



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
UNIDAD DE BIOMEDICINA

Estudio de la inhibición de MIF por el compuesto CPSI-156 en cáncer
colorrectal asociado a colitis en un modelo murino con fondo genético

C57BL/6

TESIS

Que para obtener el título de

BIOLOGO

Presenta

MARTHA GUADALUPE FERRAL CÁRDENAS

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO, ENERO 2022



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.

Agradecimientos

A la carrera de Biología.

A la Unidad de Biomedicina, UBIMED.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

A mi comité tutorial por el apoyo y su tiempo en la realización de esta tesis, el mismo que está conformado por la Doctora Miriam Rodríguez Sosa, Doctor Luis Ignacio Terrazas Valdés, Doctor José Luis Reyes Hernández, Doctora Sonia Andrea León Cabrera y la Maestra en Ciencias Imelda Juárez Avelar. Todos son unos científicos excepcionales y los admiro.

A la Doctora Miriam Rodríguez Sosa, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme la oportunidad de empezar en el camino de la ciencia. Por su confianza, su ayuda en todo el recorrido y por su paciencia. Es una mujer que admiro muchísimo, por su inteligencia, por ser tan humana y por su liderazgo. Gracias a usted se me han presentado grandes experiencias y oportunidades. La quiero.

A la M. en Ciencias Imelda Juárez Avelar, gracias Ime por ser mi maestra desde el primer día que llegue al laboratorio. Por siempre despejar mis dudas, ayudarme a comprender los resultados que salían de experimentación, por enseñarme la técnica. Por compartirme un poco de todo tu conocimiento. Por mantener al equipo de trabajo junto y hacer días especiales como cumpleaños y festividades algo inolvidable.

A la Dra. Thalia Pacheco Fernández. Thali, gracias por nunca dejarme sola, por acompañarme en mis experimentos, por ser mi sensei en el mundo del cáncer, por invitarme y compartir tu proyecto de posgrado, por enseñarme la oda al manejo de los ratones, por las clases de inmunología; por las risas, las comidas corridas, las pláticas de la vida y las bailadas en festivales/fiestas. Te quiero un montón, te convertiste en mi amiga y mi ejemplo de lo que es una mujer apasionada por la ciencia.

Al Doctor Tonatíuh. Tona gracias por explicarme cuando no entendía sobre algo, por motivarme a superarme y seguir aprendiendo siempre. Y por ser el mejor compañero bailando salsa.

A la Bióloga Alexia. Gracias Alexia bebé por ser tan comprensiva, por siempre ayudarnos a todos cuando estamos en peligro a la hora de estar experimentando, por ayudarme a entender las elisas, recuerda que tus curvas son perfectas. Por el ramen y por la exposición juntas en el simposio de Ixtapan de la Sal.

Al Biólogo Octavio. Octabby, esposi gracias por ayudarme a estudiar los temas de cáncer y su inmunología, con mis ratones y sus miles de cajas y en el proceso de la tesis en general. Por ser mi amigo y una persona muy importante en mi vida. Por la música y las fiestas.

A la Bióloga Danae y la M. en Ciencias Betsy. Por apoyarme en dudas que surgían en el laboratorio, por enseñarme sus técnicas; a Dana por ayudarme en mis protocolos y a Betsy por enseñarme a hacer las cosas bien y de calidad.

Al Biólogo Antonio Andrade. Doctor macrófagos, y ahora Doctor cáncer. Gracias por apoyarme en las cosas de estadística, con el Excel, por ayudarme cuando tenía que canular o sacar suero de mis ratones. Por lo aprendido en lab y lo aprendido en los viernes de matar la tusa.

A Guillermo, Andrés, Sonia, al Doctor Oscar Illescas y al Doctor Oscar Nieto por ayudarme cuando requerí de su ayuda y por los momentos agradables en el laboratorio.

A los apoyos recibidos de:

Financiado por CONACyT A1-S-10463, Papiit IN 217021.

Dedicatorias

En primer lugar este trabajo va dedicado a mis papás, que es a los que les debo todo, esto es la culminación de años recorridos, esto es por y para ustedes. Gracias inconmensurables.

A mi mamá, Juanita, por ser mi vara más alta, por ser esa mujer que día con día me enseña a salir adelante, por el amor inagotable de su corazón, por su alegría, por su ángel y por las sonrisas de todos los días. Gracias por apoyarme en todos los aspectos en cada etapa, y más ahora, en la etapa universitaria. Estaré en deuda siempre contigo. Te amo bonita, sabes que eres lo más sagrado en mi corazón.

A mi papá, Carlos. Gracias por ser la polea de mi maquinaria, la fuerza y el carácter que se necesita en la vida. Por las lecciones y por ayudarme a madurar, a ser independiente y creer en mí. Por enseñarme a ser comprometida. Te amo panzón, eres el abrazo más sincero y reconfortante. Gracias por ayudarme a que decidiera entrar a Biología, fue de las mejores decisiones de mi vida y te estaré siempre agradecida.

A mi bombón por acompañarme 17 años de mi vida, por ser mi mejor amiga y el ser vivo más amoroso e incondicional. Te amo mi ñeñe y te extraño siempre.

