura 5: <i>Vía de señalización de las JAK/STAT</i>	14
Figura 6: <i>Cambios en el peso corporal expresado en porcentaje respecto al peso inicial, a lo largo del tratamiento (día 40 etapa temprana (TE) y día 68 etapa tardía (TA))</i>	25
Figura 7: <i>Índice de daño de la enfermedad DAI</i>	26
Figura 8: <i>Imagen representativa del colon durante el sacrificio en etapas tempranas (TE) y tardías (TA)</i>	27
Figura 9: <i>Gel de integridad de proteínas</i>	29
Figura 10: <i>Diferenciación de células de médula ósea (CMO) a Macrófagos con Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF).</i>	30
Figura 11: <i>Células diferenciadas a macrófagos estimuladas de ratones provenientes de WT (Balb/c), con los diferentes grupos control y los extractos de tumores tanto de WT y STAT1-/-</i>	33
Figura 13: <i>Análisis por citometría de flujo de macrófagos diferenciados a partir de células de médula ósea (CMO) y estimuladas</i>	37
Figura 15: <i>Análisis de la expresión de marcadores asociados a macrófagos M1 y M2 en los macrófagos que recibieron los diferentes estímulos</i>	41
Figura 16: <i>Células de médula ósea de ratones STAT1-/- cultivadas con M-CSF</i>	42
Figura 17: <i>Análisis por citometría de flujo de macrófagos diferenciados a partir de células de médula ósea (CMO) provenientes de ratones STAT1-/- y estimuladas</i>	44
Figura 18: <i>Análisis por citometría de flujo de células de médula ósea (CMO) provenientes de ratones STAT1-/- diferenciadas y estimuladas</i>	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tabla de cuantificación de proteínas por el método de Lowry.....	19
Tabla 2: tabla de los grupos de células diferenciadas con los estímulos y sus concentraciones.....	20
Tabla 3: Condiciones utilizadas para procesar muestras mediante PCR.....	22
Tabla 4: Secuencias de los primers utilizados para el gen constitutivo (GAPDH), genes de interés (iNOS, TNF- α , Arginasa-1, Fizz-1) y genotipo de STAT1. Temperaturas de alineación (Tm) y Tamaño del producto (pb).....	22

Resumen

El cáncer colorrectal es la tercera causa principal de muerte por cáncer en México y el tercero más frecuente dentro de la patología oncológica en la población general. Las enfermedades inflamatorias intestinales tales como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de colon asociado a colitis (CAC) la respuesta inflamatoria juega un papel importante en la tumorigénesis.

Los macrófagos asociados a tumores (TAM's) son el principal componente de los infiltrados leucocitarios en el estroma de varios tumores y son reguladores clave entre la inflamación y el cáncer. Los macrófagos residentes de tejido circundante son reclutados dentro y alrededor del tumor mediante la secreción de moléculas quimio-atrayentes y factores de crecimiento derivados de las células tumorales. Además, los tumores pueden favorecer la infiltración de monocitos circulantes al tejido y promover su maduración hacia TAM's. Los macrófagos derivados de monocitos y los macrófagos residentes de tejido pueden coexistir dentro del estroma tumoral lo que resalta la importante interacción entre las células tumorales y las no tumorales.

El transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT1), señala la acción de varias citocinas, regula la expresión de genes implicados en la división celular y la apoptosis y participa en la movilización y activación de los monocitos circulantes que contribuyen a la acumulación de TAM's durante el cáncer. En el laboratorio, usando un modelo experimental de cáncer de colon asociado a colitis (CAC), se demostró que el desarrollo tumoral en animales deficientes en STAT1 (STAT1^{-/-}) es mucho más rápido y extenso, y se encuentra acompañado de un infiltrado importante de células mieloides en comparación con el encontrado en animales silvestres (WT), sugiriendo que STAT1 actúa como una molécula supresora de tumores durante el cáncer colorrectal. El hecho de que los tumores se desarrollen de manera más rápida en deficiencia de STAT1, sugiere que el microambiente tumoral es distinto y que puede ser propicio para favorecer el crecimiento de estos. Por lo tanto, en este trabajo se estudió si macerados tumorales obtenidos de diferentes etapas dentro del crecimiento tumoral de ratones WT o STAT1^{-/-} podrían influir en la diferenciación de los macrófagos hacia fenotipos M1 o M2. Para ello, se obtuvieron células de médula ósea (CMO) las cuales se diferenciaron *in vitro* a macrófagos con M-CSF. Posteriormente estos macrófagos fueron estimulados con LPS o LPS/IFN γ como control positivo de diferenciación a macrófagos clásicos, o con las citocinas IL-4/IL-13 como control positivo para macrófagos alternativos. Para analizar la interacción entre las células tumorales y los macrófagos, se obtuvieron macerados de tumores de etapas tempranas y

tardías de desarrollo y se analizaron cambios en la producción de óxido nítrico en los sobrenadantes de los cultivos, alteraciones en la expresión de los marcadores de superficie CD11b, F4/80 y PDL-2, así como la expresión de los genes para el óxido nítrico sintasa (iNOS), TNF- α , Arginasa-1 y FIZZ1. Se determinó que los macerados tumorales no afectaron la proliferación ni la producción de NO en la diferenciación de las células en presencia o no de los estímulos positivos. Se estableció que macerados obtenidos de tumores provenientes de animales STAT1^{-/-} en etapas avanzadas de desarrollo, favorecen un aumento en la expresión del marcador PDL-2 relacionándolo con un fenotipo alternativo. Por el contrario, la expresión de Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α) (relacionada con la activación clásica) se vio disminuida mientras que la de Resistin like alpha (FIZZ1) (relacionada con la activación alternativa) se vio favorecida en los macrófagos estimulados con macerados de tumores desarrollados en animales WT.

Estos resultados indican que los tumores WT o STAT1^{-/-} interactúan de manera directa con los macrófagos e influyen de manera diferente en la diferenciación de estas células. Esto podría tener implicaciones importantes en el inicio y/o la progresión tumoral.

INTRODUCCIÓN

El cáncer colorrectal es la tercera causa principal de muerte por cáncer en México y el tercero más frecuente dentro de la patología oncológica en la población general (GLOBOCAN; 2018). A pesar de ser una neoplasia frecuente en pacientes de edad avanzada con una media de diagnóstico a los 50.8 años, cada día se detectan casos en gente más joven (Sánchez *et al.*, 2008). Las enfermedades inflamatorias intestinales tales como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de colon (Tao *et al.*, 2012). Estos padecimientos se caracterizan por una respuesta inflamatoria exacerbada y prolongada en el intestino. Estudios epidemiológicos indican que el uso de fármacos antiinflamatorios puede prevenir o retrasar el desarrollo de cáncer sugiriendo que la respuesta inflamatoria juega un papel importante en la tumorigénesis (Rostom A. *et al.*, 2007).

Los cambios celulares ocurren bajo diferentes circunstancias, lo cual contribuye a la aparición de desarrollo de fenómenos que dan como resultado la enfermedad neoplásica presente en el micro ambiente tumoral, el cual está constituido no solo por células malignas, si no también encontramos, células residentes como células estromales y células de linaje leucocitario, encontrando infiltrados como los macrófagos, neutrófilos, linfocitos y mastocitos (Valdivia *et al.*, 2011). Los macrófagos asociados a tumores (TAM's), son células del sistema inmune que se encuentran cerca o dentro de las masas tumorales y juegan un papel importante en el inicio o desarrollo de la progresión tumoral ya que pueden suprimir el sistema inmunitario y estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos provocando así el crecimiento del tumor. Los TAM's son derivados de los monocitos circulantes o los macrófagos tisulares residentes, que constituyen el mayor infiltrado leucocitario encontrado dentro del estroma de muchos tipos de tumores. (Yan-Cun Liu, *et al.*, 2014). Los TAM's interactúan con una amplia gama de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas en el microambiente tumoral, los cuales son importantes para su diferenciación a los diferentes fenotipos que pueden realizar funciones según el tipo de tumor con el que están asociados. Los macrófagos asociados a tumores, presentan diferentes fenotipos dentro de las cuales se encuentran los M1, los cuales favorecen la respuesta inflamatoria, o bien pueden diferenciarse en fenotipos de activación alternativa como los M2 que participan en la reparación de tejidos con una función anti inflamatoria. En respuesta a diferentes señales del ambiente tumoral (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , M-CSF) contribuyendo al desarrollo del tumor y su progresión (Wenjuan., *et al.*, 2015). Los TAM's a menudo se reportan asociados a un fenotipo M2, sin embargo, se ha reportado que los factores secretados de las células tumorales no inducía una respuesta completa M1 o M2 de macrófagos, sino que los TAM's pueden presentar un fenotipo "mixto" M1 / M2 (Edin *et al.*, 2013).

Entender los mecanismos que dirigen la activación y la diferenciación de los macrófagos durante el desarrollo tumoral proporcionará bases para desarrollar mejores estrategias terapéuticas contra el cáncer (Solís *et al.*, 2015).

La familia de proteínas STAT, son a la vez transductores de señal y factores de transcripción. Se ha descrito que la activación aberrante de ciertas proteínas STAT, en particular STAT1, STAT3 y STAT5, está asociada con muchos cánceres humanos (Bousoik *et al.*; 2018). Las proteínas STAT son activadas diferencialmente de una manera dependiente del contexto en respuesta a factores de crecimiento, citocinas u otros ligandos polipeptídicos. Tienen papeles importantes en procesos fundamentales, incluyendo proliferación, desarrollo, diferenciación, inflamación y apoptosis. La activación de STAT's se inicia por la fosforilación sobre un residuo crítico de tirosina (Khandaker *et al.*, 2008).

El transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT1) se encarga de regular la expresión de los genes implicados en la división celular y la apoptosis, siendo importante para el desarrollo de la respuesta Th1 y la activación clásica del macrófago mediando la respuesta del IFN- γ (Becerra, 2013). Evidencias recientes han mostrado que STAT1 puede participar de manera importante en la movilización y activación de los monocitos circulantes que contribuyen a la acumulación de TAM's durante el cáncer (Van *et al.*, 2014).

Reportes previos en el laboratorio, usando un modelo experimental de cáncer de colon asociado a colitis, han demostrado que el desarrollo tumoral (denotado por un mayor número y tamaño de adenocarcinomas) en animales deficientes en STAT1 es mucho más rápido y extenso, y se encuentra acompañado de un infiltrado importante de macrófagos, en comparación con el encontrado en animales silvestres (BALB/c). Esta información sugiere que la ausencia de STAT1 podría estar asociada con un menor reclutamiento de macrófagos supresores de tumores y por lo tanto un mayor desarrollo de adenocarcinomas colorrectales esto se puede observar en los trabajos que aún están en proceso (León-Cabrera *et al.*, 2018).

Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales STAT1 participa en el reclutamiento y diferenciación de TAM's durante el desarrollo del cáncer de colon son desconocidos.

1.- GENERALIDADES

1.1.-Cáncer de colon y recto

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercero más común como neoplasia diagnosticada y la tercera causa principal de muerte por cáncer en el mundo (**Figura 1**), representando alrededor de 1,8 millones de casos nuevos y 881 000 muertes en 2018. (GLOBOCAN; 2018) donde en este mismo año fue el cuarto cáncer más común en los hombres en el mundo con 746,000 casos, representando el 10.8% del total de tumores malignos, y el segundo más común en mujeres con 614,000 casos, correspondiendo a un 9.2% del total en el mundo (American Society of Clinical Oncology 2005-2018 (ASCO).). Cabe mencionar que casi el 55% de los casos de CCR ocurren en las regiones más desarrolladas. (Sánchez-Barriga J. J., 2016), con respecto a las muertes por cáncer colorrectal (CCR) se presentan con 484,224 casos para hombres (**Figura 2**) y para mujeres 396,568 (**Figura 3**); sin embargo este fenómeno se encuentra principalmente en las regiones más desarrolladas (GLOBOCAN; 2018).

A pesar de ser una neoplasia frecuente en pacientes de edad avanzada con una media de diagnóstico a los 50.8 años, cada día se detectan casos en gente más joven, de ahí la importancia de realizar un diagnóstico oportuno, lo que representa un gran reto en el conocimiento de la patología y actualización en el manejo adecuado, con la finalidad de aumentar la sobrevivida y mejorar, en lo posible, la calidad de vida. (Sánchez *et al.*, 2008).

Número estimado de muertes en todo el mundo ; ambos sexos, de todas las edades para 2018

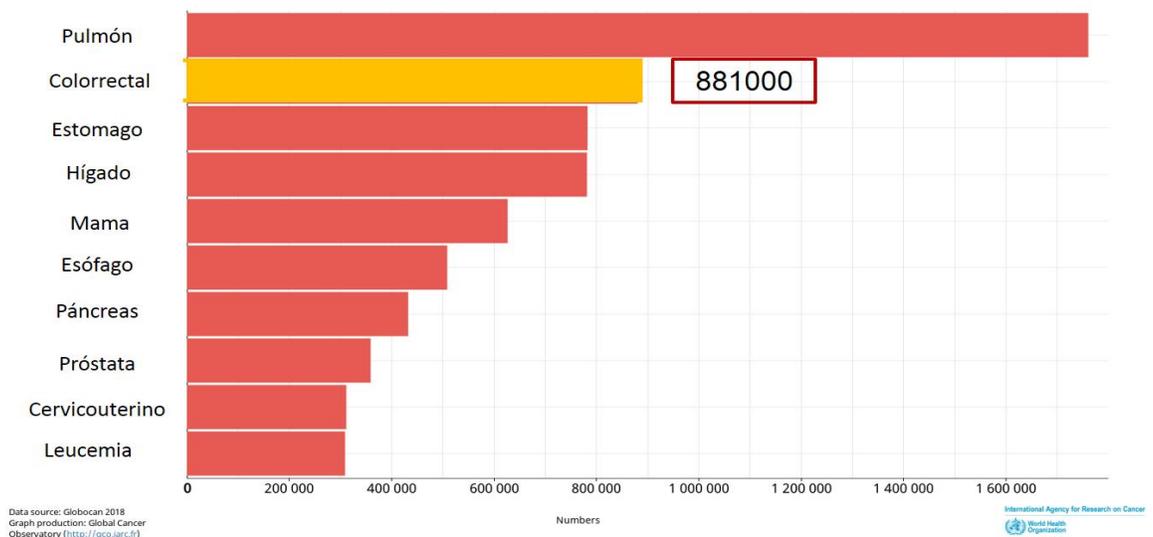


Figura 1: Número estimado de muertes para ambos sexos a nivel mundial por cada 100000 habitantes; (GLOBOCAN; 2018)

Número estimado de muertes en todo el mundo ; Hombres, de todas las edades para 2018

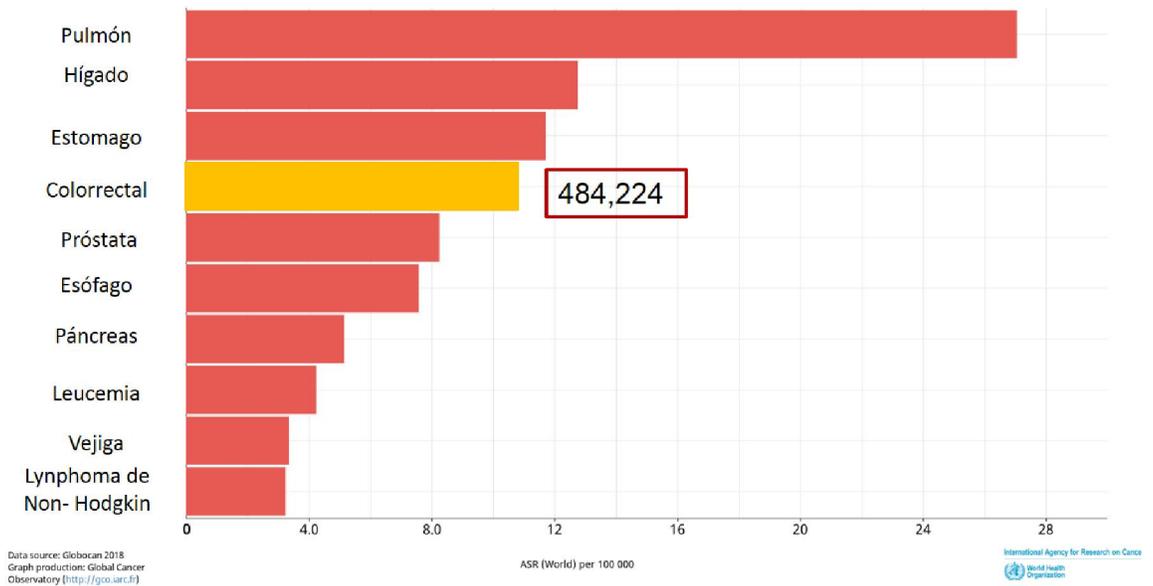


Figura 2: Número estimado de muertes en hombres a nivel mundial por cada 100 000 habitantes; (GLOBOCAN; 2018).

Número estimado de muertes en todo el mundo ; Mujeres de todas las edades, para 2018

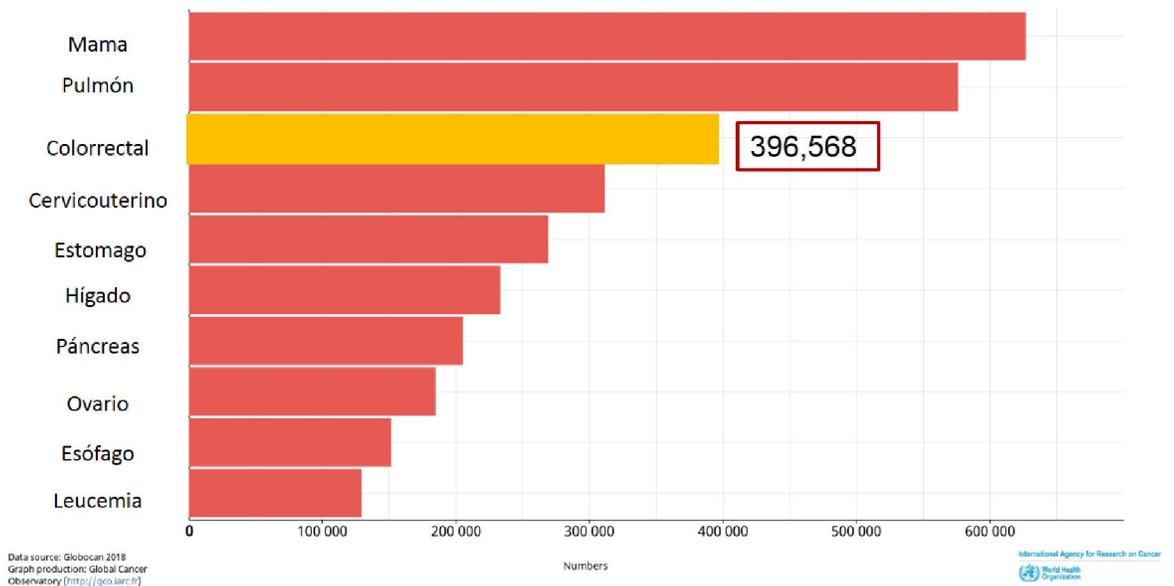


Figura 3: Número estimado de muertes en mujeres a nivel mundial por cada 100 000 habitantes; (GLOBOCAN; 2018).

1.2.-Enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer colorrectal

En los últimos años, las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD) han tomado especial relevancia principalmente en los países desarrollados debido al aumento de personas afectadas. Las IBD son patologías crónicas complejas que afectan al aparato digestivo La Colitis Ulcerosa (CU) y la Enfermedad de Crohn (EC) son las afecciones intestinales con mayor incidencia y prevalencia dentro de la IBD. Estas enfermedades cuentan con un elevado grado de similitud en cuanto a síntomas, factores de riesgo y tratamiento, siendo la principal diferencia la zona del aparato digestivo donde se produce la inflamación; mientras que la CU afecta únicamente al intestino grueso o colon la EC afecta todo el tracto digestivo Las IBD se han asociado a un aumento en el riesgo de desarrollar tumores malignos gastrointestinales, destacando el cáncer colorrectal (CCR) (L. Meyer *et al*, 2015).

1.2.1.-Cáncer e inflamación

La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) es un trastorno inflamatorio crónico en el intestino que implica la sobreproducción de citocinas pro inflamatorias y funciones excesivas de las células inflamatorias, las cuales están presentes en un microambiente el cual es importante ya que se encarga del mantenimiento de la homeostasis, la cual requiere un equilibrio de tolerancia inmune y funciones efectoras, sin embargo una vez que este se ve alterado podría ser el causante del cáncer colorrectal (CCR). Es importante destacar que la inflamación intestinal a largo plazo es un factor de riesgo clave para el cáncer colorrectal asociado a la colitis (CAC) (Zhu Y. *et al* ., 2018).

Así, la inflamación crónica predispone a ciertos carcinomas, en especial al CCR. Cuando las células del sistema inmunitario innato se encuentran en el microambiente tumoral, actúan como un mediador inflamatorio que puede promover el desarrollo tumoral, induce la proliferación de células iniciadas y altera el estroma; donde el eje TLR4- IL-6 es un vínculo molecular esencial entre inflamación y cáncer. La inflamación promueve la proliferación celular y el estrés oxidativo que daña el ADN, causando mutaciones, resistencia a la apoptosis y favorece las metástasis debido a la inestabilidad genética y metilación aberrante que interacciona con genes involucrados en vías de carcinogénesis colorrectal, como TP53, genes reparadores del ADN y factores como NF-kb. La activación de NF-kb estimula la IL-6 y contribuye a la carcinogénesis al inducir COX-2, aumentar la síntesis de prostaglandina E2 y activar la fosforilación de EGFR, lo cual al estar aumentados los niveles de estas citocinas nos indican un peor pronóstico para el paciente (Cuatrecasas., 2011).

El estrés oxidativo también contribuye a la patogénesis de la carcinogénesis del colon atacando proteínas y ácidos nucleicos, lo que produce desnaturalización

y una variedad de alteraciones que incluyen modificaciones de la base, lesiones de doble base y roturas de la cadena. El estrés oxidativo se desarrolla en respuesta a reacciones inflamatorias en particular porque las células inflamatorias, los neutrófilos activados y los macrófagos producen grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS). Los tejidos inflamados de pacientes con CU o CD activan una mayor expresión de óxido nítrico sintasa (NOS). Los RONS pueden interactuar con los genes clave implicados en las vías cancerígenas, como *P53* y los genes de reparación del desempareamiento del ADN. Un estudio previo mostró niveles más altos de frecuencias de mutación *P53* de ambas transiciones G: C a A: T en el sitio CpG del codón 248 y transiciones C: G a T: A en el codón 247 en el tejido inflamado que, en el tejido no inflamado del colon, así como en tejido de colon de controles adultos normales. Otro estudio informó que los niveles no citotóxicos de peróxido de hidrógeno redujeron drásticamente las actividades del sistema de reparación del desajuste. (Ran; Kyung., 2014).

2.-Los macrófagos y cáncer colorrectal.

2.1.-Macrófagos.

Las células presentadoras de antígenos, como los monocitos / macrófagos, desempeñan papeles importantes como centinelas de alertas de primera línea o como mediadores que dan forma a la respuesta inmune adaptativa (Benoit *et al.*, 2008). Los macrófagos son una de las poblaciones celulares más pleiotrópicas del sistema inmune, presentes en todos los tejidos del cuerpo. Tienen funciones homeostáticas que incluyen reparación, modelación y angiogénesis de los tejidos y proveen protección al poner en marcha mecanismos inmunes innatos e iniciar el desarrollo de respuestas inmunes específicas a través del procesamiento y presentación antigénicos, la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas.

Los fagocitos mononucleares son producto de un proceso denominado monocitopoyesis que comienza con la generación de precursores mieloides en la médula ósea, el bazo y el hígado fetal a partir de células pluripotenciales estimuladas con interleucina (IL-3). Los precursores mieloides comunes para el linaje granulocítico y monocítico, al ser estimulados con el factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF) y el factor estimulante de colonias de macrófago (M-CSF) e interactuar con el estroma de los órganos hematopoyéticos dan lugar a los promonoblastos y generan la progenie monocito-macrófago (Duque C. *et al.*, 2007).

Los macrófagos ayudan a mantener la homeostasis durante el desarrollo embrionario y durante toda la vida. La diversidad y la superposición de señales en el microambiente pueden generar un espectro de fenotipos y funciones de

macrófagos *in vivo*. Se cree que los fenotipos de los macrófagos de activación clásicos (M1) y alternativos (M2) se encuentran en los extremos de este espectro. La liberación de patógenos o patrones moleculares asociados al patógenos (PAMP) o patrones moleculares asociados al daño (DAMP) e IFN- γ durante la infección o lesión tisular promueve la activación clásica de los macrófagos y asegura la esterilidad del tejido. Por el contrario, la IL-4 producida por los linfocitos Th2 durante las respuestas inmunes a las infecciones parasitarias o alérgenos activa de manera alternativa a los macrófagos, promoviendo la curación y reparación de la herida (Jablonski *et al.*, 2015).

2.1.1.-Macrófagos clásicamente activados o M1

El fenotipo M1 se caracteriza por la expresión de altos niveles de citocinas proinflamatorias, alta producción de intermedios reactivos de nitrógeno y oxígeno, promoción de la respuesta Th1 y una fuerte actividad microbicida y tumoricida (Sica., 2012).

La respuesta común de los macrófagos a las infecciones bacterianas implica principalmente la regulación positiva de los genes implicados en la polarización M1. Estos incluyen genes que codifican citocinas tales como TNF, IL-6, IL-12, IL-1 β , receptores de citocinas tales como IL-7R e IL-15RA, quimiocinas tales como CCL2, CCL5 y CXCL8, y el receptor de quimiocinas CXCR7. Otros genes regulados asociados a M1 codifican las enzimas indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenasa y NO-sintasa 2 (NOS2), que están implicadas en la actividad microbicida de los macrófagos, y moléculas coestimuladoras, tales como CD80 y CD86. Es probable que esta robusta activación con desplazamiento M1 corresponda a la señal de alarma común contra las bacterias inducidas en los macrófagos, ya que la mayoría de estos genes se inducen independientemente de las especies bacterianas (Benoit *et al.*, 2008).

2.1.2.- Macrófagos alternativamente activados o M2

Se considera que los macrófagos M2 están implicados en la contención del parásito y en la promoción de la remodelación tisular y la progresión tumoral, para tener funciones inmunorreguladoras. Se caracterizan por una actividad fagocítica eficiente, alta expresión de moléculas depuradoras, la expresión de receptores de manosa (MMR) y galactosa, producción de ornitina y poliaminas a través de la ruta de la arginasa, y algunas citocinas IL-12^{low} IL-10^{hi} IL-1decoyR^{hi} IL-1RA^{hi} fenotipo (Sica *et al.*, 2012). Los macrófagos M2 incluyen al menos tres subconjuntos: se propone denominar como M2a, inducido por IL-4 o IL-13; M2b, inducido por inmuno-complejos y agonistas de TLR o TGF- β como activador alternativo, otros autores consideran que esta citocina induce el fenotipo M2c y receptores de IL-1, inducido por IL-10 y hormonas glucocorticoides (Benoit *et al.*, 2008). Dentro de los genes

típicos de la polarización de los M2 encontramos; receptor de manosa (MMR), α de resistina (RENTLB ,Fizz1), y quitinasa 3-like 3 (Chi3l3 , Ym1) (Sica *et al.*, 2012) mientras que PDL2 (también llamado B7DC o CD273) se expresa principalmente en células hematopoyéticas (células dendríticas y macrófagos con respuesta Th2) por lo tanto consideramos a algunos macrófagos estimulados, donde los receptores más comunes para PDL2 son IFN tipo 1 y 2, las citocinas de cadena simple (IL1,IL17,IL15,IL21) y GM-CSF (Vargas- Rojas *et al.*, 2008).

Muchos de los factores producidos por los macrófagos M2 actúan a favor de la progresión tumoral, estimulando el crecimiento tumoral (por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico 1 (FGF1) y factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF β 1), angiogénesis (por ejemplo, endotelio vascular factor de crecimiento A (VEGFA)) y remodelación de la matriz (p. ej., FGF1, fibrina y metalopeptidasas de la matriz (MMP), (Edin *et al.*, 2012).

2.2.-Macrófagos Asociados a Tumores (TAM's)

Las células inflamatorias están presentes en el microambiente tumoral de la mayoría de los cánceres y se ha informado que afectan el medio de los mediadores inflamatorios y las señales de proliferación celular, la angiogénesis y la remodelación tisular de maneras que podrían promover la progresión tumoral. (Edin *et al.*, 2012). Los macrófagos asociados a tumores (TAM's) son derivados de los monocitos circulantes o los macrófagos tisulares residentes, que constituyen el mayor infiltrado leucocitario encontrado dentro del estroma de muchos tipos de tumores (Yan-Cun Liu, *et al.*, 2014). Los TAM's interactúan con una amplia gama de factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas en el microambiente tumoral, los cuales son importantes para su diferenciación a los diferentes fenotipos que difieren en sus funciones según el tipo de tumor con el que están asociados. Los macrófagos asociados a tumores, presentan diferentes fenotipos dentro de las cuales se encuentran los M1, los cuales favorecen la respuesta inflamatoria, o bien pueden diferenciarse en fenotipos de activación alternativa como los M2 que participan en la reparación de tejidos con una función anti inflamatoria (**Figura 4**) (Capace, *et al.*, 2013), en respuesta a las diferentes señales del ambiente tumoral (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , M-CSF) contribuyendo al desarrollo del tumor y su progresión (Wenjuan.,*et al.*, 2015). Donde los TAM's a menudo se reportan con un fenotipo M2, sin embargo, se ha reportado que los factores secretados de las células con CCR no inducían una respuesta completa M1 o M2 de macrófagos, sino que los TAM's de un fenotipo "mixto" M1 / M2. Se ha demostrado previamente que una mayor densidad de macrófagos podría explicar el papel positivo de los macrófagos en el CCR lo cual a su vez podría contribuir a una respuesta inflamatoria (Edin *et al.*, 2012).

Los TAM's se encuentran dentro y alrededor de la mayoría de los tumores, los cuales pueden liberar numerosos factores que podrían influir en el comportamiento de las células tumorales y otras células del estroma tumoral. La capacidad de los macrófagos para adaptarse a su entorno ha llevado a la identificación de dos fenotipos polarizados principales de macrófagos (Edin *et al.*, 2012). Los TAM's expresan y liberan numerosos factores de crecimiento pro angiogénicos como: VEGF, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas / timidina fosforilasa (PDEC-GF / TP), factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2), factor de crecimiento transformante- α / β (TGF- α / β), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-1/6/8, factor activador de plaquetas α (PAF- α), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), granulocito (G) -CSF, GM-CSF, PDEC-GF / TP y quimiocinas (Solís *et al.*, 2015) . En respuesta a la hipoxia, los TAM's se acumulan en tumores, a su vez, estimulan la sobreexpresión de factores proangiogénicos, secretados por todos los componentes del microambiente tumoral (fibroblastos, células endoteliales y mastocitos), y células cancerosas, potenciando la señal angiogénica. Por lo tanto, los TAM's, que secretan varios factores proangiogénicos, pueden inducir la remodelación tisular al producir activadores e inhibidores de proteinasas que pueden destruir la matriz extracelular, liberando factores unidos a la matriz [MMP-2, MMP-9, MMP-12 y ciclooxigenasa-2 (COX -2)]. De esta manera, los TAM's forman parte de los componentes fundamentales del microambiente que promueve el crecimiento mediado por la angiogénesis, favoreciendo la progresión tumoral, la invasión y la metástasis (Marech *et al.*, 2016).

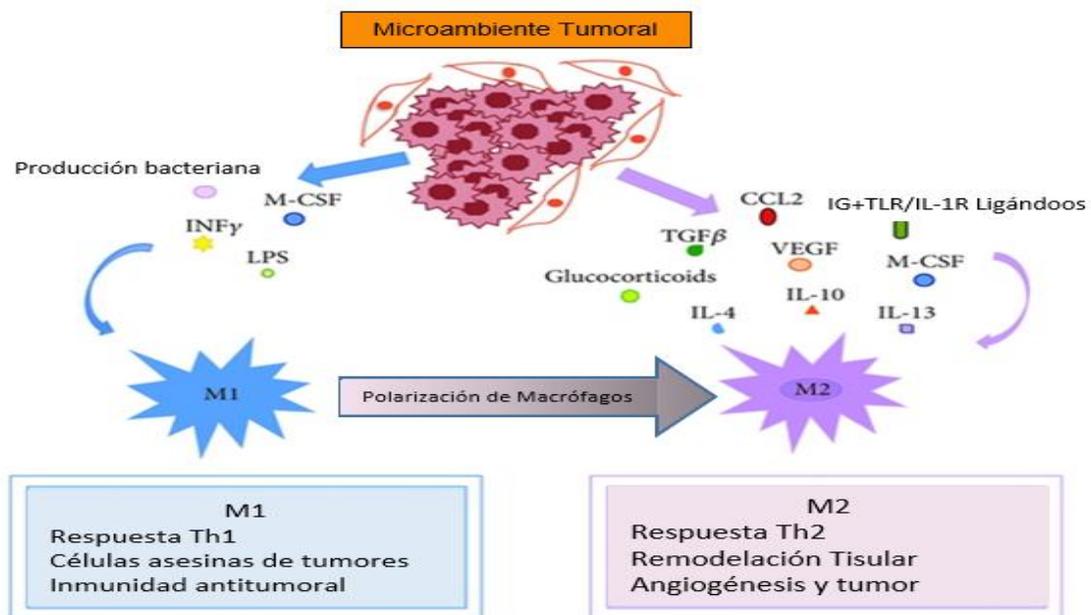


Figura 4.- Imagen modificada de (Capace *et al.*, 2013).

Figura 4: La polarización fenotípica de los macrófagos en el microambiente tumoral.

Los macrófagos pueden clasificarse esquemáticamente en dos clases principales según su polarización fenotípica: los macrófagos del fenotipo M1 en respuesta a M-CSF, IFN γ , LPS y otros productos microbianos, mientras que se diferencian en M2 en presencia de TGF- β , VEGF, M-CSF, CCL2, IL-4, IL-10, IL-13, glucocorticoides y complejos inmunes / ligandos de TLR. M1 y M2 muestran diferentes funciones. Los macrófagos M1 pueden desencadenar la respuesta inmune Th1 y ejercer actividad citotóxica hacia los microorganismos ingeridos y las células cancerosas. Los macrófagos M2 activan la respuesta inmune Th2 y promueven la angiogénesis, la remodelación tisular y la progresión tumoral. Imagen modificada de (Capace *et al.*, 2013).

2.3.-Macrófagos Asociados a Tumores en el Cáncer Colorrectal

Con respecto al papel de los TAM's en el CCR, los resultados publicados no han sido concluyentes. En los modelos murinos y humanos de CCR, se ha demostrado una relación entre la angiogénesis y los TAM's en la progresión tumoral. Algunos estudios clínicos también han informado que una infiltración de TAM's en el CCR se asoció con un aumento del angiogénesis, una diferenciación más pobre, etapas tumorales avanzadas y una mayor tasa de metástasis ganglionares (Zhong X. *et al.*, 2018). TAM's de un fenotipo M2, se han asociado con una disminución de la supervivencia en pacientes con melanoma, cáncer de mama, el riñón y el cáncer de vejiga (Solís *et al.*, 2015), sin embargo, esto podría no ser cierto para todos los tipos de cánceres ya que se ha demostrado previamente que un aumento de la densidad de los macrófagos en el CCR se correlaciona con un mejor pronóstico (Cavnar MJ. *et al.*, 2017) también en cáncer de estómago los pacientes han sido reportados con un mejor pronóstico al presentar un elevado número de TAM's. (Edin S. *et al.*, 2012). Por el contrario, pocos estudios clínicos han descrito que el aumento de TAM's en el frente de invasión de las células tumorales se correlaciona con un menor número de metástasis y un mejor pronóstico, por lo que no se sabe si se juega un papel dual el cual podría depender del balance de citocinas pro o antiinflamatorias, sus concentraciones relativas, la expresión de receptores de citocinas y el estado de activación de las células circundantes. (Fuente M. L. *et al.*, 2017).

3.-Vía JAK / STAT

Las proteínas STAT son activadas diferencialmente de una manera dependiente del contexto en respuesta a factores de crecimiento, citocinas u otros ligandos polipeptídicos. Tienen papeles importantes en procesos fundamentales, incluyendo proliferación, desarrollo, diferenciación, inflamación y apoptosis. La activación de STAT's se inicia por la fosforilación sobre un residuo crítico de tirosilo (Khandaker *et al.*, 2008).

La activación de JAK estimula la proliferación celular, la diferenciación, la migración celular y la apoptosis. Estos eventos celulares son críticos para la hematopoyesis, el desarrollo inmune, el desarrollo y la lactancia de las glándulas mamarias, la adipogénesis, el crecimiento sexualmente di mórfico y otros procesos. Previsiblemente, las mutaciones que reducen la actividad de la ruta JAK / STAT afectan estos procesos. Por el contrario, las mutaciones que activan constitutivamente o no regulan correctamente la señalización de JAK causan enfermedad inflamatoria, eritrocitosis, gigantismo y una variedad de leucemias (Bousoik E., *et al.*, 2018).

La activación de JAK ocurre después de la multimerización del receptor mediada por ligando porque dos JAK se ponen en proximidad cercana, lo que permite la trans-fosforilación. Los JAK activados posteriormente fosforilan objetivos adicionales, incluidos tanto los receptores como los sustratos principales, STAT. Las STAT son factores de transcripción latentes que residen en el citoplasma hasta que se activan. Los siete STAT de mamíferos tienen un residuo de tirosina conservado cerca del extremo C que está fosforilado por los JAK. Las STAT fosforilada ingresan al núcleo por un mecanismo que depende de la importación de α -5 (también llamado nucleoproteína interactor 1) y la vía de importación nuclear de Ron. Una vez en el núcleo, Las STAT dimerizadas se unen a secuencias reguladoras específicas para activar o reprimir la transcripción de genes diana. Por lo tanto, la cascada JAK / STAT proporciona un mecanismo directo para traducir una señal extracelular en una respuesta transcripcional (Abbas, 2004) (**Figura 5**).

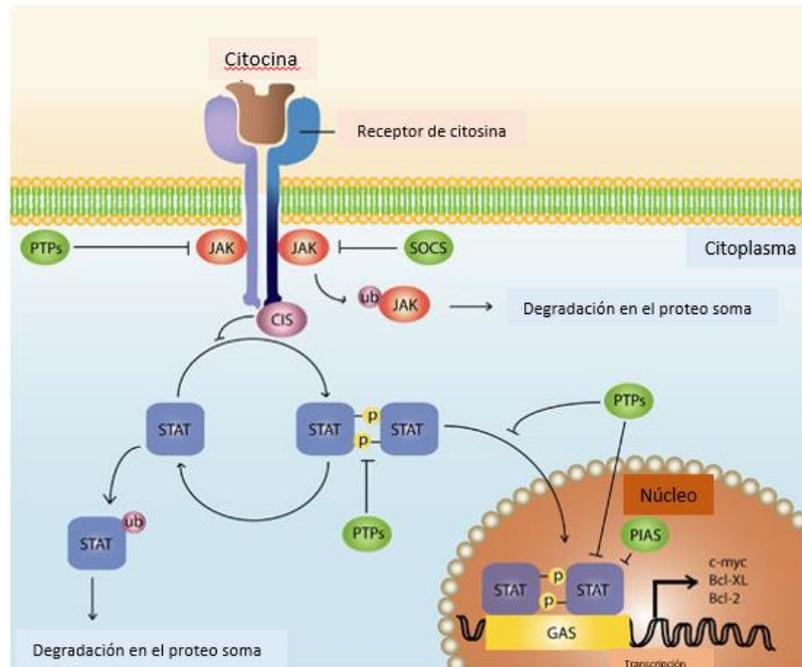


Figura 5: Vía de señalización de las JAK/STAT

Figura 5: Vía de señalización de las JAK/STAT (modificado de Abbas; 2004).

Las proteínas STAT son activadas diferencialmente de una manera dependiente del contexto en respuesta a factores de crecimiento, citocinas u otros ligandos poli peptídicos. Tienen papeles importantes en procesos fundamentales, incluyendo proliferación, desarrollo, diferenciación, inflamación y apoptosis. La activación de STATs se inicia por la fosforilación sobre un residuo crítico de tiosilo (Khandaker *et al.*, 2008).

El transductor de señales y activador de la transcripción 1 (STAT1) se encarga de regular la expresión de los genes implicados en la división celular y la apoptosis, siendo importante para el desarrollo de la respuesta Th1 y la activación clásica del macrófago mediando la respuesta del IFN- γ (Becerra *et al.*, 2013). Evidencias recientes han mostrado que STAT1 puede participar de manera importante en la movilización y activación de los monocitos circulantes que contribuyen a la acumulación de TAM's durante el cáncer (Van *et al.*, 2014).

3.1.- STAT1 en la inflamación y el cáncer colorrectal

Un primer estudio de la expresión de STAT1 en la IBD informó un aumento de los niveles de STAT1 en el tejido intestinal tanto de la (colitis ulcerativa) CU como de la Enfermedad de Crohn (EC). Activando STAT1 fue aumentando la presencia de en monocitos y granulocitos (Schreiber *et al.*, 2002). Otra investigación reveló

niveles más altos del total, pero no fosfo-STAT1 en células dendríticas (CD) (Mudter *et al.*, 2005). Del mismo modo, la expresión del gen STAT1 fue elevada en pacientes con EC en un estudio genómico de expresión génica (Wu F. *et al.*, 2007).

Se pueden hacer diferentes sugerencias sobre cómo esto podría ser funcionalmente relevante. Aunque se informó una mejoría de la colitis experimental en una evaluación inicial con ratones STAT1 knockout (STAT1^{-/-}) y tras la inhibición farmacológica específica de STAT1 en células T (Wu X. *et al.*, 2012). Por el contrario, algunas pruebas sugieren que varias moléculas con propiedades antiinflamatorias causan una disminución de la fosforilación de STAT1 en los linfocitos (Tao F. *et al.*, 2013). Además, el butirato del metabolito bacteriano inhibe la activación de JAK2 inducida por IFN- γ y la posterior señalización de STAT1, lo que podría interpretarse como un mecanismo potencial de diafonía entre el micro bioma entérico y el sistema inmune intestinal.

STAT1 también se ha propuesto como importante en CAC. Aquí, parece tener una función protectora como fibroblastos intestinales normales, pero fibroblastos no activados o fibroblastos de pacientes con IBD, activan STAT1 en células de cáncer de colon y de ese modo inhiben el crecimiento de las células tumorales (Kaler P. *et al.*, 2014). Aún no se han realizado más estudios que aborden directamente el CAC, pero se pueden hacer algunas deducciones a partir de los hallazgos relacionados con el cáncer colorrectal (CCR) en general ya que estos hallazgos involucran moléculas que también regulan la inflamación. Por ejemplo, la mutación KRAS frecuente en células CCR conduce a la inactivación de STAT1 y la insensibilidad subsiguiente de las células tumorales a los efectos antitumorales de IFN- γ (Klampfer L. *et al.*, 2003).