A mis amigos de la FESI; a Monse, gracias por ser mi otra mitad, por crecer conmigo, por los cumpleaños, por la confianza que sobrepaso límites, por estar ahí para celebrar o para llorar, por todas las fiestas, las comidas, las alitas, los Starbucks y las chapatas. Por ser el vivo ejemplo de amistad y ser esa amiga que está en las buenas y en las malas Te amu pequeñita, mi protozoaria.

A Edmundo, gracias “muñón” por apoyarme, por estar orgulloso de mí, por celebrar mis logros, por Xicotepec, por el club hoyo de la rata, por preocuparte por mí, por quererme y ser un amigo de verdad. Por enseñarme a no rendirme. Te quiero muchísimo Mundo.

A Roy; gracias por convertirte en mi hermano de otra mamá, por cuidarme, por quererme, por las días que duraban más de 24 hrs, por los consejos. Por jalar hasta donde dice empuje. Te quiero mucho Rorris.

A Misael, por empujarme cuando llegaba la procrastinación, por escucharme siempre, por las carcajadas, por ser mi compañía, por la sinceridad y los pays, ¡por todo amigo!

A Nato, Lucero, Julio, Celso, Roberto, Alberto, Marco, Álvaro, Payola, Mary, Pao, Mariana, América, Grecia, Efra, Monse Momo, Tony Banoli, Ivanus, Sasa, Roo,

Eve, Pam, Kevin, Ilerus, Karlita, Ángel, Ruby, Dany y Pau por las experiencias inolvidables, las risas grabadas y la amistad forjada.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por darme los mejores años de mi vida, porque fue y será mi segundo hogar. Por su verde y calidez.

A la UNAM, gracias desde hace 10 años, por acogerme y ser mi alma mater. Por las oportunidades de crecimiento profesional y personal.

¡México, Pumas, Universidad! ¡Goya, goya, cachún cachún ra ra, cachún cachún ra ra, goya, Universidad!

“Tarda en llegar

Y al final

Al final, hay recompensa “– Gustavo Cerati

“Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas”. – Marie Curie

Índice

Índice de gráficas y figuras.....	7
Abreviaturas.....	8
Resumen.....	10
Introducción.....	11
Definición de cáncer.....	11
Incidencia.....	11
Factores de riesgo.....	14
Hallmarks del cáncer.....	15
Inflamación.....	17
Enfermedades intestinales inflamatorias.....	18
Etiología del CCR.....	20
Interacciones entre el cáncer y el sistema inmune.....	23
Linfocitos TCD4.....	24
Linfocitos TCD8.....	25
Macrófagos.....	25
Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos.....	26
Inhibidores.....	28
Inhibidor CPSI-156.....	29

Ratones C57BL/6.....	30
Justificación.....	32
Hipótesis.....	33
Objetivo general.....	33
Objetivos particulares.....	33
Material y Métodos.....	34
Animales.....	34
Monitoreo de síntomas clínicos.....	35
Evaluación de tumores.....	35
Análisis histopatológicos.....	35
Resultados.....	36
Síntomas clínicos.....	36
Comparación de los órganos 62 días post inducción.....	38
Longitud del colon.....	39
Carga tumoral por grupo.....	41
Análisis histopatológico.....	42
Discusión.....	44
Conclusiones.....	48
Perspectivas.....	49
Referencias.....	50
Anexo técnico.....	56

Índice de figuras

Figura 1. Incidencia y mortalidad de diferentes tipos de cáncer en relación a la edad.....	12
Figura 2. Incidencia de cáncer en México.....	13
Figura 3. Hallmarks esenciales en la fisiología celular del desarrollo tumoral.....	16
Figura 4. Halmarks emergentes para el desarrollo tumoral.....	17
Figura 5. Enfermedad inflamatoria intestinal.....	19
Figura 6. Vía de señalización canónica de Wnt / Beta-Catenina / Tc. Presencia y ausencia del ligando Wnt	22
Figura 7. Conceptualización gráfica de la inmunoección.....	24
Figura 8. Estructura tridimensional del MIF.....	27
Figura 9. Modelo murino cepa C57BL/6.....	31
Figura 10. Modelo inducción a CCR con AOM/DSS.....	35
Gráfica 1. Comparación de la masa corporal en los tres grupos....	36
Figura 11. Sangrado rectal al final del segundo ciclo de DSS. Se observa un mayor daño en el grupo CCR+CPSI-156.....	37
Figura 12. Comparación de bazo e hígado de los diferentes grupos de ratones: CONTROL, CCR y CCR+CPSI-156 al término del modelo de AOM/DSS.....	38
Figura 13. Longitud de los intestinos.....	39
Gráfica 2. Longitud del colon por grupo (12c).....	40
Gráfica 3. Carga tumoral de los dos grupos inducidos a CCR a los 56 días post inducción CCR.....	41
Figura 14. Panel de cortes histológicos del colon en los tres grupos experimentales CCR, CCR+CPSI-156 y CONTROL al final del ciclo del modelo. Visto a 4x, 10x y 40x aumentos.....	42