El papel preciso de STAT1 en la Enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) sigue sin estar claro ya que está implicado en las vías pro y antiinflamatorias. Por lo tanto, la regulación positiva de la expresión de STAT1 en la IBD humana podría verse como un defecto primario que contribuye al desarrollo de la inflamación intestinal o como el intento secundario del sistema inmune para limitar la inflamación. Sin embargo, parece que la activación de STAT1 en los linfocitos más bien favorece el desarrollo de la IBD, mientras que su fosforilación en los macrófagos y las células epiteliales parece beneficiosa con respecto a la inflamación intestinal. Las variaciones sobre este tema de roles diferenciales en las células adaptativas e innatas reaparecerán varias veces en el curso de la señalización JAK / STAT en la IBD (Zundler; F.; Neurath Markus., 2016).

Esto está en contraste con los hallazgos en un modelo de ratón, donde la activación de STAT1 fue crítica para el desarrollo espontáneo de CCR en ratones deficientes en SOCS1, probablemente a través de la inducción de enzimas que conducen al estrés oxidativo. La conexión que une la activación de STAT1 con la producción de especies reactivas de oxígeno también se ha establecido en

macrófagos peritoneales murinos *in vitro*. Sin embargo, en otro modelo murino de cáncer de colon, la formación de pólipos intestinales fue igual en animales con delección STAT1 en comparación con ratones que expresan STAT1, y SOCS1 también se ha propuesto como un oncogén mediando su efecto a través de STAT1-down regulation. En conclusión, el papel de STAT1 para el desarrollo del cáncer sigue siendo controvertido y requiere más estudios (Zundler; F. Neurath Markus., 2016).

3.2.-STAT1 y su relación con los TAM's

Por lo cual al se evaluó el papel que juegan los TAM's en el desarrollo tumoral, vemos que STAT1 podría estar jugando un papel importante en la movilización y activación de los monocitos circulantes que contribuyen a la acumulación de los TAM's durante el cáncer colorrectal. Sin embargo, no ha sido descrito con claridad cuál es la función que lleva a la diferenciación y mantenimiento de los fenotipos; proinflamatorio y antiinflamatorio, en presencia del cáncer colorrectal asociado a colitis. Para evaluar estos cambios se consideró el papel de los TAM's en presencia de macrófagos extraídos de medula ósea (BM), para observar el perfil predominante dentro de los TAM's.

Reportes previos en el laboratorio, usando un modelo experimental de cáncer de colon asociado a colitis CAC el cual utiliza AOM/DSS (Tanaka *et al.*, 2003), han demostrado que el desarrollo tumoral (denotado por un mayor número y tamaño de adenocarcinomas) en animales deficientes en STAT1 es mucho más rápido y extenso, y se encuentra acompañado de un infiltrado importante de macrófagos, en comparación con el encontrado en animales Wild Type (WT). Esta información sugiere que la ausencia de STAT1 podría estar asociada con un menor reclutamiento de macrófagos supresores de tumores y por lo tanto un mayor desarrollo de adenocarcinomas colorrectales (León-Cabrera, *et al.*, 2018).

Sin embargo, se desconoce el rol que juega STAT1 en el reclutamiento y diferenciación de TAM's durante el desarrollo del cáncer de colon. Así mismo las señales derivadas del epitelio intestinal y los mecanismos moleculares que determinan el reclutamiento y el fenotipo de activación de los TAM's durante la progresión de colitis a cáncer aún no se conocen con claridad.

4.-HIPOTESIS

Factores derivados de tumores desarrollados en animales deficientes en STAT1-/- inducirán cambios en macrófagos hacia un fenotipo permisivo para el crecimiento tumoral.

4.1.-Objetivo general:

Evaluar alteraciones en el fenotipo de macrófagos *in vitro* en respuesta a macerados de tumores colorrectales en dependencia de STAT1.

4.1.2.-Objetivos específicos:

1. Obtener tumores colorrectales en diferentes etapas de desarrollo de animales silvestres y deficientes en STAT1 (STAT1-/-).
2. Diferenciar *in vitro* monocitos de médula ósea a macrófagos adherentes bajo el estímulo de la citocina M-CSF.
3. Estimular *in vitro* macrófagos con estímulos asociados a M1, M2 y con macerados de tumores colorrectales en etapas tempranas y tardías de desarrollo provenientes de animales silvestres o STAT1-/-.
4. Analizar por citometría de flujo la expresión de marcadores de superficie asociados con macrófagos M1 y M2.
5. Determinar la producción de óxido nítrico en los sobrenadantes de los cultivos.
6. Evaluar cambios en la expresión de iNOS y Arginasa en los macrófagos bajo los diferentes estímulos.

5.-MATERIALES Y METODOS

5.1.-Material Biológico

Se utilizaron ratones machos, WT (silvestres) y STAT 1-/-de fondo genético BALB/c de ocho semanas de edad, los cuales se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos en el Bioterio de la FES-Iztacala, UNAM.

5.2.-Inducción del cáncer experimental

Para el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis (CAC), los ratones fueron inyectados con 12,5 mg/kg de Azoximetano (AOM) (Sigma, EE.UU.) vía intraperitoneal diluido en solución salina fisiológica (Sigma, EE.UU.); Cinco días más tarde, se administró Dextrán Sulfato de Sodio (DSS), (MW: 35 000 a 50 000, MP Biomedicals. Solón, Ohio, EE.UU.). 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 40 (etapa temprana del desarrollo tumoral) y 68 (etapa tardía del desarrollo) para la extracción de tumores, para lo cual se extrajo el colon, se lavó para eliminar cualquier residuo de heces fecales, una vez lavado se cortó con sentido proximal hacia el distal (esto considerando proximal a la parte cercana al ciego y distal la parte más alejada del ciego) para abrir y tener la parte interna expuesta, los tumores obtenidos se encontraban de la parte media-proximal, y se tomaron muestras de 0.5 cm.

5.3.-Porcentaje de peso corporal y DAI de los ratones

Para llevar un indicio de cómo se desarrolla el CAC en los ratones, fueron monitoreados dos veces por semana durante el modelo experimental esto se llevó acabo tomando el peso corporal de los ratones donde el peso inicial fue considerado como el 100%. Mientras que el índice de daño de la enfermedad se realizó siguiendo el protocolo propuesto por (Dae-Sung *et al.*, 2013). El cual sirve para determinar la severidad de la UC (colitis ulcerativa) durante el tratamiento de AOM/DSS. Para esto se llevó acabo con la supervisión constante de los ratones a lo largo del tratamiento, tomando en cuenta tanto la pérdida de peso corporal expresado en porcentaje, como las condiciones de las heces fecales, considerando los parámetros donde 0= a no presentar daño o heces normales y 3 es el grado más alto de daño (**figura 8**), donde vemos desde diarrea hasta sangrado rectal o inclusive prolapso rectal, siendo esto el mayor daño el cual se observa principalmente en los ratones STAT1-/- en las etapas más avanzadas del tratamiento (3 ciclo de la aplicación de del DSS o en el sacrificio del día 68).

5.4.-Obtención de macerados de tumores de etapa temprana y tardía.

Los tumores obtenidos al momento de los sacrificios se maceraron con ayuda del politron en tubos eppendorf, de 1.5 ml, esto se llevó acabo con solución salina estéril con inhibidores de proteasas al [1×] (Complete™, mini, cóctel inhibidor de la proteasa libre de EDTA. Tabletas provistas en (EASYpacks by Roche), se centrifugaron a 13000 rpm por 15 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante el cual fue conservado a -70°C, hasta su uso. Los sobrenadantes fueron cuantificados usando el método de Lowry, (tabla 1) en el cual se usa, una curva patrón con una Solución Standard de seroalbumina bovina (1 mg/ml), para posterior mente colocar las muestras con los reactivos de Lowry (Carbonato sódico al 2% en NaOH 0.1 M B: Sulfato cúprico al 1%: Tartrato sódico-potásico al 2%). En el momento de su uso se mezclan 50ml de A con 50 ml de B más 5µl de muestra a analizar; donde solo se usaron los reactivos A y B, al obtener la coloración azul, pasados los 5 min de reposo. Donde en complejo coloreado se desconoces su composición, presenta dos máximos de absorción a las longitudes de onda de 560 y 680 nm. La elección de una u otra depende de la concentración proteica de la muestra estudiada, los tumores obtenidos son de los ratones WT+AOM/DSS y STAT1-/- AOM/DSS tanto de etapas tempranas como de etapas tardías.

Tabla 1.- Tabla de cuantificación de proteínas por el método de Lowry. en la tabla se muestran las concentraciones en mg/ml para posteriormente convertirla a µg a las concentraciones que se requieran.

Solution A:(µ) Sol. Stock 10mg/ml de BSA	Solución B:(µl) Buffer de la muestra	Concentración mg/ml
0	200	0
10	190	0.5
20	180	1
40	160	2
60	140	3
100	100	5
120	80	6
160	40	8

Para corroborar el estado de las proteínas presentes en los macerados se llevó acabo un gel de integridad de proteínas, con esto obtuvimos las concentraciones a utilizar posteriormente tanto la concentración de 25 µg y 50 µg, Por medio de la técnica de electroforesis en gel; la cual se lleva acabo para separar fragmentos de ADN (u otras macromoléculas, como ARN y proteínas) por su tamaño y carga. La electroforesis consiste en aplicar una corriente a través de un gel que contiene las moléculas de interés. Con base en su tamaño y carga, las moléculas

se desplazarán por el gel en diferentes direcciones o a distintas velocidades indicando que las moléculas que quedan más arriba en el gel serán las de mayor tamaño (por ejemplo, el DNA), así mismo las moléculas de menos peso molecular serán las moléculas más pequeñas.

5.5.-Diferenciación de macrófagos a partir de células de la médula ósea.

Se extrajeron los dos fémures y las tibias de ratones de los grupos WT y STAT 1-/-, los huesos se mantuvieron en solución salina estéril y posteriormente se desinfectaron en etanol al 70% durante un minuto y se colocaron un minuto más en medio DMEM. Se cortaron los huesos por ambos extremos y se extrajo la medula por perfusión con solución salina estéril, se centrifugaron a 1500 rpm ×10 min a 4°C. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se obtuvo una pastilla, la cual fue re-suspendida en 5ml de medio de cultivo (DMEM completo (Medio + SBF + Antibiótico)). Para el conteo celular en la cámara de Neubauer se colocó una proporción (1:1) 10µl de Azul Tripano y 10µl de la muestra de células. La concentración celular se ajustó a 5×10⁶ de células totales en una placa de seis pozos con medio de cultivo (DMEM completo, 3ml/pozo) y se le agregaron 20 ng/ml de factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) (Murine M-CSF cat.#315-02- PEPROTECH) el medio para diferenciación celular, se cambió el medio cada 72hr. Se cultivaron durante siete días a 37°C con una atmósfera de CO₂ AL 5%.

5.6.-Administración de los diferentes estímulos

Con el objetivo de recuperar la mayor cantidad de células, estas se removieron con ayuda de raspadores celulares (Fisherbrand™). Posteriormente fueron recuperadas las células en un tubo de 50 ml el cual se centrifugo a 1500 rpm ×10 min. Después de recuperar las células se determinó el número y la viabilidad al contarlas en la cámara de Neubauer con azul tripano. Un total de 5×10⁵ células previamente diferenciadas fueron sembradas por pozo en placas de 12 pozos con medio de cultivo DMEM completo (medio de cultivo + antibiótico + SBF) con los estímulos (Tabla 2). Después de 72 hrs. se obtuvieron los sobrenadantes para determinar la producción de óxido nítrico de los cultivos. Las células se despegaron de la placa para análisis posteriores.

Tabla 2.- Tabla de los grupos de células diferenciadas con los estímulos y sus concentraciones.

Grupos de células diferenciadas	Concentración de estímulos
CTR	
LPS	1µg/ml
LPS+IFN γ	50 ng/ml
IL4/IL13	20ng/ml de cada uno

WT +AOM/DSS Etapa temprana (TE) y Etapa tardía (TA)	25µg
	50µg
	25µg +LPS
	25µg +IL4/IL13
STAT1-/- +AOM/DSS Etapa temprana (TE) y Etapa tardía (TA)	25µg
	50µg
	25µg +LPS
	25µg +IL4/IL13

5.7.-Análisis por citometría de flujo

Las células obtenidas se lavaron con 50 µl de buffer de FAC's (0.5% BSA en PBS). Posteriormente, se procedió al bloqueo de las regiones Fc de las células con ayuda del anticuerpo CD16/CD32 incubándolas durante 15 minutos a 4°C, enseguida se lavaron las células con buffer de FAC's y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Al finalizar el centrifugado, de las células se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las muestras para que enseguida se agregaran los anticuerpos anti-ratón CD11b, F4/80, PD-L2 y MMR (BioLegend). Los anticuerpos se mezclaron perfectamente con ayuda de un vortex y se incubaron a 4°C durante 30 minutos en completa oscuridad. Se lavó con 500µl de buffer de FAC's (filtrado) centrifugar a 2500 rpm ×10 minutos a 4°C; se repitió una vez más el lavado, una vez realizados ambos lavados se decantan los tubos y se re suspenden las células en EDTA 0.5%; agregando así 500µl de FAC's y 500µl de EDTA. Para finalizar, las células nuevamente fueron lavadas con buffer de FAC'S y centrifugadas a 1500 rpm y se resuspendieron en un volumen final de 350µl. Inmediatamente las células se analizaron en el citómetro "(Invitrogen Attune NxT flow cytometer)" y con el software "*FlowJo V10*".

5.8.- Extracción de RNAm y RT-PCR

Con la finalidad de evaluar cambios en la expresión de genes de interés a nivel de tejido se decidió obtener el RNA total para que a partir del mRNA se procediera a la síntesis de DNA complementario (cDNA) y con base en éste, evaluar los cambios en la expresión de genes mediante una RT-PCR. Se añadió trizol a las células que recibieron los diferentes tratamientos. Posteriormente se agregaron 200µl de cloroformo frío (-20°C) por cada ml de trizol utilizado y se homogenizó con ayuda de un vortex durante 30 segundos, enseguida la muestra ya homogenizada se dejó reposar durante 10 minutos para después centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa (RNA) se separó cuidadosamente y se colocó en un tubo nuevo, inmediatamente después se le agregó a cada muestra un volumen de isopropanol frío (-20°C) equivalente al obtenido en la fase acuosa y se mezcló manualmente por inversión para posteriormente dejarlo precipitar toda la noche a 4°C. El RNA se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, y la pastilla se

lavó con un gradiente de etanol al 100%, 80% respectivamente, adicionando 400 µl de etanol, re suspendiendo la pastilla manualmente por inversión, centrifugando a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C y decantando el sobrenadante para cada lavado. Finalmente se prosiguió al secado de la pastilla para eliminar el exceso de etanol durante 1 hora y se resuspendió la misma en 20 µl de H₂O MilliQ con DEPC (Dietilpirocarbonato) al 0.01%. El RNA se cuantificó con ayuda del (Epoch™ *Multi-Volume multi-sample Spectrophotometer System*) se verificó su integridad mediante una electroforesis en gel de agarosa. La síntesis de cDNA se realizó usando el kit (M-MLV RT, INVITROGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor.

La reacción de PCR se llevó a cabo usando el kit (Amplificasa Taq DNA polimerasa, BioTechMol) en un volumen final de 25 µl utilizando 1 µg de cDNA bajo las condiciones que se indican en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Condiciones utilizadas para procesar muestras mediante PCR.

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

Se evaluó la expresión de genes asociados al perfil de macrófagos M1 (iNOS, TNF-α,) y M2 (Arginasa-1, Fizz-1). Se usó como gen constitutivo GAPDH. Las secuencias de los primers, las condiciones utilizadas durante la reacción, así como el tamaño del amplicon se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Secuencias de los primers utilizados para el gen constitutivo (GAPDH), genes de interés (iNOS, TNF-α, Arginasa-1, Fizz-1) y genotipo de STAT1. Temperaturas de alineación (Tm) y Tamaño del producto (pb).

Gen	Temperatura de alineación (TM)	Amplicon (pb)	Secuencia 5' --- 3'	
GAPDH	56°C	201	F	CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC
			R	CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC
iNOS	62°C	449	F	CTG GAG GAG CTC CTG CCT CAT G
			R	GCA GCA TCC CCT CTG ATG GTG
TNF-α	59°C	307	F	GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C
			R	ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG
Arginasa-1	54°C	250	F	CAG AAG AAT GGA AGA GTC AG
			R	CAG ATA TGC AGG GAG TCA CC
Fizz-1	65°C	290	F	GGT CCC AGT GCA TAT GGA TGA GAC CAT AG

			R	CAC CTC TTC ACT CGA GGG ACA GTT GGC AGC
			R	ACA ATC GAG GCC ACG CAG GT
STAT1	52°C	172	WT-R	CTG ATC CAG GCA GGC GTT
			Común F	TAA TGT TTC ATA GTT GGA TAT CAT

5.9.-Determinación de nitritos en los sobrenadantes.

La cuantificación de nitritos en las muestras se realizó, para saber la cantidad de nitrógeno secretado por las células en tratamiento, esto por el método de Griess. Se preparó una curva estándar con una serie de concentraciones de la solución de nitritos 200µl de NaNO₂ el cual se diluirá con 100µl de solvente (medio de cultivo completo DMEM) obteniendo así una concentración de 1000µM. Que se coloca en una placa de 96 pozos donde colocaron 100µl de la solución de Griess que contiene (solución A= naptilen diamina dihidrocloro en H₂O + solución B= Salfanilamida en 5% de H₃PO₄) más la solución estándar de nitritos previamente preparada; mientras que para la absorbancia de las muestras se colocaron 100 µl de las muestras de cada uno de los grupos estimulados y 70 µl de solución de Griess,; dando como tonalidad un color rosado en los grupos que se produce la liberación de óxido nítrico, y dejando reposar por periodos de 5 min hasta cumplir los 20 minutos. Entre cada periodo se lee la placa a 540nm; en un lector de micro placas para obtener la absorbancia (Multiskan Ascent 96/384 Plate Reader - MTX Lab Systems); los datos obtenidos serán analizados estadísticamente en EXCEL.

5.10.-Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante la ayuda del software “GraphPad Prism 6”, aplicando un análisis de ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Tukey con múltiples comparaciones. Un valor de (P<0.05, 95%) se consideró como significativo.

6.-Resultados

6.1.-Inducción del cáncer de colon asociado a colitis

Con el objetivo de evaluar el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis en animales silvestres y deficientes en STAT1 se usó el modelo experimental que utiliza AOM y DSS como inductor del cáncer. Se registraron cambios en el peso corporal y en el índice de daño de la enfermedad (DAI) dos veces por semana durante 68 días.

Se observó que los grupos control tanto los WT como los STAT1^{-/-}, mantienen el peso corporal y aumentan de peso ya que estos ratones se mantienen sin la administración del tratamiento. Por el contrario, tenemos a los grupos con tratamiento WT+AOM/DSS y STAT1^{-/-} AOM/DSS; en los cuales vemos que presentan una mayor pérdida de peso durante la administración del tratamiento al día 40 una semana después de la segunda administración del DSS, con respecto a los grupos CTR (grupo control). Al comparar los grupos con tratamiento nos damos cuenta que la pérdida de peso de los ratones STAT1^{-/-}+AOM/DSS es mayor en comparación con los ratones WT+AOM/DSS ya que al día 54 se aprecia una pérdida de peso mayor en los ratones STAT1^{-/-}+AOM/DSS en comparación con los ratones WT+AOM/DSS esta condición se mantiene hasta el día 68 del experimento (**Figura 6**).