Abreviaturas

AHC	Aminas Heterocíclicas
AOM	Azoximetano
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
CCR	Cáncer Colorrectal
CTL	Linfocitos citotóxicos efectores-
COX	Ciclooxigenasa
CPSI	Cytokine pharma science
CU	Colitis Ulcerativa
CXCR	Receptor de quimiocinas tipo CXC
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos de trifosfatos
Dsh	Gen disheveled
DSS	Dextrán sulfato de sodio
EC	Enfermedad de Crohn
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
Fzd	Fzled

HAP	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interlucina
ISO	Isoxazolinas
LPS	Polisacárido
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIF	Factor Inhibidor de Migración de Macrófagos
Mϕ	Macrófago

Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) representa la segunda causa de muerte en el mundo por tumores malignos. La inflamación intestinal crónica es un factor de alto riesgo para desarrollar CCR. El Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) es una citocina pro-inflamatoria, que está implicada en enfermedades inflamatorias y autoinmunes y se sobreexpresa en el CCR, estas características han llevado a sugerir que las terapias dirigidas contra MIF podrían ofrecer oportunidades de tratamiento para enfermedades inflamatorias generales, así como al cáncer asociados a procesos inflamatorios crónicos como el CCR. Los compuestos relacionados a las isoxazolininas actúan inhibiendo la actividad de MIF, y en consecuencia la inflamación exacerbada o alterada. Estos compuestos, como el compuesto CPSI-156, se han propuesto para tratar enfermedades inflamatorias en humanos y otros mamíferos. En este estudio se utilizó el compuesto CPSI-156 para inhibir MIF en un modelo murino de CCR con la finalidad de establecer la participación de MIF en el desarrollo de esta patología. Se estableció el modelo de CCR asociado a colitis descrito por Neufert, el cual es inducido con Azoximetano (AOM) y Dextrán Sulfato de Sodio (DSS), en ratones macho C57BL/6. Se estableció un grupo con CCR, otro grupo con CCR tratado con el inhibidor de MIF CPSI-156 (CCR+CPSI-156) y como control (CONTROL) se utilizaron ratones sanos solo tratados con vehículo que fue aceite de maíz. El CPSI-156 fue administrado a partir del día 40 post-inducción con AOM (al inicio de la formación de los lipomas), hasta el día 62 cuando se sacrificaron. El grupo CCR+CPSI-156 desarrolló mayor carga tumoral en grupo (14.297 ± 0.013) comparado con el grupo CCR (4.536 ± 2.304), además tuvo mayor cantidad de tumores, histológicamente hubo infiltrado inflamatorio abundante; ruptura, invasión y destrucción de la mucosa intestinal, así como displasias de alto grado; se encontró mayor disminución en la longitud del colon respecto al grupo CCR. Con estos resultados, en contraste a las propiedades pro-tumorales descritas para MIF, demostramos que la inhibición de MIF al inicio del desarrollo de los pólipos favorece el desarrollo del CCR, y sugerimos que probablemente sea debido a que la ausencia de MIF disminuye la respuesta inflamatoria asociada a células inmunes efectoras capaces de contener el desarrollo del CCR. Sin embargo, es necesario establecer de manera más puntual el papel de MIF con más estudios.

Introducción

1. Definición de cáncer

El cáncer, de acuerdo con la definición establecida por la American Cancer Society, es un grupo de enfermedades caracterizado por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales [45]. Si este proceso no es controlado, puede resultar en la muerte del paciente [2]. El cáncer es causado por factores externos (tabaco, agentes químicos, radiaciones, e infecciones) como por factores internos (mutaciones heredadas, hormonas, condiciones inmunológicas) que pueden ocurrir como consecuencia del propio metabolismo [2].

Podría decirse que el rasgo fundamental de las células cancerosas es su capacidad para mantener la proliferación crónica [23]. En tejidos normales las células controlan la producción y liberación de señales que promueven el crecimiento celular, así como su ciclo de división, asegurando la homeostasis en su número poblacional y por consiguiente en el mantenimiento de la arquitectura tisular y su correcta función [23]. Las células cancerosas, son células dañadas que tienen desreguladas las señales de crecimiento y del ciclo de división celular. Las señales de activación son transmitidas en gran parte por factores de crecimiento que se unen a los receptores ubicados en la superficie celular, que generalmente contienen dominios intracelulares de tipo tirosina quinasa, estos últimos proceden a emitir señales que activan vías de señalización celular que regulan el ciclo, el crecimiento y la proliferación de la célula [23].

1.1 Incidencia

Los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial para ambos sexos son el de mama, próstata, pulmón y el cáncer colorrectal, mientras que el cáncer de pulmón, mama, colorrectal y de hígado son los que presentan las tasas más altas de mortalidad [21], Figura 1.

En México el cáncer colorrectal (CCR) representa como el tercer cáncer más frecuente, y aproximadamente el 52% de los casos registrados en 2019 se dieron en hombres mientras que el 48% se dieron en mujeres. Más del 90% de los casos de cáncer colorrectal se manifiestan después de los 50 años [21].

El CCR es la segunda causa de muerte en el mundo provocada por tumores malignos. Prevalen los factores de riesgo ambientales más que los hereditarios [35]. En México representa el tercer cáncer más frecuente, y aproximadamente el 52% de los casos registrados en 2019 se dieron en hombres mientras que el 48% se dieron en mujeres. Más del 90% de los casos de cáncer colorrectal se manifiestan después de los 50 años de edad (Figura 2) [21].

Su frecuencia a nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el 2008 ocupaba el segundo lugar en defunciones (7.7 millones), más del 70% de estas muertes se registraron en países con bajos ingresos y/o en vías de desarrollo. Esta cifra, según cálculos para 2030 llegará a superar los 13.1 millones [19].

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

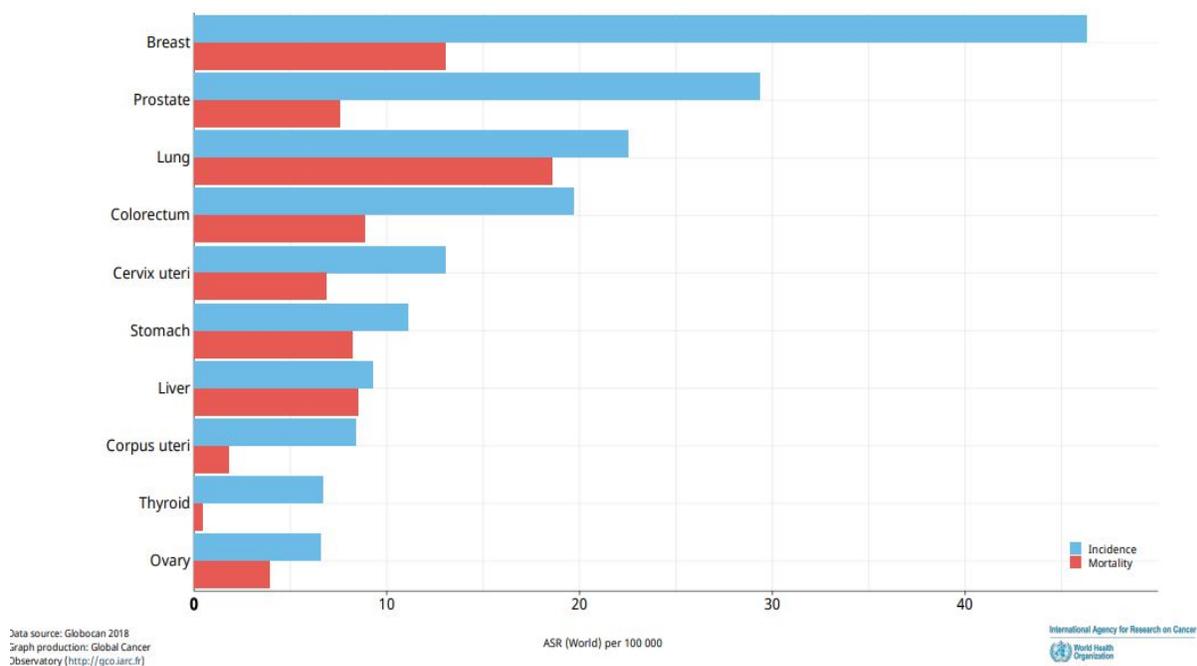


Figura 1. Incidencia (Azul) y mortalidad (Rojo) de los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial. Tomado de Globocan, 2018.