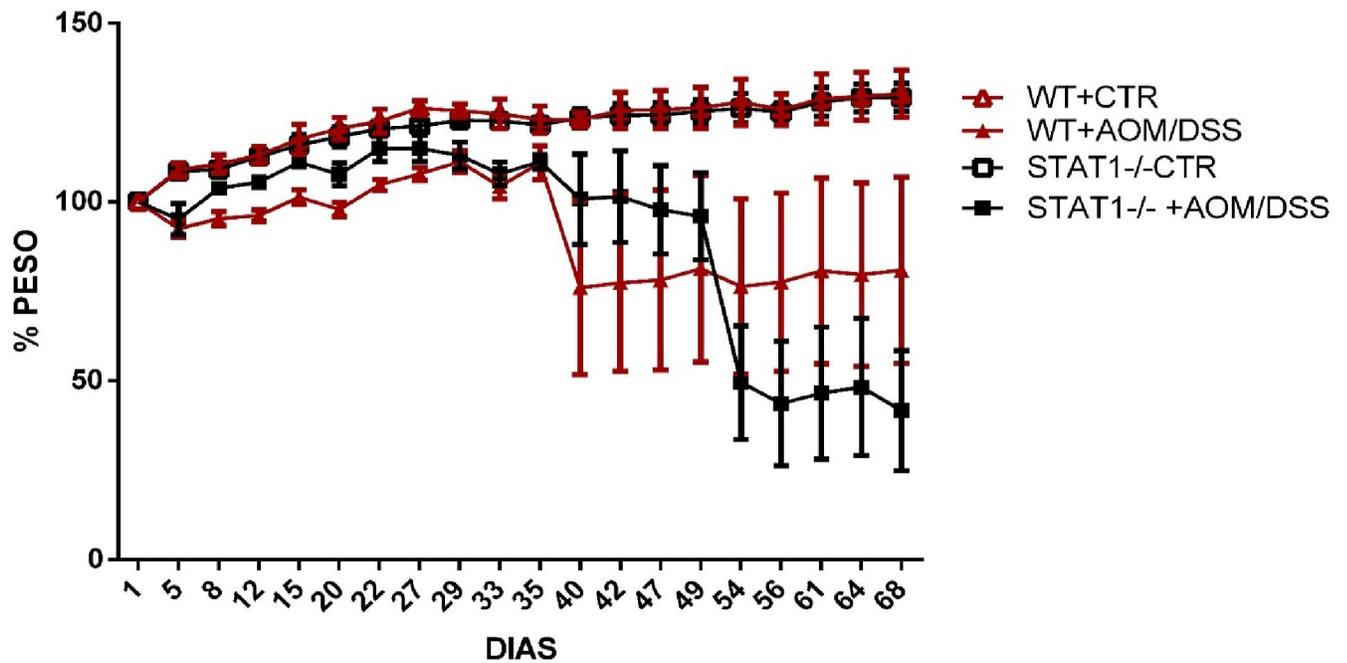


Figura 6: Cambios en el peso corporal expresado en porcentaje respecto al peso inicial, a lo largo del tratamiento (día 40 etapa temprana (TE) y día 68 etapa tardía (TA)) de ratones macho WT y STAT1^{-/-} durante 3 ciclos correspondientes a la inducción de CAC, con el modelo AOM+DSS en los grupos (WT CTR, WT +AOM/DSS, STAT1^{-/-} CTR y STAT1^{-/-}+AOM/DSS). Los datos fueron registrados dos veces por semana durante 68 días, los datos corresponden a 5 animales por grupo los cuales representan el promedio \pm DS.

6.2.-Análisis del índice de daño de la enfermedad (DAI) durante el CAC

Al evaluar el índice de daño de la enfermedad (DAI) en el modelo de AOM/DSS, en los grupos (WT CTR, WT +AOM/DSS, STAT1^{-/-} CTR y STAT1^{-/-} +AOM/DSS) durante el desarrollo del CAC, se observó que los grupos control (CTR) se mantienen en 0 indicándonos así que nuestros grupos controles no presentan daño en el intestino. Sin embargo, el grupo STAT1^{-/-} + AOM/DSS comienza a presentar daño desde el día 15 y así se mantiene la condición mostrando mayor DAI durante todo el desarrollo del experimento. En las etapas tempranas (TE) día 40 y tardías (TA) día 68 del desarrollo tumoral el DAI fue mayor indicando sangrados y diarreas esto se presenta principalmente en la presencia del DSS, en comparación con el grupo de WT+AOM/DSS donde el máximo daño es de 1 a lo largo de todo el experimento (**Figura 7**).

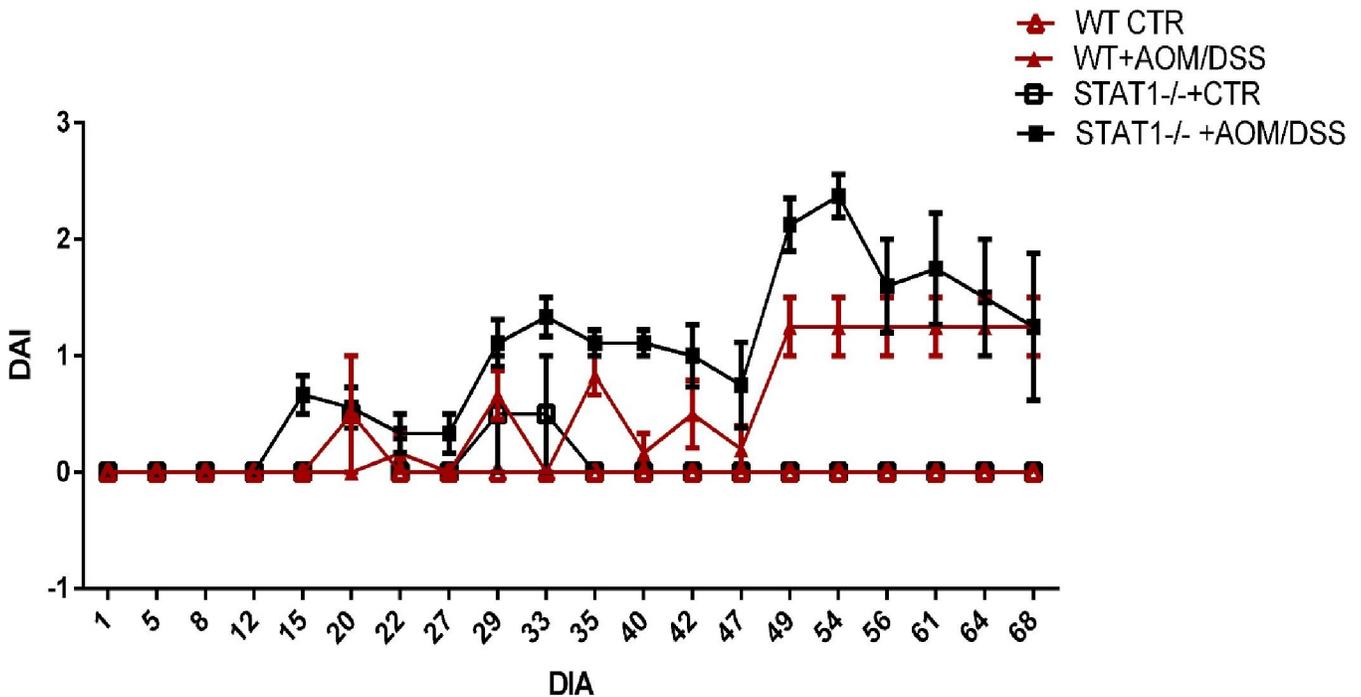


Figura 7: Índice de daño de la enfermedad DAI, 0= sin daño; 1= heces blandas; 2= diarreas; 3= diarrea con sangrado, en ratones WT y STAT 1^{-/-} sin y con tratamiento de AOM/DSS, durante 3 ciclos correspondientes a la inducción del CAC. Los datos fueron registrados dos veces por semana durante 68 días, los datos corresponden a 5 animales por grupo los cuales representan el promedio \pm DS.

6.3.-Obtención de tumores de etapas temprana (TE) y tardías (TA) del desarrollo tumoral.

Para la obtención de tumores, se obtuvo el colon de los animales de cada uno de los grupos (WT CTR, WT +AOM/DSS, STAT1^{-/-} CTR y STAT1^{-/-}+AOM/DSS) durante diferentes etapas del desarrollo tumoral. Una semana después del segundo ciclo de DSS (día 40) se consideró como etapa temprana y dos semanas después del tercer ciclo de DSS como etapa tardía (día 68) (**Figura 8B**). Al analizar el colon al día 40 se observó que los animales STAT1^{-/-}+AOM/DSS presentaron enrojecimiento, sangre y heces reblandecidas, así como un mayor número de tumores distribuidos de la zona media a distal en comparación con los animales WT +AOM/DSS (**Figura 8B**). A los 68 días se determinó que los dos grupos presentaron tumores en un número similar, 13 tumores para WT+AOM/DSS y de 12 tumores para STAT1^{-/-}+AOM/DSS en promedio sin presentar diferencias significativas entre los grupos, estos tumores se ven distribuidos de la zona media a la distal del colon (**Figura 8A**). Sin embargo, se determinó que los tumores de los animales STAT1^{-/-}+AOM/DSS fueron de mayor tamaño y se distribuyeron en mayor extensión en comparación con los ratones WT +AOM/DSS (**Figura 8B**).

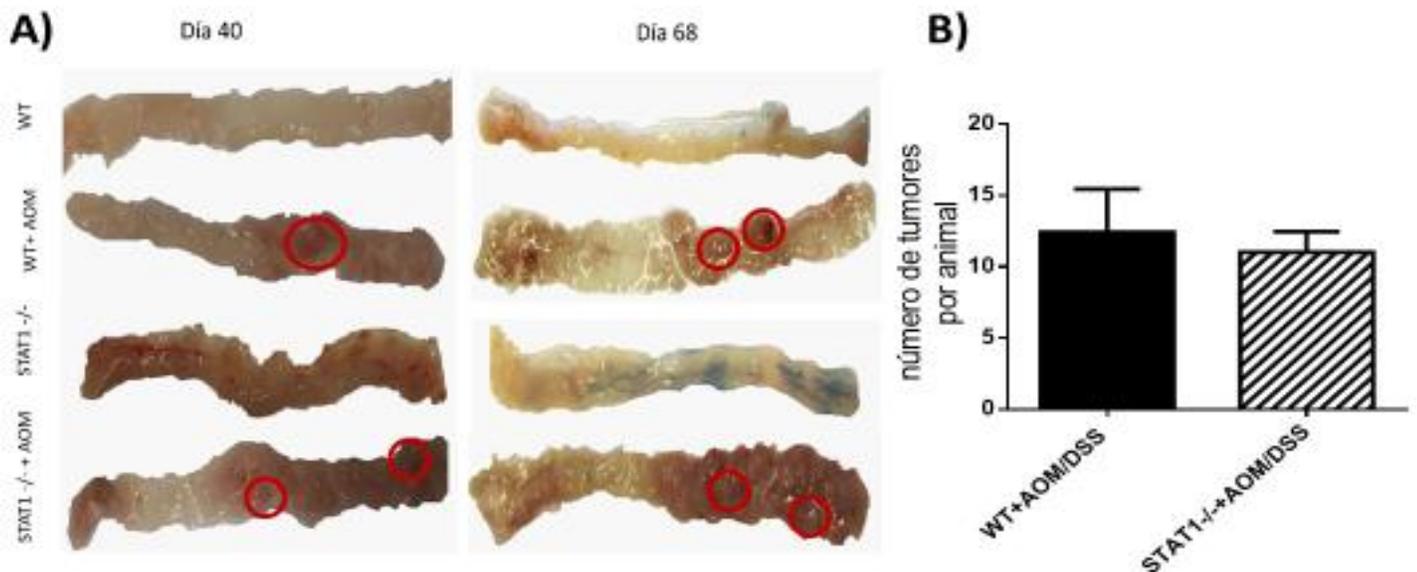


Figura 8.-Imagen representativa del colon durante el sacrificio en etapas tempranas (TE) y tardías (TA) A) Imágenes representativas de los colon de los diferentes grupos (WT CTR, WT +AOM/DSS, STAT1^{-/-} CTR y STAT1^{-/-}+AOM/DSS) en etapa temprana (TE) día 40 y etapa tardía (TA) día 68. **B)** Media de tumores por animal para el grupo WT+AOM/DSS a los 68 días.

6.4.-Cuantificación e integridad de las proteínas en los macerados tumorales.

Para determinar si en los macerados tumorales durante las diferentes etapas se encontraban proteínas y si estas estaban integras al momento de ponerlas con los cultivos celulares se analizó la integridad proteica en geles de acrilamida. En el gel se muestra que las proteínas si están presentes en los extractos tumorales, obtenidos a partir de la inducción del CAC de las etapas TE y TA de ratones WT +AOM/DSS y STAT1 -/- + AOM/DSS (**Figura 9A y 9B**). Se puede observar que se tienen presentes proteínas tanto de alto peso molecular como de bajo peso molecular; esto nos indica que las proteínas presentes de los extractos de tumor de etapa temprana (TE) si están integras para ambos grupos, tanto WT+AOM/DSS y STAT1-/-+AOM/DSS donde cada una de las muestras proviene de un individuo por lo tanto para cada grupo se tienen 3 muestras **Figura 9A**. En la **Figura 9B** correspondiente a macerados de etapa tardía se observa que de igual manera las proteínas están integras ya que tenemos las proteínas de alto peso molecular y las de bajo peso molecular de ambos grupos WT+AOM/DSS y STAT1-/-+AOM/SS con 4 muestras cada grupo. En el gel de integridad de proteínas, resulta interesante que las bandas proteicas provenientes de animales diferentes presentan en algunos casos patrones distintos. En este caso no se analizaron las diferencias entre ratones, pero resultaría interesante tomar en cuenta el tamaño del tumor y su efecto en la diferenciación de los macrófagos.

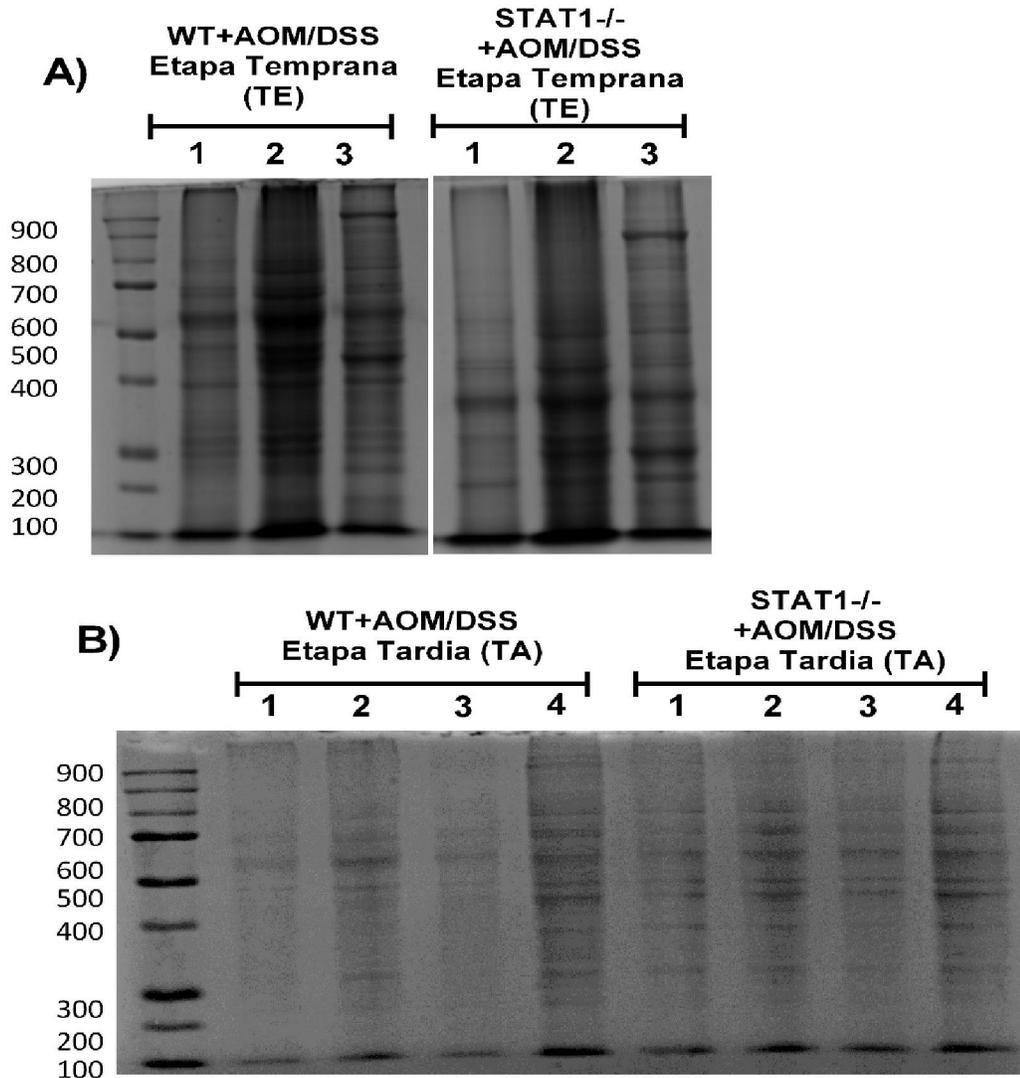


Figura 9: Gel de integridad de proteínas

Figura 9.- Gel de integridad de proteínas, tomadas de los extractos tumorales obtenidos a partir de la inducción del CAC de las etapas tempranas (TE) y tardías (TA) de ratones WT +AOM/DSS y STAT1^{-/-}+AOM/DSS. **A)** Proteínas provenientes de los extractos tumorales de (TE) de ratones WT+AOM/DSS y proteínas provenientes de los extractos de tumor (TE) de ratones STAT1^{-/-}+AOM/DSS, 3 muestras por grupo. **B)** Proteínas provenientes de los extractos tumorales de (TA) de ratones WT+AOM/DSS y proteínas provenientes de los extractos de tumor (TA) de ratones STAT1^{-/-}+AOM/DSS cada grupo con 4 muestras. Cada muestra representa a los extractos tumorales de un solo ratón.

6.5.-Diferenciación y estimulación de células de la médula ósea (CMO).

Un elemento importante para evaluar los diferentes estímulos con las interleucinas y los macerados de tumores, son los macrófagos derivados de médula ósea (MDMO). Para ello se efectuó la extracción de medula ósea de animales WT, la cual contiene células pluripotenciales que pueden ser diferenciadas a macrófagos, por factores de crecimiento y diferenciación específicos, en este caso, por medio del Factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF). En la **Figura 10**, se muestran las células de médula ósea (CMO) más el M-CSF a una concentración de 20ng/ml, al día 1 que no están diferenciadas, al día 3 tenemos el segundo estímulo de las CMO+MCSF donde comienzan a presentar la forma alargada y las células se adhieren al fondo de la placa característica de los macrófagos y por ultimo tenemos las CMO+MCSF al día 7 en donde se observan células de forma estrellada y alargada bien adheridas a la placa correspondientes a la morfología de macrófagos.

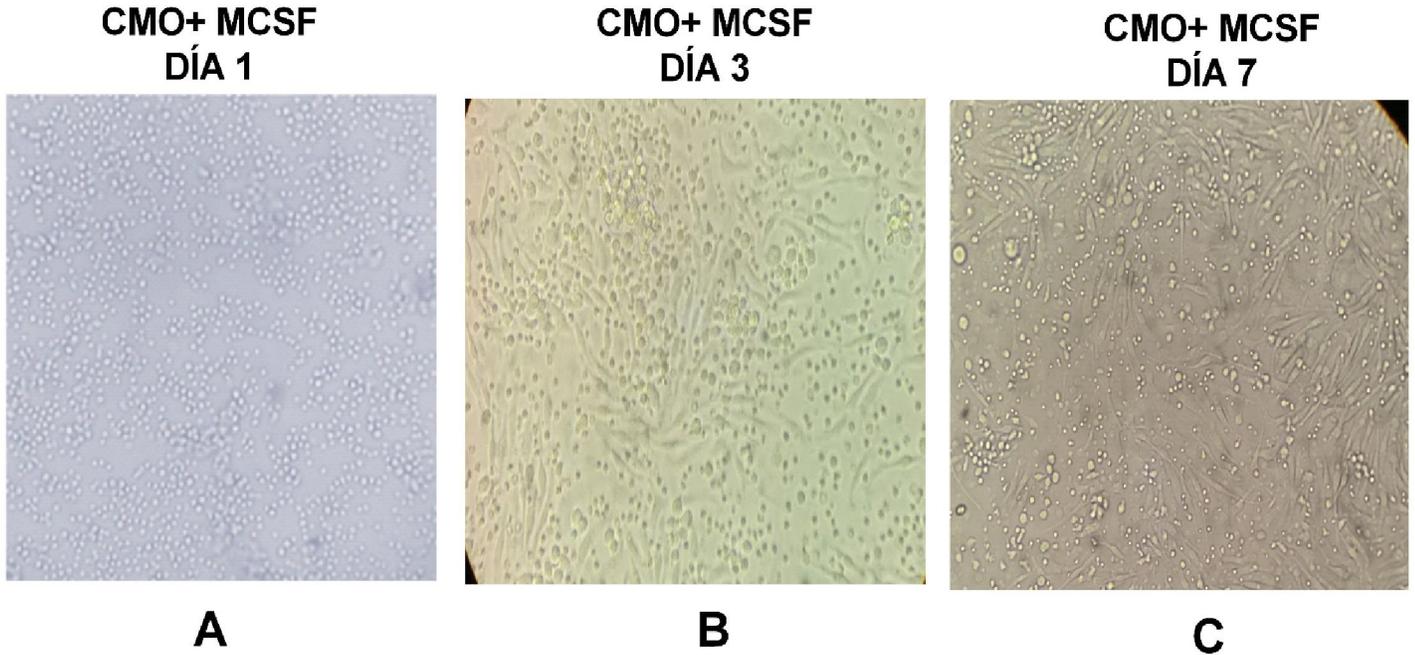


Figura 10.- Diferenciación de células de médula ósea (CMO) a Macrófagos con Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) a 20ng/ml. **A)** Células provenientes de médula ósea sin diferenciar ya que al día 1 se coloca el 1° estímulo **B)** Macrófagos diferenciados a partir de médula ósea con el 2° estímulo de MCSF. **C)** células diferenciadas a macrófagos después del 3° estímulo de MCSF. Células en medio de cultivo DMEM completo a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5% (Microscopio óptico; a un aumento de 20 x).