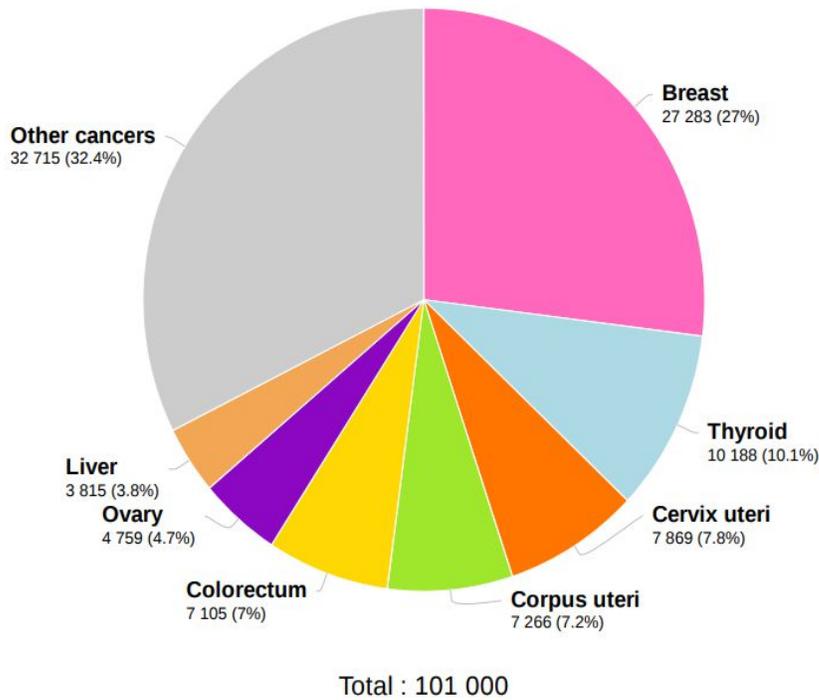
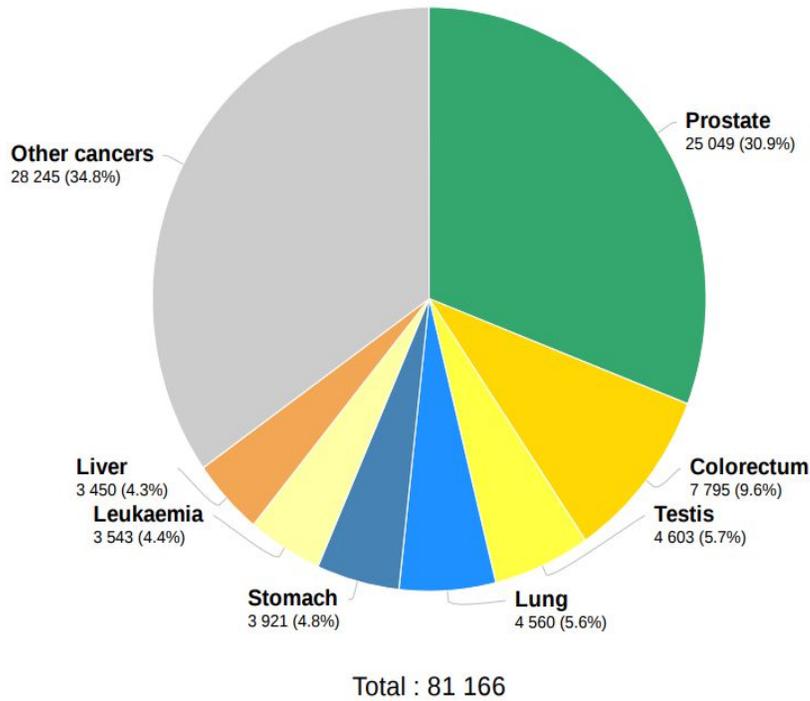


Figura 2. Incidencia de cáncer en México. Incidencia de diversos tipos de cáncer en México en hombres (arriba) y mujeres (abajo). Tomado de Globocan, 2018.

El CCR aparece por una serie de mutaciones acumuladas en genes específicos: genes supresores de tumores, oncogenes y genes reparadores del ADN. Los genes supresores de tumores son aquellos que normalmente suprimen y regulan el crecimiento celular; los oncogenes estimulan el crecimiento celular, cuando mutan, la estimulación del crecimiento se vuelve constitutiva o continuamente activada [18]

2. Factores de riesgo

En general, no es posible saber con exactitud por qué una persona padece cáncer y otra no. Pero la investigación ha indicado que ciertos factores de riesgo pueden aumentar la posibilidad de una persona de padecer cáncer (hay también factores protectores o de protección que están relacionados con un riesgo menor de cáncer) [25].

- **Ingesta de alcohol**

Alcohol es el término común que se usa para etanol o alcohol etílico, una sustancia química que se encuentra en bebidas alcohólicas como la cerveza, vinos y licores destilados. Al metabolizar (descomponer) el etanol presente en las bebidas alcohólicas a acetaldehído, el cual es un producto químico tóxico y un probable carcinógeno humano capaz de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden dañar proteínas, lípidos y al ADN por oxidación. En el proceso de fermentación y producción de bebidas alcohólicas pueden también contener una variedad de contaminantes como son las nitrosaminas, las fibras de asbesto, los fenoles e hidrocarburos que también pueden causar daño a nivel de DNA [25].

- **Dieta**

El consumo excesivo de bebidas alcohólicas junto a algunos antioxidantes en la dieta diaria contribuyen al desarrollo del cáncer, ya que bloquean la actividad de radicales libres que resulta en daño celular. Los radicales libres pueden ser generados con el consumo de edulcorantes artificiales, de carne muy cocida que libera ciertos compuestos químicos, llamados aminas heterocíclicas (AHC) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) [25].

- Edad

Cuando la carne (res, puerco e incluso ave) se cocina a altas temperaturas durante la vida media el diagnóstico de cáncer es a partir de los 66 años. Una cuarta parte de los casos nuevos de cáncer es diagnosticada en personas de 65 a 74 años [25].

- Tabaco

Entre los más de 7000 compuestos químicos que se han identificado en el humo de tabaco, por lo menos 250 son nocivos como el cianuro de hidrógeno, el monóxido de carbono y el amoníaco [25]. Y, al menos 69 de esos compuestos son causantes del desarrollo de cáncer, como el arsénico, benceno, 1,3-butadieno, cromo, níquel, polonio 210, entre otros [37].

La exposición al humo de tabaco en el ambiente irrita las vías respiratorias y presenta efectos nocivos inmediatos en el corazón y en los vasos sanguíneos de la persona [54].