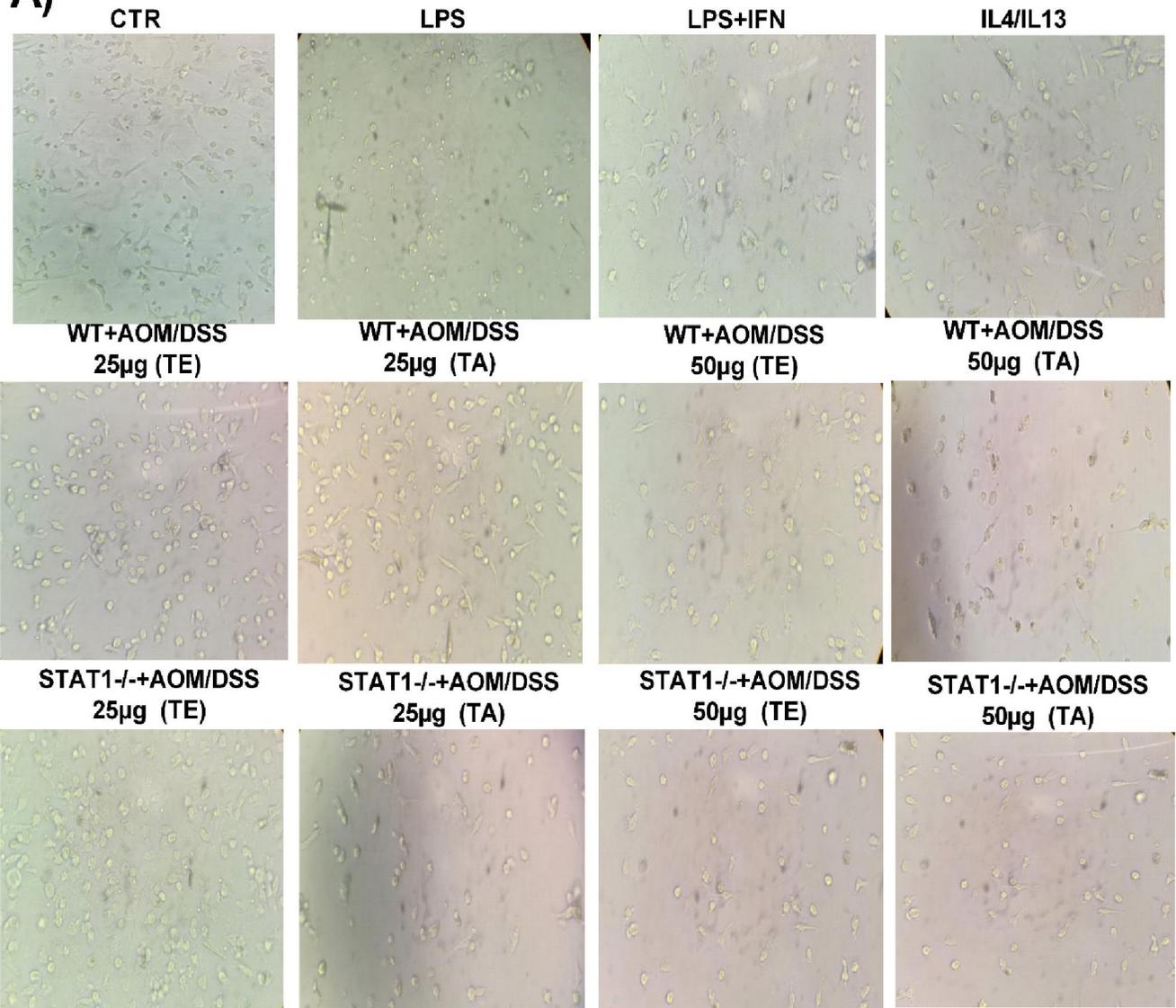
6.6.-Macrófagos silvestres estimulados con macerados tumorales de etapas tempranas y tardías.

Una vez que se determinó que las células de medula ósea se habían diferenciado a macrófagos a partir de factor estimulante de colonias de macrófagos M-CSF se les agregaron los estímulos: LPS, LPS+IFN γ , IL4+IL13 y los macerados de los tumores de la etapa temprana (TE) y de la etapa tardía (TA) a diferentes concentraciones: WT AOM/DSS 25 μ g, WTAOM/DSS 50 μ g, STAT1-/- AOM/DSS 25 μ g y STAT1-/- AOM/DSS 50 μ g. Además, para determinar qué efecto tenían los macerados tumorales sobre la respuesta de las células a otros estímulos, estos se administraron a diferentes concentraciones junto con LPS o IL-4/IL-13: WT+AOM/DSS 25 μ g + LPS, WT+AOM/DSS 25 μ g + IL-4/IL-13, STAT1-/- AOM/DSS 25 μ g + LPS y STAT1-/- AOM/DSS 25 μ g + IL-4/IL-13. El lipopolisacárido (LPS) y el interferón gamma (IFN γ) son factores estimulantes que favorecerán la diferenciación a macrófagos M1, por el contrario, las interleucinas 4 (IL-4) y 13 (IL-13) son usadas para favorecer a los macrófagos con un perfil M2.

En la **figura 11** se muestran los macrófagos que recibieron los estímulos tanto de las interleucinas como los macerados de tumor después de 48hr. **Figura 11A** donde en el grupo control CTR tenemos la presencia de células previamente diferenciadas no vemos cambios en los macrófagos, LPS células diferenciadas más lipopolisacáridos a 1 μ g/ml, no presenta un cambio muy claro al observar la placa no hay presencia de tantas células, LPS+IFN γ células diferenciadas más lipopolisacáridos a 1 μ g/ml más interferón a 50ng/ml, al igual en el tratamiento con LPS se ven menos células; IL4/IL13 células diferenciadas, mas IL4=20ng/ml + IL13=20ng/ml; vemos un aumento de células y la morfología de los macrófagos se ve más definida; WT AOM/DSS 25 μ g (TE): diferenciadas más extracto de tumor del día 40 a 25 μ g; las células se mantienen diferenciadas y se ven en buen estado; WT AOM/DSS 25 μ g (TA): células diferenciadas más extracto de tumor del día 68 a una concentración de 25 μ g; las células se ven en buen estado y con una morfología definida, WT;AOM/DSS 50 μ g (TE): células diferenciadas más extracto de tumor del día 68 a una concentración de 50 μ g; las células no se ven del todo latentes WT;AOM/DSS 50 μ g (TA): células diferenciadas más extracto de tumor del día 68 a una concentración de 50 μ g; las células no se ven del todo latentes, STAT1-/- AOM/DSS 25 μ g (TE) : células diferenciadas más extracto de tumor del día 40 a 25 μ g; las células no se ven latentes y no parecen estar completamente adheridas, STAT1-/-; AOM/DSS 25 μ g (TA): células diferenciadas más extracto de tumor del día 68 a una concentración de 25 μ g; se observa un mayor número de células con una buena latencia, STAT1-/- AOM/DSS 50 μ g (TE): células diferenciadas más extracto de tumor del día 40 a una concentración de 50 μ g; las células se ven poco definidas STAT1-/- AOM/DSS 50 μ g (TA): células diferenciadas más extracto de tumor del día 68 a una concentración de 50 μ g; las células se pueden ver sin embargo se observa

un menor número de células. En la **Figura 11B** se observan las células con los extractos de tumor de los WT+AOM/DSS y los STAT1-/-+AOM/DSS ambos en una concentración de 25 µg de etapa temprana más los controles positivos LPS e IL4/IL13, para posteriormente poder identificar tanto al perfil M1 y M2. Esto se llevó a cabo para corroborar que las células presentes en el cultivo se habían diferenciado a macrófagos y que la presencia de los diferentes estímulos, no afectaban a las células ya que el aumento celular era proporcional al grupo control.

A)



B)

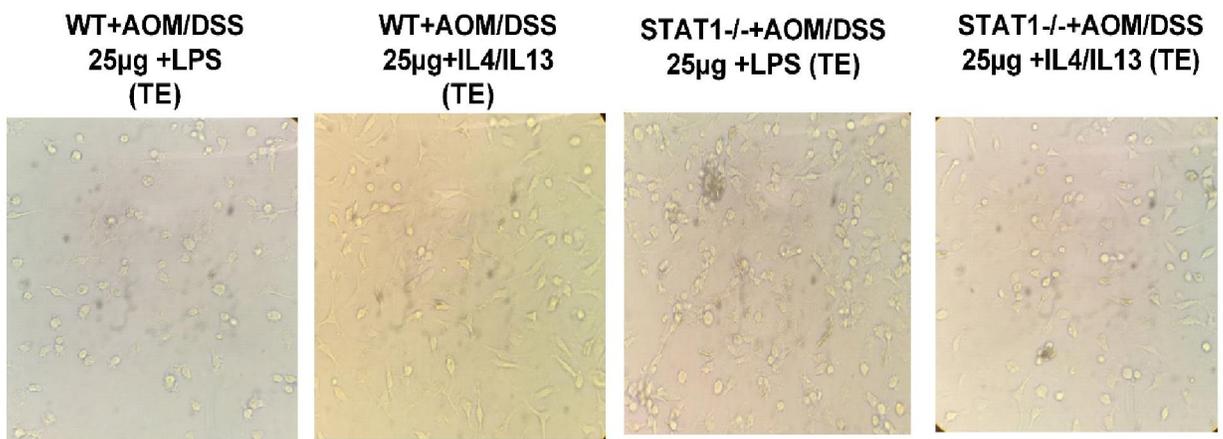


Figura 11. -Células diferenciadas a macrófagos estimuladas de ratones provenientes de WT (BALB/c) con los diferentes grupos control y los extractos de tumores tanto de WT y STAT1-/- (tumores de las etapas temprana y tardía días 40 y 68) donde cada uno de los pozos contiene 5×10^5 células; A) comenzando por la esquina superior izquierda tenemos; CTR: células sin estímulo WT diferenciadas con MCSF; LPS: células diferenciadas más lipopolisacáridos a $1 \mu\text{g/ml}$; LPS+IFN γ : células diferenciadas más lipopolisacáridos a $1 \mu\text{g/ml}$ más interferón gamma a 50ng/ml ; IL-4+IL-13: células diferenciadas, más IL4= 10ng/ml + IL13= 10ng/ml ; WT AOM/DSS $25 \mu\text{g}$ (TE): diferenciadas más extracto de tumor del día 40 a $25 \mu\text{g}$; WT AOM/DSS $25 \mu\text{g}$ (TA): células diferenciadas más extracto de tumor del día 68 a una concentración de $25 \mu\text{g}$; WT;AOM/DSS $50 \mu\text{g}$ (TA): células diferenciadas más extracto de tumor del día 68 a una concentración de $50 \mu\text{g}$; STAT1-/- AOM/DSS $25 \mu\text{g}$ (TE) : células diferenciadas más extracto de tumor del día 40 a $25 \mu\text{g}$; STAT1-/-; AOM/DSS $25 \mu\text{g}$ (TA): células diferenciadas más extracto de tumor del día 68 a una concentración de $25 \mu\text{g}$; STAT1-/- AOM/DSS $50 \mu\text{g}$ (TA): células diferenciadas más extracto de tumor del día 68 a una concentración de $50 \mu\text{g}$; **B)** WT; AOM/DSS $25 \mu\text{g}$ (TE)+LPS: células diferenciadas más extracto de tumor del día 40 a una concentración de $25 \mu\text{g}$; STAT1-/-;AOM/DSS $25 \mu\text{g}$ (TE)+IL4/IL13: células diferenciadas más extracto de tumor del día 40 a una concentración de $25 \mu\text{g}$; STAT1-/-; $25 \mu\text{g}$ (TE)+LPS: células diferenciadas más extracto de tumor del día 40 a una concentración de $25 \mu\text{g}$; STAT1-/-; $25 \mu\text{g}$ (TE)+IL4/IL13: células diferenciadas más extracto de tumor del día 40 a una concentración de $25 \mu\text{g}$. Cada pozo con 2 ml de medio completo (DMEM+SBF). (Se observó en un microscopio óptico a $20 \times$).

6.7.-Determinación de la producción de Óxido Nítrico en los sobrenadantes de los cultivos.

Después de administrar los diferentes estímulos se determinó la producción de óxido nítrico (ON) en los sobrenadantes de las células (**Figura 12**). Como era de esperarse se demostró que los grupos con LPS o LPS+IFN γ presentaron una mayor producción de ON en comparación al grupo control. Los grupos con macerados tumorales no mostraron una producción significativa de ON. Sin embargo, los grupos con macerados tumorales que además recibieron LPS fueron capaces de producir ON, indicando que la presencia del macerado tumoral no inhibe su capacidad de respuesta a un estímulo como el LPS (Figura 12). La producción de nitritos está más relacionada con los M1 y siendo el LPS uno de los indicadores de este perfil vemos que hay una mayor producción en los grupos que lo presentan (LPS, LPS+IFN γ ; WT+AOM/DSS $25 \mu\text{g}$ (TA)+LPS y STAT1-/-+AOM/DSS $25 \mu\text{g}$ (TA)+LPS).

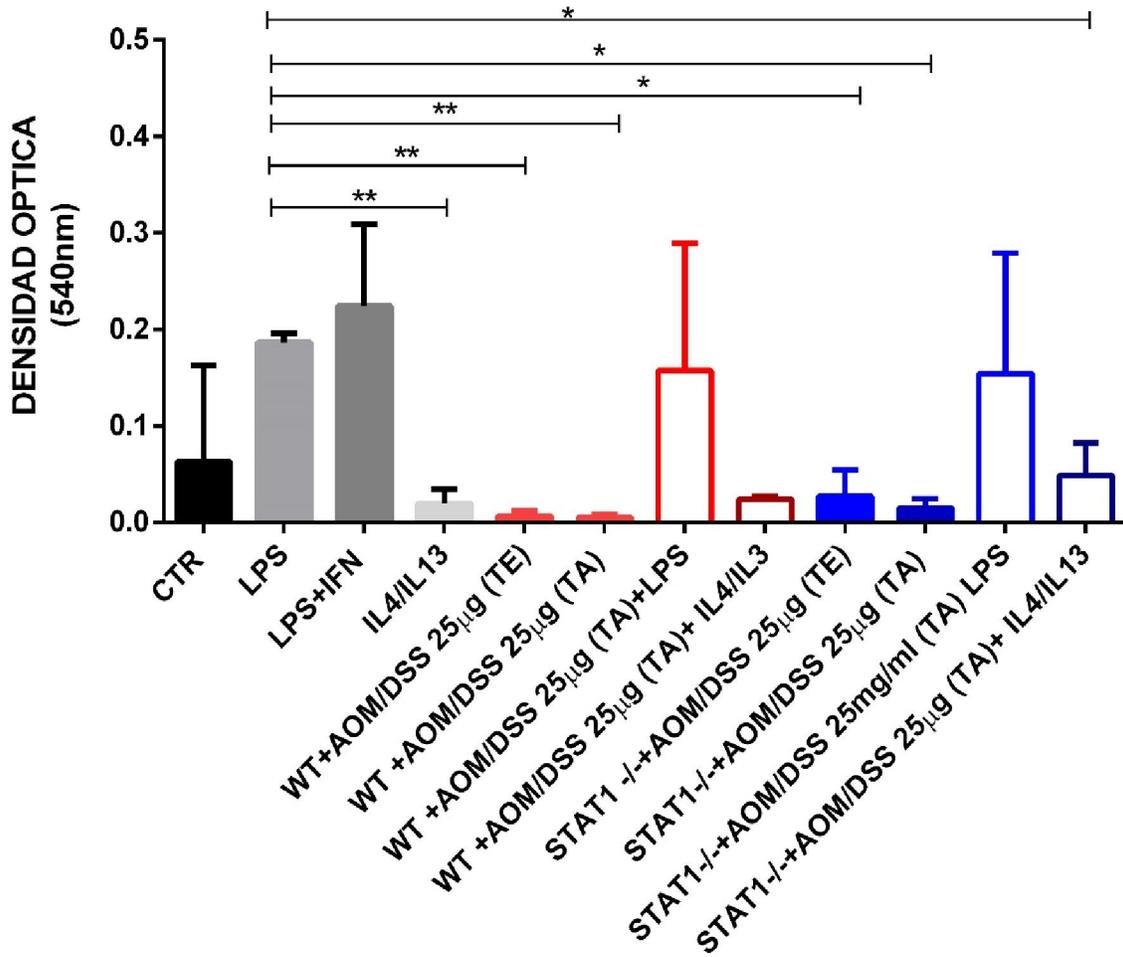


Figura 12: Determinación de óxido nítrico por el método de Griess, en los grupos (CTR, LPS, LPS+IFN γ , IL4/IL13^{**}, WT+AOM/DSS 25 μ g (TE)^{**},

W
T
+
A
O
M
/
D
S
S

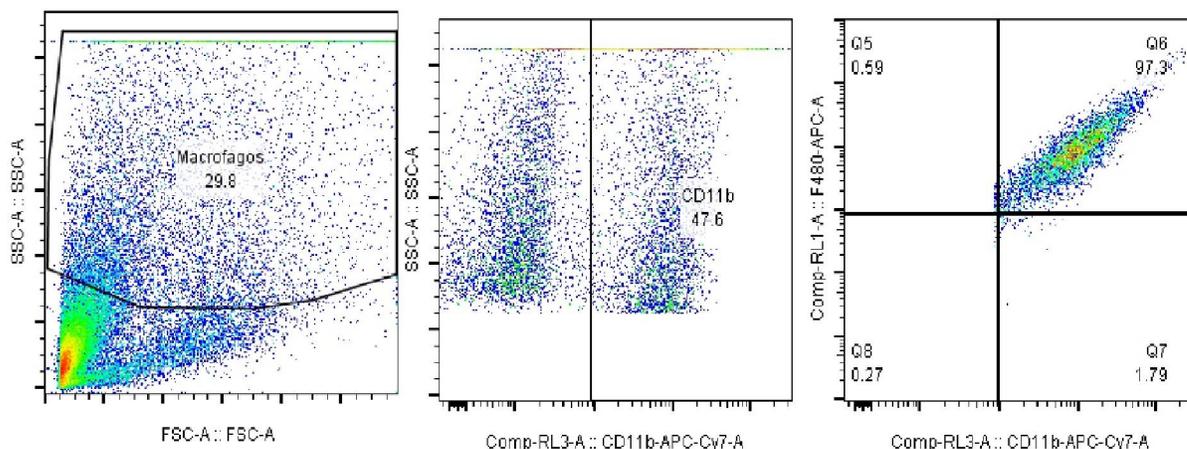
2
5
 μ
g

(
T
A

6.8.-Evaluación de cambios en la expresión de marcadores asociados a macrófagos M1 o M2 en respuesta a los diferentes estímulos, en células diferenciadas a partir de medula ósea de animales WT.

Para corroborar que efectivamente las células presentes en el cultivo se habían diferenciado a macrófagos en presencia de M-CSF y si la presencia de los diferentes estímulos, así como de los macerados tumorales no afectaban su diferenciación, se llevó a cabo un análisis por citometría de flujo (**Figura 13A**). Para ello se escogieron los marcadores como CD11b+ (molécula de adhesión propia de monocitos) y F4/80 (glicoproteína expresada en macrófagos murinos también conocido como EMR1 o Ly71). En la Figura **13B** se observa el porcentaje de células CD11b+F4/80+ en donde el 96% de las células en el cultivo corresponden a macrófagos de manera independiente al estímulo que fue administrado. Estos resultados indican que las células se diferenciaron de manera adecuada y que el cultivo por 48h en particular con los macerados tumorales no afectó su diferenciación y viabilidad.

A)



B)

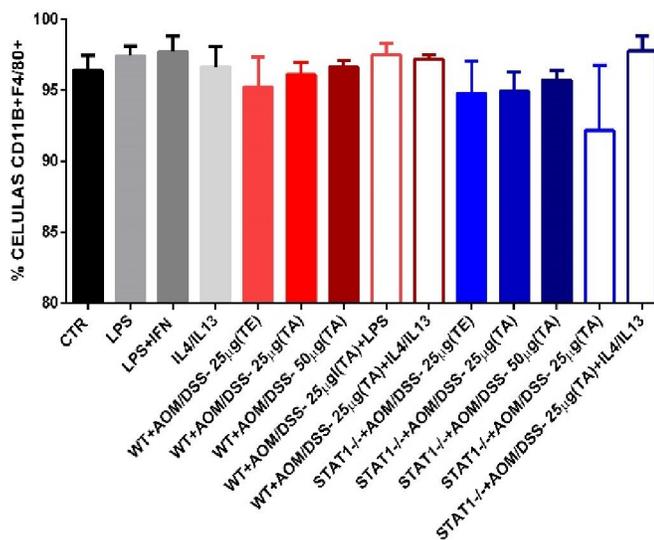
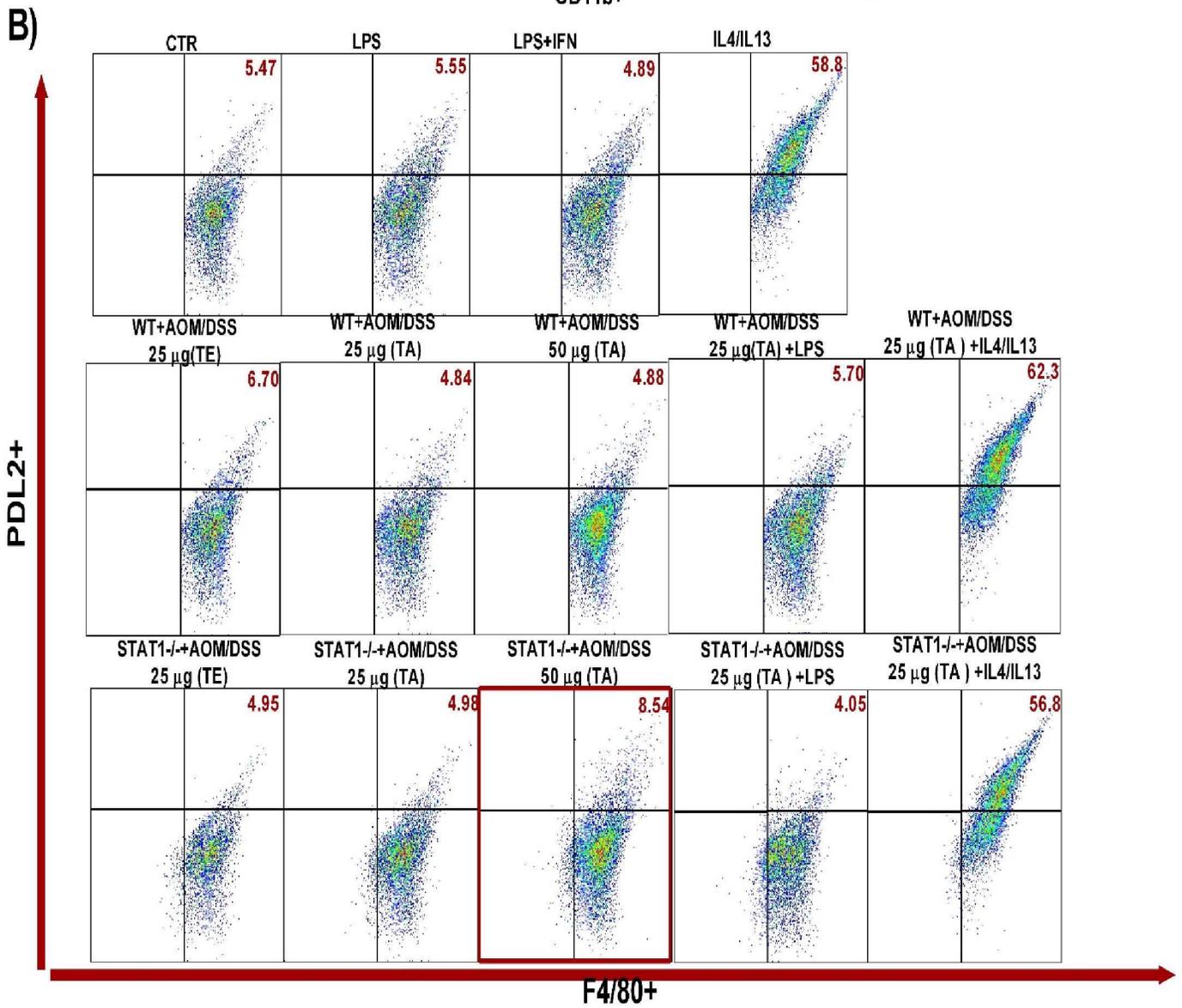
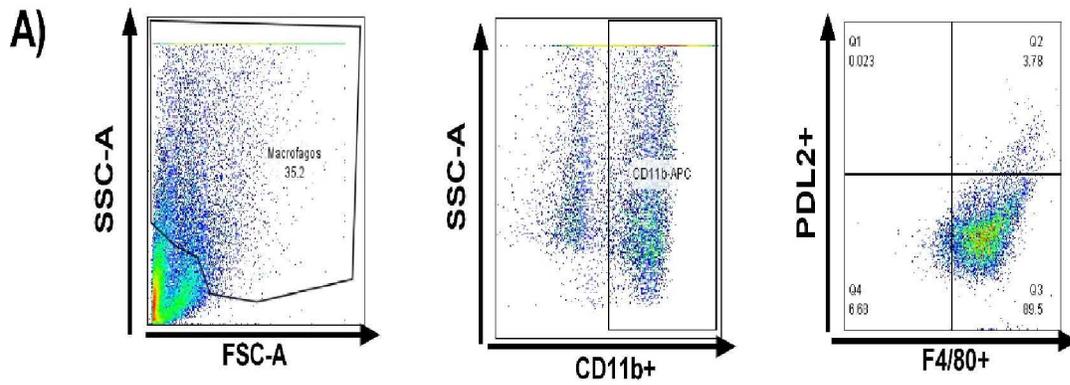


FIGURA 13.- Análisis por citometría de flujo de macrófagos diferenciados a partir de células de medula ósea (CMO) provenientes de ratones WT y estimuladas. A) Imágenes representativas de dot plot. % de células Cd11b+F4/80+. **B)** Grupos analizados por citometría de flujo: (CTR, LPS, LPS+IFN γ , IL-4+IL-13, WT+AOM/DSS-25 μ g (TE), WT+AOM/DSS-25 μ g (TA), WT+AOM/DSS 50 μ g(TA), STAT1 $^{-/-}$ + AOM/DSS-25 μ g (TE), STAT1 $^{-/-}$ +AOM/DSS-25 μ g(TA), STAT1 $^{-/-}$ +AOM/DSS-50 μ g (TA), WT+AOM/DSS-25 μ g(TE)+LPS, STAT1 $^{-/-}$ +AOM/DSS-25 μ g (TE)+IL4/IL13, STAT1 $^{-/-}$ +AOM/DSS-25 μ g(TE)+LPS, STAT1 $^{-/-}$ +AOM/DSS-25 μ g(TE)+IL4/IL13). La adquisición se realizó en el quipo (Invitrogen Attune NxT flow cytometer).

Para determinar si los macrófagos diferenciados que estuvieron en contacto con los macerados tumorales provenientes de diferentes etapas de desarrollo de animales silvestres (WT) o deficientes en STAT1^{-/-}, afectaban la expresión de marcadores de superficie relacionados con macrófagos alternativos, se analizó por citometría de flujo cambios en la expresión del marcador de superficie PDL2. En la Figura **14 A** se muestra la estrategia experimental para seleccionar la región CD11b⁺F4/80⁺PDL2⁺. En la **Figura 14 B** se observan los gráficos representativos de las células estimuladas con los diferentes tratamientos marcadas con los anticuerpos F4/80⁺ PDL2⁺. En la figura **14B y 14C** se observa que los grupos CTR, LPS, LPS+IFN γ expresan en un muy bajo porcentaje PDL2, por el contrario, y como era de esperarse más del 65% de los macrófagos estimulados con IL-4/IL-13 expresan de manera importante PDL-2 lo que coincide con un fenotipo M2. En los grupos que recibieron IL-4/IL13 junto con los macerados tumorales provenientes de animales WT o STAT1^{-/-} no se afectó la respuesta a estas citocinas mostrando porcentajes elevados en la expresión de PDL-2 (>60% células F480⁺PDL2⁺). De manera interesante, los macrófagos estimulados con 50 μ g de macerados tumorales de un ratón STAT1^{-/-}+AOM/DSS de etapa tardía aumentaron la expresión de PDL-2 en comparación con las células control (5.50 en el CTR vs 8.85 en STAT1^{-/-}+AOM/DSS 50 μ g (TA). Sin embargo, no se observan diferencias significativas.



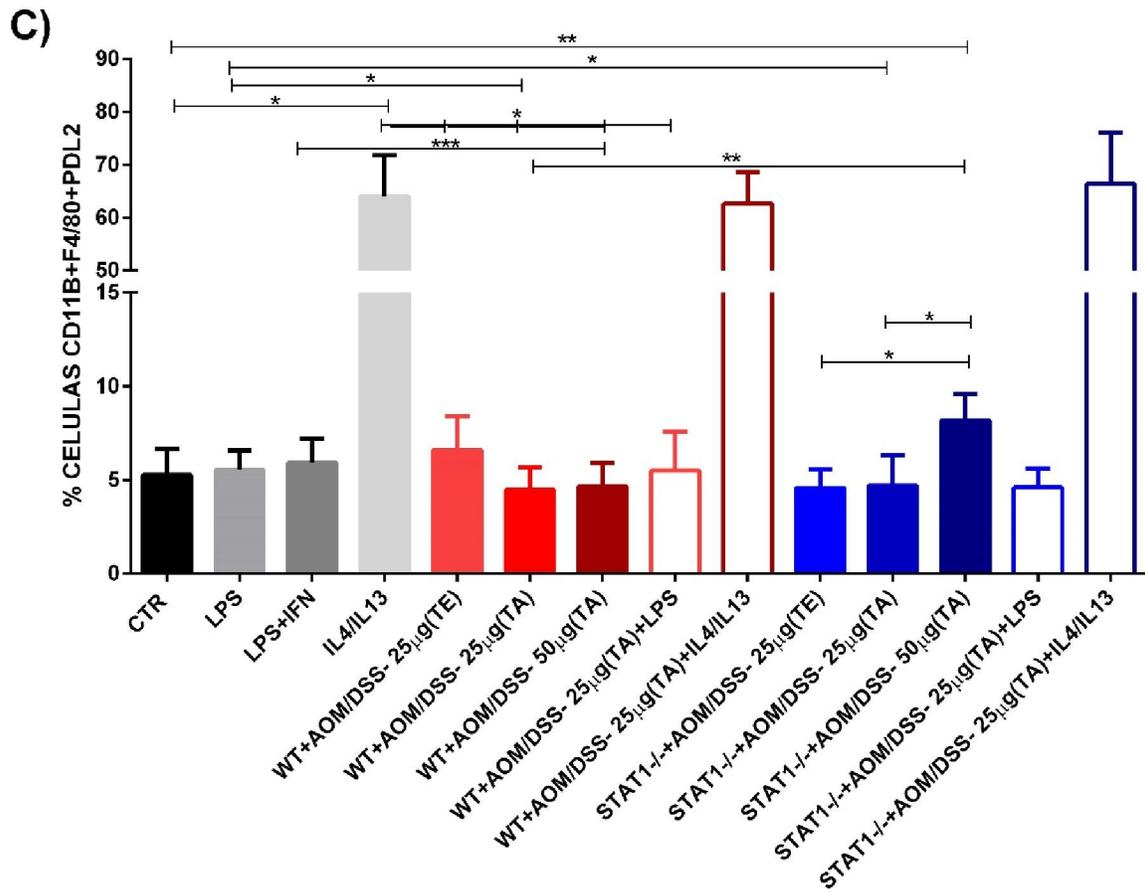


FIGURA 14.- Análisis por citometría de flujo de células de médula ósea (CMO) provenientes de ratones WT diferenciadas y estimuladas. A) Plot's de la estrategia experimental para llevar a cabo el análisis de la citometría de flujo B) Para el análisis de citometría se hizo el análisis de los tratamientos (CTR, LPS, LPS+IFN γ , IL-4+IL-13*, WT+AOM/DSS-25 μ g (TE), WT+AOM/DSS-25 μ g (TA)*, WT+AOM/DSS-50 μ g (TA), STAT1-/-+AOM/DSS-25 μ g (TE), STAT1-/-+AOM/DSS-25 μ g (TA), STAT1-/-+AOM/DSS-50 μ g (TA), WT+AOM/DSS-25 μ g (TE)+LPS, WT+AOM/DSS-25 μ g (TE)+IL4/IL13, STAT1-/-+AOM/DSS-25 μ g (TE)+LPS; STAT1-/-+AOM/DSS-25 μ g (TE)+IL4/IL13) de las células CD11b+ se seleccionaron las F4/80+PDL2+ (perfil alternativo). C) Porcentaje de células CD11b+F4/80+PDL2+. p<0.05 * p<0.01 p<0.001*****

6.9.-El estímulo con macerados tumorales favorece la expresión de FIZZ1 y disminuye la TNF α en los macrófagos.

Para determinar si los macerados tumorales afectaban la expresión de marcadores asociados a macrófagos M1 como iNOS y TNF α o M2 como arginasa-1 y FIZZ1, se llevó a cabo un análisis por medio de un RT-PCR. En la **Figura 15A, B, C** se observa que las células estimuladas con LPS y LPS/IFN γ expresan de manera importante iNOS y TNF α , por el contrario, las células estimuladas con IL4/IL13 expresan en mayor medida Arginasa y en menor proporción TNF α (**Figura 15A, D**). De manera interesante, los macrófagos estimulados con macerados tumorales de ratones silvestres disminuyen la expresión de TNF α e iNOS mientras que promueven una importante expresión de Fizz1 respecto al grupo control (**Figura 15A, B y E**). Estos resultados indican que los macerados tumorales inciden en la expresión de marcadores característicos de los macrófagos y podrían favorecer un perfil M2.

El estímulo con macerados tumorales de animales WT favorece la expresión de Fizz1 y disminuye la expresión de TNF- α en los macrófagos

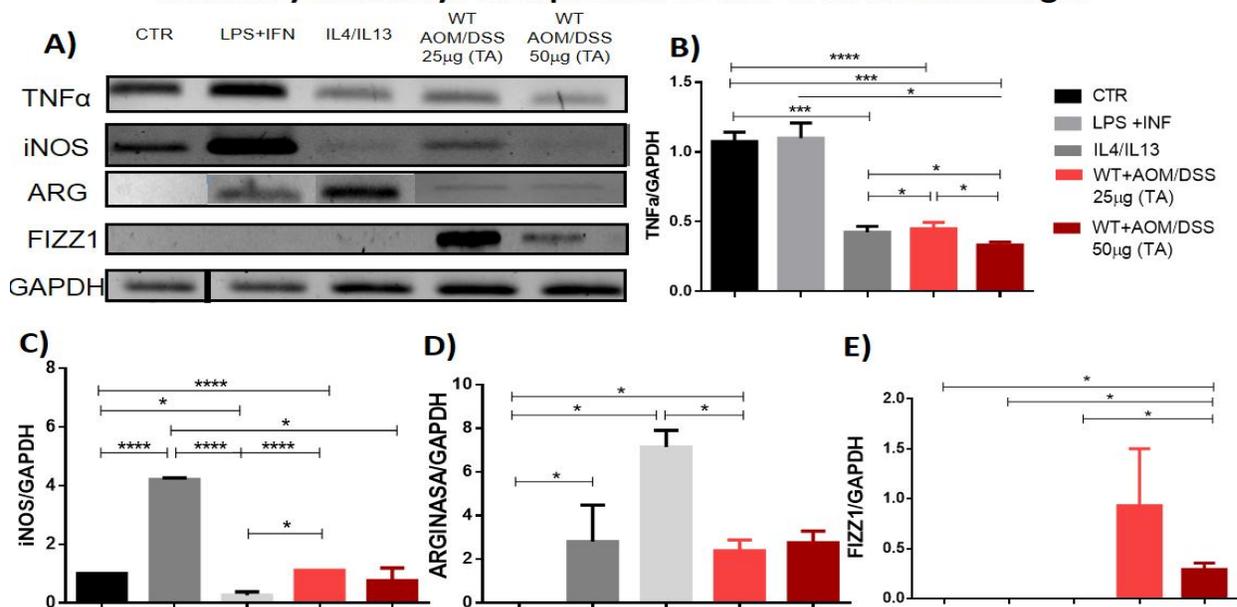


Figura 15.- Análisis de la expresión de marcadores asociados a macrófagos M1 y M2 en los macrófagos que recibieron los diferentes estímulos. **A)** Imagen representativa de la expresión de iNOS, TNF- α , arginasa y FIZZ1 en macrófagos con los tratamientos CTR, LPS+IFN γ , IL4/IL13, WT+AOM/DSS 25 μ g (TA) y WT+AOM/DSS 50 μ g donde tenemos a GAPDH como gen constitutivo. En la Figura **B)** tenemos la gráfica que muestra la expresión de TNF α , **C)** iNOS, **D)** arginasa-1, **E)** Fizz1. p<0.05 * p<0.01** p<0.001***.

6.10.-Macrófagos STAT1^{-/-} estimulados con macerados tumorales de etapas tempranas y tardías.

Con el objetivo de analizar el efecto de los macerados tumorales en macrófagos provenientes de animales STAT1^{-/-}, se obtuvieron células de médula ósea las cuales se cultivaron con M-CSF durante 7 días. Posteriormente, se pusieron en contacto con los diferentes estímulos: LPS, LPS+IFN γ , IL4+IL13 o con los macerados tumorales de etapas tempranas (TE) o tardías (TA) provenientes de animales WT o STAT1^{-/-}.

En la **figura 16** se muestran las células diferenciadas a macrófagos con los diferentes estímulos a las 48 hr, en donde se observa la morfología típica de macrófagos en respuesta a los diferentes tratamientos. Células de médula ósea provenientes de animales WT o STAT1^{-/-} cuando se cultivan con M-CSF proliferan y se diferencian a macrófagos de manera similar.

A)

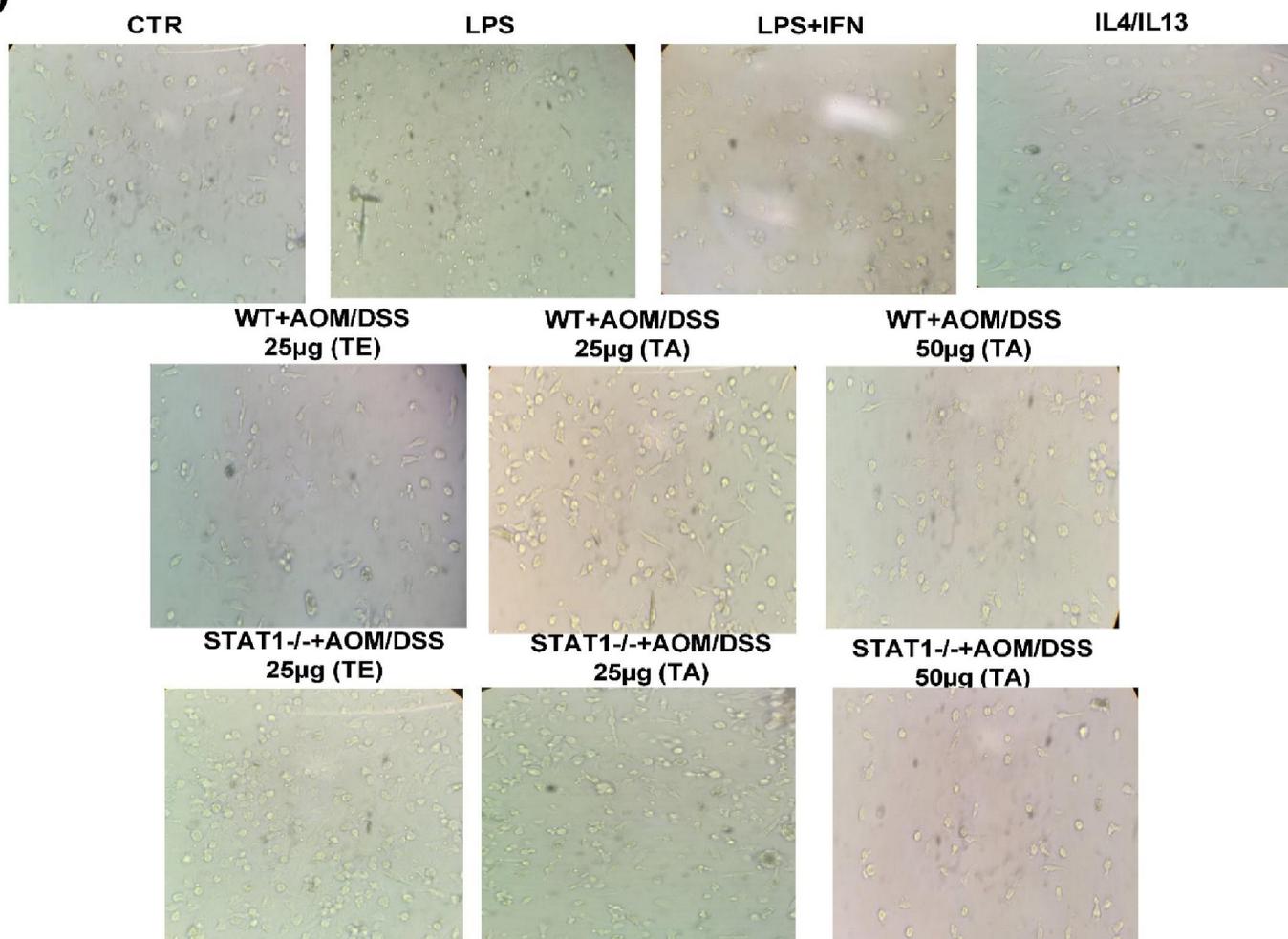


Figura 16.- Células de médula ósea de ratones STAT1^{-/-} cultivadas con M-CSF durante 7 días y que posteriormente recibieron los diferentes estímulos. Comenzando por la esquina superior izquierda tenemos; **A)** CTR, LPS, LPS+IFN γ , IL-4+IL-13, WT+AOM/DSS-25 μ g (TE), WT+AOM/DSS-25 μ g (TA), WT+AOM/DSS-50 μ g(TA), STAT1^{-/-}+AOM/DSS-25 μ g (TE), STAT1^{-/-}+AOM/DSS-25 μ g(TA), STAT1^{-/-}+AOM/DSS-50 μ g(TA) **B)** WT+AOM/DSS-25 μ g (TE)+LPS, STAT1^{-/-}+AOM/DSS-25 μ g(TE)+IL4/IL13, STAT1^{-/-}+AOM/DSS-25 μ g (TE)+LPS, STAT1^{-/-}+AOM/DSS-25 μ g(TE)+IL4/IL13. Se observó en un microscopio óptico a un aumento de 20 \times .

6.10.1.-Evaluación de cambios en la expresión de marcadores asociados a macrófagos M1 o M2 en respuesta a los diferentes estímulos, en células diferenciadas a partir de medula ósea de animales deficientes en STAT1 (STAT1^{-/-}).