3. Hallmarks del cáncer

Las investigaciones realizadas en las últimas décadas han revelado una pequeña información de rasgos moleculares, bioquímicos y celulares, así como capacidades adquiridas, compartidas por la mayoría y quizás por todos los tipos de cáncer humano [23].

En el año 2000 se sugirió que las manifestaciones en células cancerosas son consecuencia de seis alteraciones esenciales o *hallmarks* en la fisiología celular que promueven el desarrollo del cáncer, estas alteraciones son: Proliferación ilimitada, autorregulación en señales de crecimiento, insensibilidad a los inhibidores del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), capacidad para desarrollar vasos sanguíneos (angiogénesis), invasión tisular y metástasis [23].

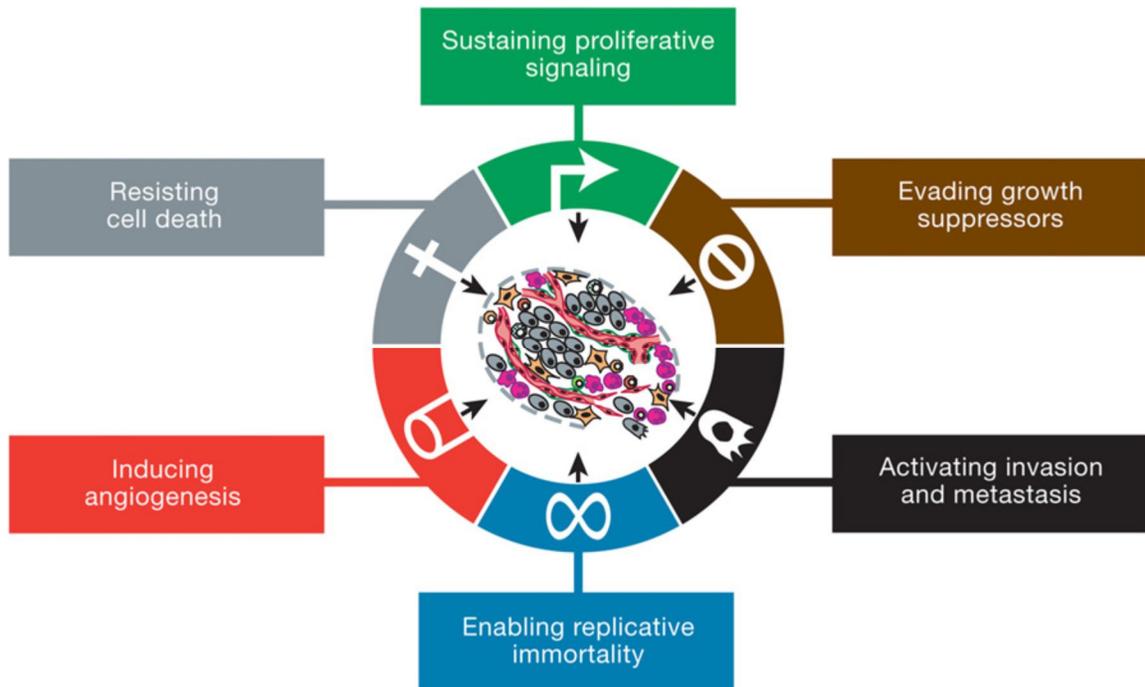


Figura 3. Hallmarks esenciales en la fisiología celular del desarrollo tumoral. Hanahan y Weinberg, 2011.

En investigaciones posteriores se sugieren nuevas capacidades distintivas para la constitución del tumor: evitar la destrucción inmunológica, inestabilidad genómica y mutación, desregulación en el metabolismo celular e inflamación. Aunque estas capacidades no están completamente validadas aún, particularmente la inflamación contribuye al suministrar moléculas al microambiente tumoral, como factores de crecimiento que mantienen la señalización proliferativa, factores de supervivencia que limitan la muerte celular, factores proangiogénicos, enzimas que facilitan angiogénesis, invasión y metástasis [13].