Para corroborar que efectivamente las células presentes en el cultivo se habían diferenciado a macrófagos en presencia de M-CSF y si la presencia de los diferentes estímulos, así como de los macerados tumorales no afectaban su diferenciación por tratarse de animales deficientes en STAT1, se llevó a cabo un análisis por citometría de flujo (Figura 17A). Para ello se escogieron los marcadores CD11b⁺ (molécula de adhesión propia de monocitos) y F4/80 (glicoproteína expresada en macrófagos murinos también conocido como EMR1 o Ly71). En la Figura 17B se observa el porcentaje de células CD11b⁺F4/80⁺ en donde el 60% de las células en el cultivo corresponden a macrófagos de manera independiente al estímulo que fue administrado. Sin embargo, es importante mencionar que estas células no se diferenciaron con la misma eficiencia que las células provenientes de un animal WT ya que apenas el 13% fue positivo para el marcador CD11b. De este 13% el 62.7% fueron F4/80⁺.

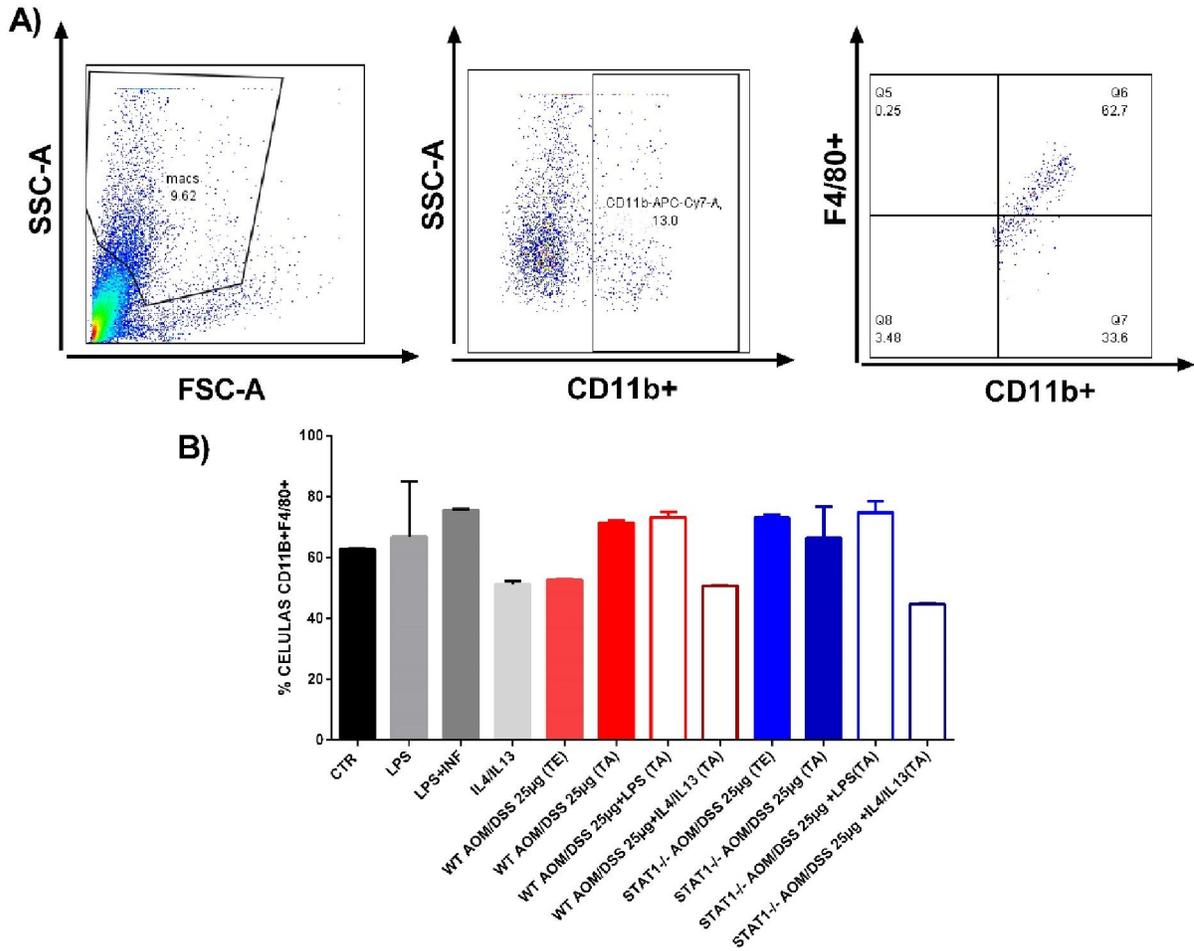
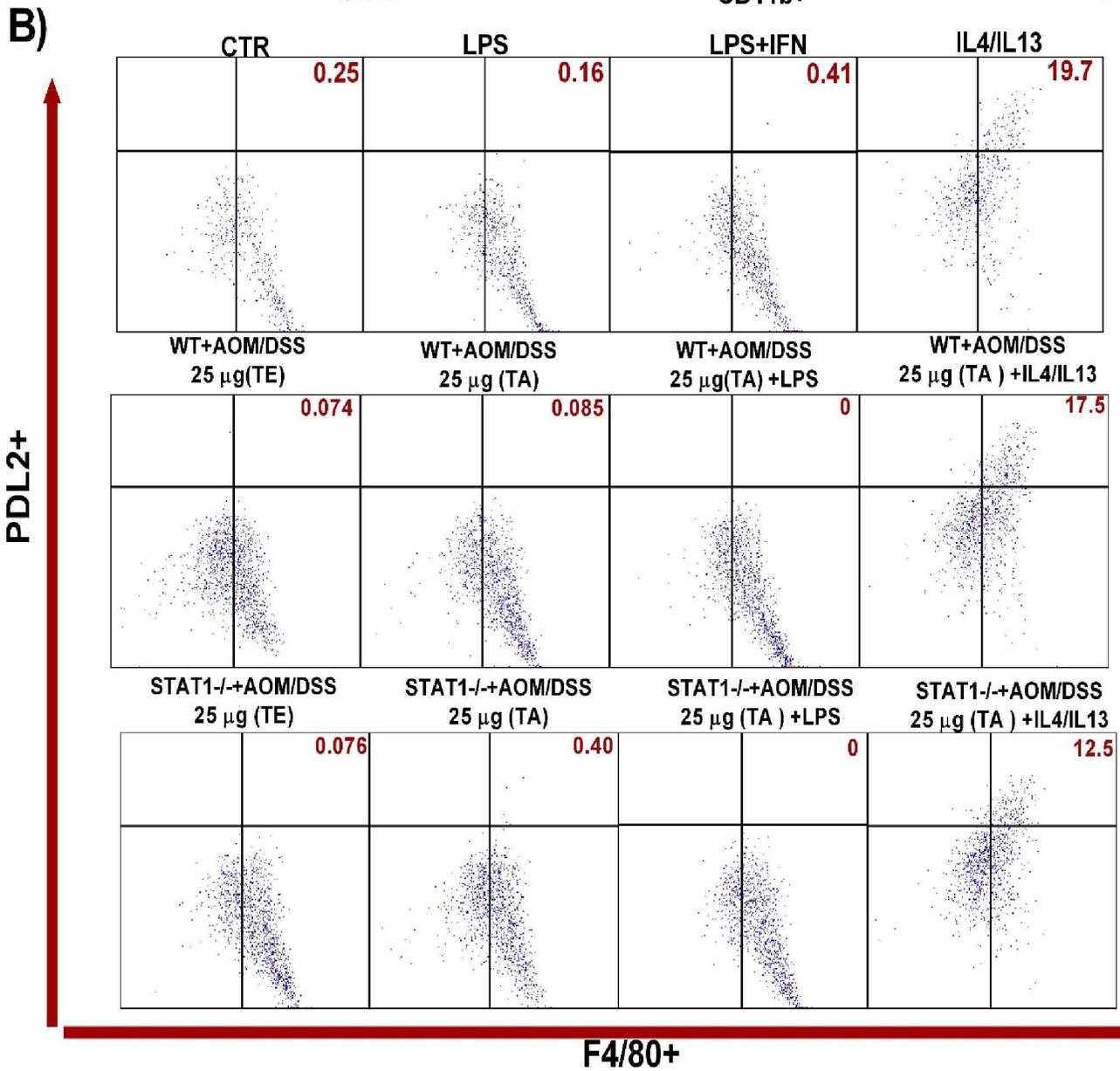
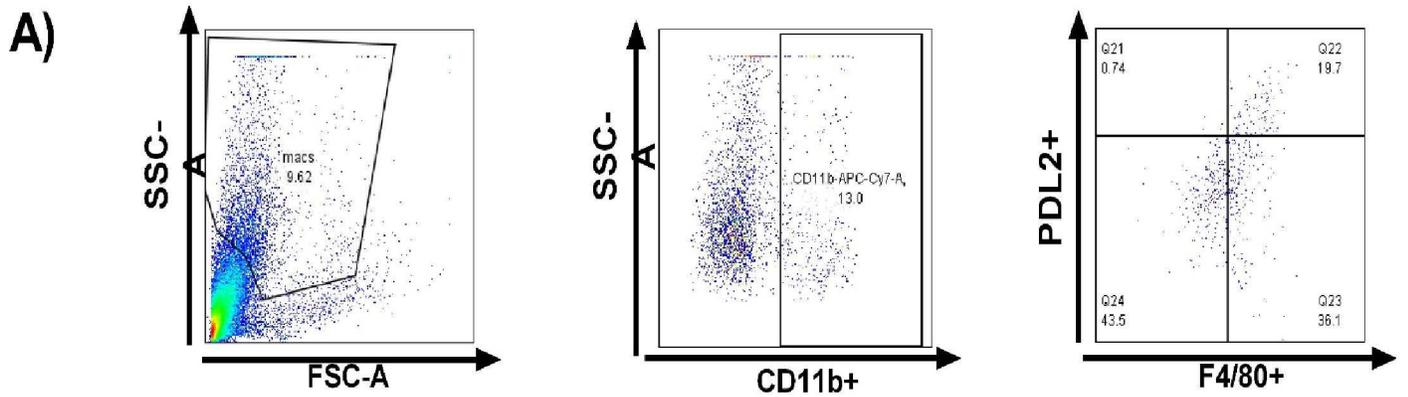


FIGURA 17.- Análisis por citometría de flujo de macrófagos diferenciados a partir de células de médula ósea (CMO) provenientes de ratones STAT1^{-/-} y estimuladas. A) Imágenes representativas de Plot's. **B)** % de células Cd11b+F4/80+: (CTR, LPS, LPS+IFN γ , IL4/IL13, WT+AOM/DSS-25 μ g(TE), WT+AOM/DSS-25 μ g(TA), WT+AOM/DSS-25 μ g(TA)+LPS, WT+AOM/DSS-25 μ g (TA) IL4/IL13, STAT1^{-/-}+AOM/DSS-25 μ g (TE), STAT1^{-/-}+AOM/DSS+25 μ g(TA), STAT1^{-/-}+AOM/DSS-25(TA) LPS, STAT1^{-/-}+AOM/DSS-25 μ g(TA)+IL4/IL13. La adquisición se realizó en el equipo (Invitrogen Attune NxT flow cytometer).

Para determinar si los macrófagos diferenciados que estuvieron en contacto con los macerados tumorales provenientes de diferentes etapas de desarrollo de animales deficientes en STAT1^{-/-}, afectaban la expresión de marcadores de superficie relacionados con macrófagos alternativos, se analizó por citometría de flujo cambios en la expresión del marcador de superficie PDL2. En la Figura **18 A** se muestra la estrategia experimental para seleccionar la región CD11b⁺F4/80⁺PDL2⁺. En la **Figura 18 B** se observan los gráficos representativos de las células estimuladas con los diferentes tratamientos marcadas con los anticuerpos F4/80⁺ PDL2⁺. En la figura **18B y 18C** se observa que los grupos CTR, LPS, LPS+IFN γ expresan en un muy bajo porcentaje PDL2, por el contrario, y como era de esperarse un promedio del 20% de los macrófagos estimulados con IL-4/IL-13 expresan de manera importante PDL-2 lo que coincide con un fenotipo M2. En los grupos que recibieron IL-4/IL13 junto con los macerados tumorales provenientes de animales WT o STAT1^{-/-} no se afectó la respuesta a estas citocinas mostrando porcentajes elevados en la expresión de PDL-2 (>20% células F480⁺PDL2⁺). De manera interesante, los macrófagos estimulados provenientes de medula ósea de ratones STAT1^{-/-}, vemos que se ven disminuidos de manera importante y no se observan diferencias significativas, esto probablemente se deba al poco número de células que se diferenciaron. Sería interesante evaluar si la deficiencia en STAT1 afecta la diferenciación de células CD11b.



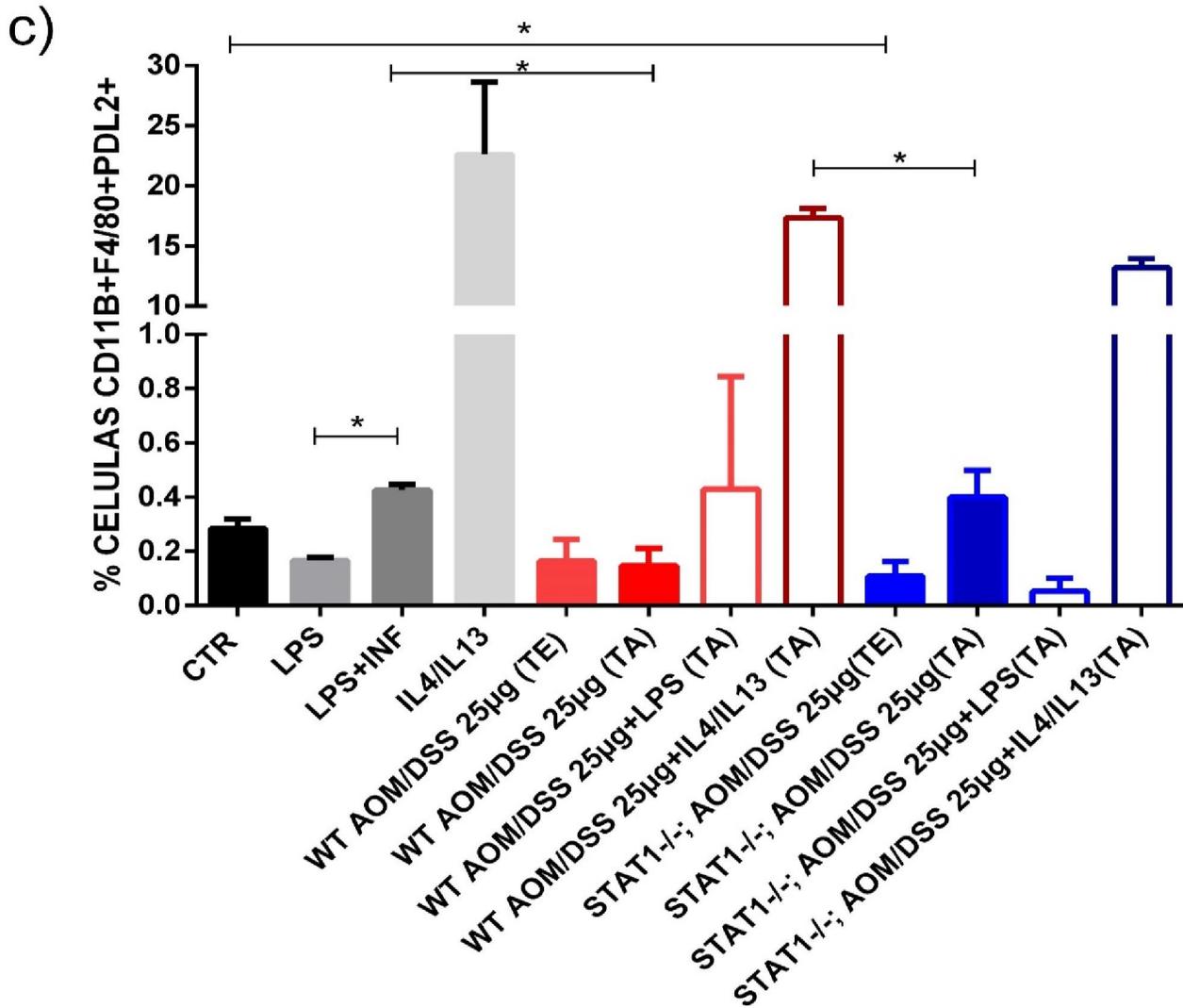


FIGURA 18.- Análisis por citometría de flujo de células de médula ósea (CMO) provenientes de ratones STAT1^{-/-} diferenciadas y estimuladas, A) Plot's de la estrategia experimental para llevar a cabo el análisis de la citometría de flujo B) Para el análisis de citometría se hizo el análisis de los tratamientos(CTR, LPS, LPS+IFN γ , IL-4+IL-13*, WT+AOM/DSS 25 μ g (TE), WT+AOM/DSS 25 μ g (TA)*, WT+AOM/DSS 50 μ g (TA), STAT1^{-/-}+AOM/DSS 25 μ g (TE), STAT1^{-/-}+AOM/DSS 25 μ g (TA). STAT1^{-/-}+AOM/DSS 50 μ g (TA), WT+AOM/DSS 25 μ g (TE)+LPS, WT+AOM/DSS 25 μ g (TE)+IL4/IL13, STAT1^{-/-} AOM/DSS25 μ g (TE)+LPS, STAT1^{-/-}+AOM/DSS 25 μ g (TE)+IL4/IL13) de las células CD11b⁺ se seleccionaron las F4/80+PDL2⁺ (perfil alternativo). C) Porcentaje de células CD11b⁺F4/80+PDL2⁺. p<0.05 *.

Discusión

En este estudio se mostró que la inducción de CAC con AOM+DSS no se desarrolla de la misma manera en animales silvestres (WT) y deficientes en STAT1 (STAT1^{-/-}). Los ratones STAT1^{-/-} podrían ser más susceptibles, ya que presentaron una reducción en el peso corporal considerable y un mayor índice de daño de la enfermedad en comparación a los animales silvestres. Estudios previos en el laboratorio mostraron que los animales STAT1^{-/-} durante el desarrollo del CAC presentan un aumento en la inflamación, en la formación de tumores, así como en la proliferación de las células epiteliales en el colon, indicando que STAT1 actúa como una molécula supresora de tumores durante el cáncer colorrectal (León-Cabrera *et al.*, 2018). El hecho de que los tumores se desarrollen de manera más rápida en deficiencia de STAT1, sugiere que el microambiente tumoral es distinto y que puede ser propicio para favorecer el crecimiento de estos. Los macrófagos asociados a tumores (TAM's) son el principal componente de los infiltrados leucocitarios en el estroma de varios tumores y son reguladores clave entre la inflamación y el cáncer (Cavnar MJ *et al.*, 2017). Los macrófagos residentes de tejido circundante son reclutados dentro y alrededor del tumor mediante la secreción de moléculas quimio-atrayentes y factores de crecimiento (CSF-1/M-CSF, GM-CSF, VEGF y CCL2/MCP-1) derivadas de células tumorales. Sin embargo, cuando el tumor llega a desarrollarse por completo, monocitos circulantes llegan a infiltrarse dentro del tejido tumoral mediante la liberación de CCL2 por parte de las células tumorales y llegan a madurar a TAM's. Además, existe evidencia que sugiere que los macrófagos derivados de monocitos y los macrófagos residentes de tejido pueden coexistir dentro del estroma tumoral. Por lo tanto, en este trabajo se estudió si los macerados tumorales obtenidos de diferentes etapas dentro del crecimiento tumoral podrían influir en la diferenciación de los macrófagos utilizando marcadores propios de macrófagos M1 o M2.

La obtención de tumores tanto de las etapas tempranas como tardías día 40 y 68 respectivamente, se obtuvieron a partir del modelo experimental (Tanaka *et al.*; 2009- León-Cabrera 2017), sin embargo, en este modelo la etapa temprana es el día 20 para este experimento consideramos el día 40 como etapa temprana debido que en esta etapa ya tenemos tumores establecidos; y el objetivo es saber si los macrófagos están involucrados en el desarrollo tumoral y el microambiente, y cuál es el perfil predominante en este microambiente dentro de los TAM's.

Al obtener extractos de tumor vimos la integridad de las proteínas, donde las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración. Empleando geles

de sílice o de acetato de celulosa y aplicando las proteínas en una zona estrecha en torno a los electrodos se pueden determinar diferencias de carga neta (carga total/masa) entre proteínas (Chen *et al.*; 2010). Por lo tanto, si las bandas quedan en la parte más cercana al corrimiento sabremos que son proteínas de alto peso molecular y por el contrario si se alejan más podremos decir que son de menos peso molécula (Bandow J. *et al.*, 2008). En esta ocasión lo único que nos interesaba era saber si estaban integras por lo cual nuestro criterio fue que si aprecian las bandas quiere decir que las proteínas estaban en buen estado.