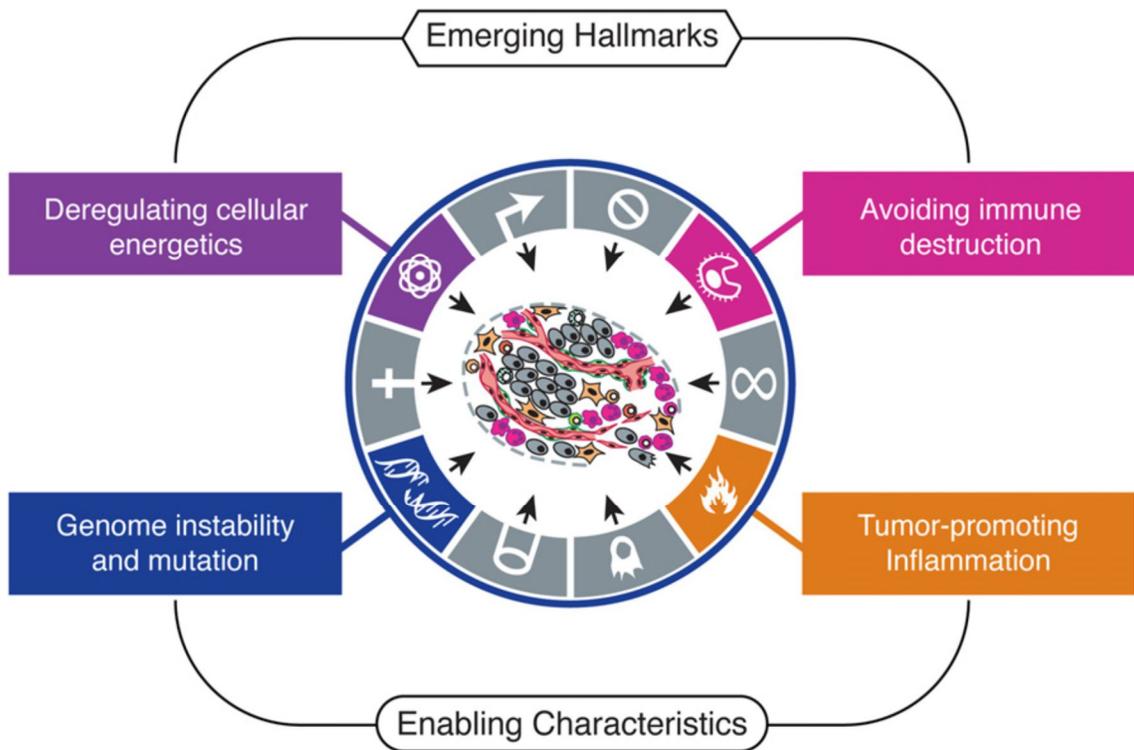


Figura 4. Hallmarks emergentes para el desarrollo tumoral. Hanahan y Weinberg, 2011.

Hallmarks como la proliferación celular, la evasión de la actividad apoptótica y la autorregulación de señales de crecimiento celular son mediadas en gran parte por el gen p53. El gen p53, normalmente, cuando se presentan mutaciones del DNA en cualquiera de los cromosomas, induce que el ciclo celular G1 se detenga. Esta función aparentemente da tiempo para que el reparo de la mutación se realice. Si el reparo no es posible el p53 induce la muerte celular apoptótica. Cuando ambas copias p53 mutan, el gen no es funcional, y las mutaciones a través del genoma persisten y se acumulan. El p53 mutado (disfuncional) está presente en el 50% de todos los cánceres humanos [18]

4. Inflamación

En el sistema digestivo, el sistema inmunológico tiene que defender de ataques por patógenos, al mismo tiempo, mantener la homeostasis para evitar respuestas inmunitarias exageradas y garantizar el funcionamiento de la pared intestinal no inflamada. Los macrófagos residentes en el intestino se han asociado con la tolerancia a la mucosa al eliminar las bacterias que atraviesan la barrera epitelial y la producción de citocinas antiinflamatorias [43].

Actualmente se reconoce que un cuarto de las lesiones malignas en el colon tiene origen en un proceso inflamatorio crónico. Estos procesos inflamatorios crónicos son la clave en el estudio de la etiología y desarrollo de mutaciones asociadas al desarrollo del CCR [17].

La inflamación es una respuesta fisiológica normal al daño, ya sea mecánico o infeccioso [22], en otras palabras, es un mecanismo de defensa del hospedero en contra de un huésped exógeno o de algún componente endógeno, que puede producir alteraciones estructurales en el ADN que al expresarse fenotípicamente darán origen a células de comportamiento tumoral [17]. Todos los procesos inflamatorios, ya sean de origen inmune u otro, llevan consigo la activación de macrófagos residentes y la infiltración de leucocitos desde la sangre, esta activación induce cambios en las células entre los cuales se incluyen la producción de citoquinas que originan una cascada de eventos esenciales para la respuesta inflamatoria [22].

El CCR se asocia con un aumento de las células T reguladoras y en los niveles de la citocina estimulante inmune IFN- γ , pero también con una regulación negativa de PD-L1, que es una proteína transmembranal de tipo 1 con un papel inmunoregulador presente en procesos donde se involucra la supresión del sistema inmunitario. Los macrófagos presentes en un tumor, comparándolo con tejido normal parece tener un fenotipo alterado, identificado por HLA-DR, CD14, CX3CR1 y CD64, y los macrófagos CD206+ tolerogénicos se reducen cuantitativamente. La combinación de estas diferencias inmunológicas se asocia con un pronóstico negativo en la supervivencia general de los pacientes con CCR [51].

Las manifestaciones clínicas del CCR se relacionan con el tamaño y la localización. Signos y síntomas frecuentes de neoplasias proximales (ciego y ángulo esplénico) incluyen dolor abdominal indefinido, pérdida de peso y sangrado oculto. Las neoplasias distales (colon descendente a recto) pueden presentarse con alteraciones en los hábitos intestinales [18].