Por otro lado, tenemos la diferenciación de macrófagos derivados de médula ósea (MDMO), se trabajó este grupo celular por la plasticidad que presentan incluso después de la diferenciación, esto les permite adaptarse a un entorno cambiante y aun así cumplir con sus funciones inmunitarias (Ruweka *et al.*, 2014), Una vez diferenciadas las células de médula ósea a macrófagos a partir de factor estimulante de colonias de macrófagos; se les agregan estímulos de citocinas como LPS, LPS+INF γ , IL4+IL13 y los macerados de los tumores son del día 40 y 68 de la inducción del CAC, tanto para los ratones WT como los ratones STAT 1-/. Los lipopolisacáridos (LPS) son usados para diferenciar un perfil M1, interferón (IFN γ) ya que es un factor estimulante de macrófagos, interleucina-4 (IL-4) usado para identificar a los macrófagos con un perfil M2; ya que actúa como antiinflamatorio al bloquear la síntesis de IL-1, TNF- α , IL-6 y la proteína inflamatoria del macrófago y por último la interleucina-13 (IL-13) también usado para diferenciar el perfil M2; ya que modula la producción de IL-1, TNF IL-8 y de la proteína inflamatoria del macrófago. Estimula el crecimiento y la diferenciación de las células B, e inhibe las células Th1, así como la producción de citocinas inflamatorias (Marech *et al.*, 2016-Benoit *et al.*, 2008). Al colocarlos extractos de los tumores tanto de ratones WT (AOM) como los ratones STAT 1-/- (AOM); se busca entender el papel que juegan los macrófagos y saber hacia qué perfil se dirigen.

d
e

l
a
s

c
é
l
u
l
a
s

e
s
t
i
m

murinos, cambios fagolisosomales y aumento en la expresión de MHC II, CD86 y

d
e

l
a

Para identificar las células se realizó el análisis por citometría, el cual se llevó a cabo a partir de la diferenciación de las células obtenidas de medula ósea y previamente diferenciadas con el M-CSF, y en presencia de los diferentes tratamientos en los cuales se incluyen los macerados de tumor; que incluyen a los TAM's; por lo cual inferimos que los TAM's están involucrados en la liberación de numerosos factores como las citocinas los factores de crecimiento que influyen en el comportamiento de las células tumorales. Se considera que los monocitos tienen plasticidad funcional y fenotípica que les permite diferenciarse en dos estados de polarización: los macrófagos M1 y M2, dependiendo del entorno de las citocinas en el microambiente tumoral (Lundholm. *et al.*, 2015). En este análisis tenemos los anticuerpos que van desde los que marcamos monocitos circulantes hasta los anticuerpos particulares para los macrófagos M2; donde CD11B (para monocitos); F4/80 (para macrófagos); MMR receptor de manosa o CD206 (macrófagos de perfil alternativo M2) y PDL2-PE o B7-DC se denomina también ligando de muerte 2 programado (macrófagos alternativos M2) marcadores de superficie celular, donde se hizo el análisis en conjunto para CD11B+F4/80+ obteniendo así las doble positivas el cual fue el indicativo de que efectivamente lo macrófagos con tratamiento estaban presentes aproximadamente en un 95%. (Duque *et al.*, 2007-Souza., 2014). El marcador PDL2 es uno de los más utilizados para la identificación de los macrófagos M2 ya que se ha demostrado que monocitos circulantes estimulados en presencia de IL-4 expresan cantidades importantes de PDL-2 y se consideran como macrófagos alternativos (Mahesh G.U. *et al.*, 2014 -N. Rozali. E.*et al.*, 2012). En nuestros experimentos las células CTR no mostraron un aumento en la expresión de PDL-2, por el contrario, como era de esperarse los macrófagos estimulados con IL4/IL3 expresaron cantidades importantes. Se observó que una vez que se colocaban los tratamientos con extractos de tumor en los grupos vemos que hay un ligero aumento en la expresión de PDL-2 en los tratamientos de etapa tardía con una concentración de 50µg tanto en los extractos de tumor provenientes de ratones WT y STAT1-/-, sugiriendo que los componentes presentes en los macerados tumorales pueden influir en la diferenciación de los macrófagos en el microambiente tumoral

a En el análisis de RT-PCR vemos que la expresión de genes relacionados con los TAM's y su polarización de los macrófagos hacia un fenotipo proinflamatorio (M1) o antiinflamatorio (M2), en respuesta a los diferentes tratamientos (CTR, DPS+IFNγ, IL4/IL13, WT+AOM/DSS 25µg (TA) y WT+AOM/DSS 50µg), vemos la

n

c
é
l
u
l

expresión de genes relacionados con ambos perfiles basándonos en trabajos previos donde vieron que los esplenocitos adherentes enriquecidos para macrófagos se cultivaron con o sin lipopolisacárido (LPS), una combinación de interferón (IFN γ) y factor de necrosis tumoral (TNF α) o interleucina (IL-4). Donde el papel de marcadores M1, fueron el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), IL-6, IL-1 β y TNF- α y M2, incluyendo arginasa-1 (Arg1), Ym1 y encontrado en la zona inflamatoria 1 (FIZZ1) (Mahbub S.*et al.*, 2012), donde vemos que efectivamente el grupo control positivo (LPS+IFN γ) para el perfil M1 se denota un aumento considerable con respecto a los otros tratamientos obteniendo así diferencias significativas comparadas para iNOS (McNeill *et al.*; 2015); siendo así que para TNF α vemos un aumento en el control positivo lo cual concuerda con estudios previos, siendo aquí el dato interesante el cual nos lleva a inferir que se está expresando un perfil M1 en el control positivo (Campos M. *et al.*, 2006). Para ver la expresión de los macrófagos M2 se tomó en cuenta la expresión de los genes arginasa-1 y Fizz1, al medir la arginasa-1 se sabe que está implicada en relación con SOCS1 para que los macrófagos se conviertan en M2 secretando expresando así la ARG-1 (Briken V. ; M. Mosser D. 2011), en los resultados presentados vemos una ligera elevación de ARG-1 en los grupos (WT+AOM/DSS 25 μ g (TA) y WT+AOM/DSS(TA) 50 μ g) sin embargo no vemos diferencias significativas entre los grupos; el otro gen implicado en la diferenciación de los M2 es FIZZ1 producen en grandes cantidades en la inflamación alérgica y en otros estados patológicos en los que prevalece una respuesta de Th2 altamente polarizada; donde vemos que los tratamientos con extractos de tumor (WT+AOM/DSS 25 μ g (TA) y WT+AOM/DSS(TA) 50 μ g); son los únicos que están expresando este gen (Mahbub S.*et al.*, 2012); lo cual podría ser interpretado que al presentar la expresión de ambos genes tenemos la presencia de TAM's sin embargo no podríamos asegurar en qué medida se están expresando tanto los M1 como los M2 ya que ambos son extractos de etapa tardía, y vemos ambos perfiles expresados en ambos extractos de tumor.

Conclusión

- Durante la inducción del CAC los ratones deficientes en STAT1-/- presentaron un desarrollo tumoral acelerado acompañado de un mayor

índice de daño de la enfermedad, una mayor pérdida de peso corporal y la aparición de un número importante de tumores en etapas tempranas (día 40) en comparación con animales WT.

- La proliferación y la viabilidad celular de los macrófagos cultivados en presencia de macerados tumorales provenientes de ratones WT o STAT1^{-/-} no se vio afectada por la presencia de estos.
- En el gel de integridad de proteínas, resulta interesante que las bandas proteicas provenientes de animales diferentes presentan en algunos casos patrones distintos. En este caso no se analizaron las diferencias entre ratones, pero resultaría interesante tomar en cuenta el tamaño del tumor y su efecto en la diferenciación de los macrófagos.
- No se observaron diferencias en la producción de ON en respuesta a los macerados tumorales.
- En los macrófagos estimulados con macerados de tumores desarrollados en animales WT, la expresión de TNF- α (relacionada con la activación clásica) se vio disminuida, mientras que la expresión de FIZZ1 (relacionada con la activación alternativa) se vio favorecida.
- Se obtuvo un menor porcentaje de células CD11b⁺ a partir de la diferenciación de células de médula ósea STAT1^{-/-}.
- En macrófagos deficientes en STAT1 no se observaron diferencias en respuesta a los macerados tumorales.
- Estos resultados sugieren que los tumores WT o STAT1^{-/-} interactúan de manera directa con los macrófagos e influyen de manera diferente en la diferenciación de estas células. Esto podría tener implicaciones importantes en el inicio y/o la progresión tumoral.

Literatura citada

- Abbas A.K. Lichtman A. H. y Pober J. S. 5^o Ed. "Inmunología celular y molecular". Sanunders-Elsevier. (2004).
- Arnold Melina, S Sierra Mónica, Laversanne Mathieu, Soerjomataram, Isabelle, Jemal Ahmedin, Bray Freddie (2016). "Global patterns and trends in

colorectal cáncer incidence and mortality”. Downloaded from <http://gut.bmj.com/> on August 11, 2016 - Published by group.bmj.com

- Bandow J, Baker JD, Berth M, Painter C, et al.: Improved image analysis workflow for 2-D gels enables large-scale 2-D gel-based proteomics studies - COPD biomarker discovery study. *Proteomics* 2008
- Becerra, D.M. (2013) “ PAPEL DE LA MOLÉCULA STAT-1 EN LA RESPUESTA INMUNE Y RESISTENCIA A LA INFECCIÓN CON TAENIA CRASSICEPS” Tesis Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México. 98pp.
- Benoit Marie, Desnues Benoît y Louis Mege-Jean “J Immunol 15 de septiembre de 2008, 181 (6) 3733-3739; DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.3733>
- Bousoik E., and Montazeri H. Al., (2018): “Do We Know Jack” About JAK? A Closer Look at JAK/STAT Signaling Pathway”; Published online, doi: 10.3389/fonc.2018.00287; PMCID: PMC6079274; PMID: 30109213
- Briken V. Y M. Mosser D. (2011): “Editorial: Switching on arginase in M2 macrophages”. *Lista de revistas J Leukoc Biol* PMC3206469; *J Leukoc Biol.* 2011 Nov; 90(5): 839–841. doi: 10.1189/jlb.0411203; PMCID: PMC3206469; PMID: 22045920.
- Capece D., Fischietti M., Verzella D., Gaggiano A., Ciccirelli G., Tessitore A., Zazzeroni F., y Alesse E. (2013):” El microambiente inflamatorio en el carcinoma hepatocelular: un papel fundamental para los macrófagos asociados a tumores”: *Biomed Res*: 187204. doi: 10.1155 / 2013/187204; PMCID: PMC3591180; PMID: 23533994.
- Cavnar MJ, Turcotte S., Katz S.C., Kuk D., Gönen M., Shia J., Allen PJ, Balachandran VP, D'Angelica MI, Kingham TP, Jarnagin WR., DeMatteo RP.(2017): “Tumor-Associated Macrophage Infiltration in Colorectal Cancer Liver Metastases is Associated With Better Outcome.” *Ann Surg Oncol.* 2017 Jul;24(7):1835-1842. doi: 10.1245/s10434-017-5812-8.
- Chen H., Wang D, Bai C, Wang X. (2010); “Proteomics-based biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease”. *J Proteome Res.* Jun 4;9(6):2798-808. doi: 10.1021/pr100063r.
- Cuatrecasas Freixas, Miriam (2011); “Infiltración linfocitaria en el cáncer colorectal. Valor pronóstico”: Implicaciones clínicas de la investigación básica, servicio de Anatomía patológica. Centro de Diagnóstico biomédico. Hospital Clínic. Barcelona. España; *GH CONTINUIDAD.* Septiembre- octubre 2011. VOL. 10 N.º 5; p.p: 225.

- Dae-Sung, L., J.Won- Kyo, et al. (2013). "Ixeris dentata NAKAI Reduces Clinical Score and HIF-1 Expression in Experimental Colitis in Mice". Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2013:9.
- Duque Correa M.A., Rojas López M. (2007). "ALTERNATIVE MACROPHAGE ACTIVATION: THE DIVERSITY OF ONE CELL INVOLVED IN INNATE IMMUNITY IN RESPONSE TO ITS ENVIRONMENTAL COMPLEXITY". Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de Medicina, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Inmunología Vol. 26 / Núm 2/ Abril-Junio 2007: 73-86.
- Edin S, Wikberg ML, Dahlin AM, Rutegård J, Öberg A., et al. (2012) The Distribution of Macrophages with a M1 or M2 Phenotype in Relation to Prognosis and the Molecular Characteristics of Colorectal Cancer. PLoS ONE 7(10): e47045. doi: 10.1371/journal.pone.0047045.
- Edin S, Wikberg ML, Rutegård J, Oldenborg P-A, Palmqvist R (2013) Phenotypic Skewing of Macrophages *in Vitro* by Secreted Factors from Colorectal Cancer Cells. PLoS ONE 8(9): e74982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074982>.
- Fuente M. L., Hermoso M.R., Abedrapo M., Carrillo K.G., López S. N.:(2017); "Mediadores inflamatorios y su influencia en la evolución del cáncer colorectal": Laboratorio de Inmunidad Innata; Programa de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile; Departamento de Cirugía, HCUCH.
- Jablonski Kyle A., Amici Stephanie, M. Webb Lindsay, Ruiz-Rosado Juan de Dios, G. Popovich Phillip, Partida-Sánchez Santiago, y Guerau-de-Arellano Mireia 1, * "Nuevos marcadores para delinear los macrófagos murinos M1 y M2". PLoS One. 2015; 10 (12): e0145342.
- Kaler P., Y Benjamin. Owusu, Augenlicht Leonard, and Klampfe Lidija. "The Role of STAT1 for Crosstalk between Fibroblasts and Colon Cancer Cells": Front Oncol. 2014; 4: 88.
- Klampfer L., Huang J., Corner G., Mariadason J., Arango D., Sasazuki T., Shirasawa S., Augenlicht L. (2003). "Oncogenic Ki-ras inhibe la expresión de genes que responden al interferón a través de la inhibición de STAT1 y Expresión STAT2". J. Biol. Chem. 2003; 278: 46278 - 46287.
- León-Cabrera S.A., Molina-Guzman E., Delgado-Ramirez YG., Vázquez-Sandoval A., Ledesma-Soto Y., Pérez-Plasencia C.G., Chirino Y.I., Delgado-Buenrostro NL., Rodríguez-Sosa M., Vaca-Paniagua F., Ávila-Moreno F, Gutierrez-Cirlos EB, Arias-Romero LE, Terrazas LI.(2017): "Lack of STAT6 Attenuates Inflammation and Drives Protection against Early Steps of

Colitis-Associated Colon Cancer". *Cancer Immunol Res.* 2017 May;5(5):385-396. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0168. Epub 2017 Apr 6.

- León-Cabrera, S. A. Vázquez-Sandoval A., Molina-Guzmán E., Terrazas L. I. (2018) "RECLUTAMIENTO DE MACRÓFAGOS ASOCIADOS A TUMORES DURANTE EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE COLON ASOCIADO A COLITIS (CAC) EN DEFICIENCIA DE STAT1": Unidad de Biomedicina, FES-Iztacala, UNAM. 2Laboratorio Nacional en Salud, FES-Iztacala, UNAM.
- Lundholm, M., Hägglöf, C., Wikberg, M. L., Stattin, P., Egevad, L., Bergh, A., . Edin, S. (2015). Secreted Factors from Colorectal and Prostate Cancer Cells Skew the Immune Response in Opposite Directions. *Scientific Reports*, 5, 15651. doi: 10.1038/srep15651
- McNeill E., Crabtree M., Sahgal N., Chuaiphichai S., Iqbal A., Greaves D., y M. Channon. (2015): "Regulation of iNOS function and cellular redox state by macrophage Gch1 reveals specific requirements for tetrahydrobiopterin in NRF2 activation" *Free Radic Biol Med.* 2015 Feb; 79: 206–216. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.575, PMID: PMC4344222, PMID: 25451639.
- Mahbub S., Deburghgraeve C., Kovacs E.: (2012). "Advanced Age Impairs Macrophage Polarization". *J Interferon Cytokine Res.* 2012 Jan; 32(1): 18–26. doi: 10.1089/jir.2011.0058.
- Mahesh G. U., M. Girgis Natasha, Ruckerl D., Jenkins S., N. Ward L., D. Kurtz Z., E. Wiens K., San Tang M., Basu-Roy U., Mansukhani A., E. Allen J., and Loke P'ng. (2018) "Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct", University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom. From www.bloodjournal.org by guest on August 30, 2018. For personal use only.
- Marech Ilaria, Ammendola Michele, Sacco Rosario, Sammarco Giuseppe, Zuccalà Valeria, Zizzo Nicola, Leporini Christian, Luposella Maria, Patruno Rosa, Filippelli Gianfranco, Russo Emilio, Porcelli Mariangela, Damiano Gadaleta Cosmo, De Sarro Giovambattista, y Ranieri Girolamo : "Tumour-associated macrophages correlate with microvascular bed extension in colorectal cancer patients". *J Cell Mol Med.* 2016 Jul; 20(7): 1373–1380.
- Mudter J., Weigmann B., Bartsch B., Kiesslich R., Strand D., Galle PR, Lehr HA, Schmidt J., Neurath MF (2005) "Patrón de activación de transductores de señal y activadores de factores de transcripción (STAT) en el intestino inflamatorio enfermedades ". *m. J. Gastroenterol.* 2005; 100 : 64-72.

- N. Rozali E., V. Hato St., W. Robinson B., Lake R., and Joost Lesterhuis W., (2012): "Cancer-Induced Immune Suppression" Review Article; Hindawi Publishing Corporation Clinical and Developmental Immunology. Volume 2012, Article ID 656340, 8 pages doi:10.1155/2012/656340.
- Rostom A, Dube C, Lewin G, Tsertsvadze A, Barrowman N, Code C, Sampson M, Moher D; (2007) "Non-steroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of adenoma and colorectal cancer, but the risks do not compensate this benefit". US Preventive Services Task Force. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors for primary prevention of colorectal cancer: a systematic review prepared for the US Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2007; 146:376-89.
- Ruweka F.M., Reyes JL, Iannuzzi J, Leung G, McKay DM (2014) The Pro-Inflammatory Cytokine, Interleukin-6, Enhances the Polarization of Alternatively Activated Macrophages. *PLoS ONE* 9(4): e94188. doi: 10.1371/journal.pone.0094188.
 - Sánchez-Barriga J.J. (2016) "Mortality trends and risk of dying from colorectal cancer in the seven socioeconomic regions of Mexico, 2000-2012" *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, Volume 82, Issue 3, July–September 2017, Pages 217-225. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2016.10.005>
 - Sánchez, D. G. (2008). *GACETA MEXICANA DE ONCOLOGÍA*. México: MASSON DOYMA MÉXICO.
 - Schreiber S., Rosenstiel P., Hampe J., Nikolaus S., Groessner B., Schottelius A., Kühbacher T., Hämling J., Fölsch UR, Seegert D. (2002) "Activación del transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) 1 en la enfermedad inflamatoria intestinal crónica humana. *Intestino*". 2002; 51: 379-385. doi: 10.1136 / guta.51.3.379.
 - Sica Antonio y Mantovani Alberto (2012): "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas". *J Clin Invest.* 2012 Mar 1; 122(3): 787–795.
 - Souza A.I. (2014) Avaliação de populações de macrófagos M1 e M2 em camundogos com capacidade diferente de alabarar resposta imune celular contra *Mycobacterium tuberculosis*; Orientadora: Dra. Vania Luiza Deperon Bonato. Riberão Preto, São Paulo. Universidad de Sau Paulo.
 - Solís M.R., Hernández-F.G., Ochoa C.F., Ortiz L. P., Bravo C.A. (2015) Macrófagos asociados a tumores contribuyen a la progresión del cáncer de próstata *GACETA MEXICANA DE ONCOLOGÍA*. México: MASSON DOYMA MÉXICO. 14(2):97---102.

- Tao, F.Q, Cheng, G, Wenjie, L, Qiong, X, Qiang, S, Yang. (2013) .Inhibition of Th1/Th17 responses via suppression of STAT1 and STAT3 activation contributes to the amelioration of murine experimental colitis by a natural flavonoid glucoside icariin. *Biochemical Pharmacology*. El Servier. 85 (2013) 798–807.
- Valdivia S.J. E., García-Zepeda E. (2011)., IMPORTANCE OF TUMOR MICROENVIRONMENT IN BREAST CANCER PROGRESSION, Encuentro Científico Internaciona, 2011 pp 12.
- Van Overmeire E, Laoui D, Keirsse J, Bonelli S, Lahmar Q, Van Ginderachter JA. STAT of the union: dynamics of distinct tumor-associated macrophage subsets governed by STAT1. *Eur J Immunol*. 2014; 44: 2238-42.
- VARGAS-ROJAS M. I., JIMÉNEZ-ÁLVAREZ L., RAMÍREZ G. TORRES-GARCÍA D. BARQUERA R.‡ GASTELUM-MARTÍNEZ A. A. Y ZÚÑIGA J. (2008). “PD-1 y sus ligandos como reguladores de la respuesta inmune”. *REV INST NAL ENF RESP MEX VOLUMEN 21 - NÚMERO 4 PÁGINAS: 272-279*.
- Wenjuan Xuan, Q.-H. (2015). The chemotaxis of M1 and M2 macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 69, 69.
- Wu F., Dassopoulos T., Cope L., Maitra A., Brant SR, Harris ML, Bayless TM, Parmigiani G., Chakravarti S. (2017) “Genoma de expresión de ancho diferencias en la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa de biopsias por punción endoscópica: ideas sobre la patogénesis distintiva. *Inflamm*”. *Bowel Dis*. 2007; 13: 807-821.
- Wu X., Guo W., Wu L., Gu Y., Gu L., Xu S., Wu X., Shen Y., Ke Y., Tan R., et al. El secuestro selectivo de STAT1 en el citoplasma a través de SHP-2 fosforilada mejora la colitis experimental murina. *J. Immunol*. 2012; 189: 3497-3507.
- Yan-Cun Liu1, X.-B. Z.-F.-M. (2014). Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 520-529.
- Zundler Sebastian y F. Neurath Markus * “Integrating Immunologic Signaling Networks: The JAK/STAT Pathway in Colitis and Colitis-Associated Cancer”. *Vaccines (Basel)*. 2016 Mar; 4(1): 5
- Zhong X, Chen B, Yang Z.(2018):”The Role of Tumor-Associated Macrophages in Colorectal Carcinoma Progression.” *Cell Physiol Biochem*. 2018;45(1):356-365. doi: 10.1159/000486816. Epub 2018 Jan 19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29402795>.