4.1 Enfermedad inflamatoria intestinal

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un grupo de enfermedades que cursan con inflamación del tubo digestivo, pero, en la práctica clínica, se hace referencia a la colitis ulcerosa (CU) y a la enfermedad de Crohn (EC) [42]. Es importante realizar la distinción clínica entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, en la primera el proceso inflamatorio

afecta exclusivamente al colon. La inflamación está confinada en la mucosa y submucosa, se inicia en el recto y, de forma continua y simétrica, se extiende proximalmente a otros segmentos del colon. En la enfermedad de Crohn, cualquier parte del tubo digestivo puede estar afectada, desde la boca hasta el ano, de forma focal, segmentaria, y discontinua, si bien las localizaciones más habituales son el íleon terminal y diversos segmentos del colon. En esta enfermedad, el proceso inflamatorio puede abarcar todo el espesor de la pared del tubo digestivo, desde la mucosa a la serosa, con la consiguiente aparición de fisuras, fistulas o abscesos (Figura 5) [42].

Enfermedad inflamatoria intestinal

Es una patología crónica del tubo digestivo que evoluciona de modo recurrente con brotes. Sus causas son desconocidas, aunque se sabe de muchos factores que pueden favorecer la enfermedad. Hay dos tipos: la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

★ Principales síntomas

COLITIS ULCEROSA

Solo afecta al colon

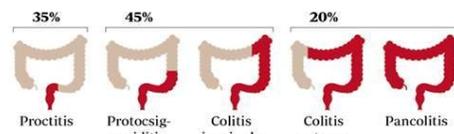
★ Pérdida de peso moderada

★ Dolor abdominal difuso

■ Afectación continua

★ Sangrado y aumento de las deposiciones

Tipos según su distribución (% sobre el total de casos)



ENFERMEDAD DE CROHN

Puede afectar a cualquier parte de tubo digestivo, desde la boca hasta el ano

★ Pérdida de peso marcada

★ Fiebre

★ Dolor abdominal (generalmente en el lado derecho)

★ Fistulas (conexiones anormales)

■ Afectación a parches

★ Diarrea

COLITIS INDETERMINADA
Casos en que no se puede diferenciar entre ambas enfermedades

10%

Tipos según su distribución

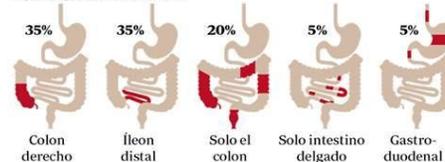


Figura 5. Enfermedad inflamatoria intestinal, diferencia entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn. IBC Rosario, Ar. 2015.

La inflamación crónica del colon por CU y EC aumenta el riesgo de desarrollar CCR [46]. La probabilidad de desarrollar este cáncer se ha demostrado por metanálisis que varía desde un 2.9% después de 10 años con la enfermedad hasta un 8.3% después de 30 años [8]. Los síntomas de las EII incluyen diarrea y dolor abdominal., aunque tanto los pacientes con EC como con CU pueden experimentar sangrado gastrointestinal, en la CU la presencia de hematoquecia o de sangrado visible es más común que en la EC [46].

5. Etiología del cáncer

En tumores asociados al estroma las células normales que son reclutadas actúan como participantes activos en la tumorigénesis, ya que células estromales contribuyen al desarrollo y expresión de capacidades distintivas que forman el microambiente tumoral [23].

Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, generadas por las células inflamatorias, podrían alterar la regulación de genes clave en el control del ciclo celular y el proceso de carcinogénesis [46]. Estas especies pueden causar metilaciones en genes supresores como *Adenomatous polyposis coli* (APC), la metilación de APC es conocida por ser uno de los primeros eventos en el desarrollo de la carcinogénesis colorrectal durante etapas tempranas. Este proceso es seguido por la mutación de genes supresores de tumor como p53, que llevan a su inactivación y la progresión de la carcinogénesis. La interacción de APC con el proto-oncogen beta-catenina vincula la carcinogénesis colorrectal a la vía de transducción de señal Wnt [30].

E-cadherina atraviesa la membrana plasmática, activando a β catenina que se encuentra en el citoplasma, mediante el complejo regulador de β catenina se fosforila β catenina para que sea reconocida por Slimb6, que, es una proteína que la ubiquitina en el amino terminal para que el proteosoma la pueda reconocer y finalmente degrade a β catenina en péptidos y enzimas. En esta parte no se activan factores de transcripción [30] [23].

Cuando la vía está inactivada, Wnt que se encuentra en forma de ligandos libres en la matriz extracelular se une a los receptores Frizzled (7 pasos) y a su correceptor LRP6/6, al formar este complejo LRP5/6 es fosforilado por enzimas cinasas, Dishevelled (Dvl) se

pega al correceptor fosforilado y recluta al complejo de regulación de β catenina, el cual bloquea el proceso de fosforilación y ubiquitinización de β catenina, dejándola libre y estabilizada en el citoplasma.

Cuando la vía está activada, β catenina es fosforilada en un extremo terminal lo cual hace que cambie su forma a una forma tridimensional para que pueda entrar en el poro nuclear, ya dentro del núcleo β catenina se pega al factor de transcripción TCF-LEF, bloqueando a Groucho que reprime su función, ya estando el complejo binario β catenina+TCF-LEF se une al DNA, recluta a la RNAPolimerasa, empieza la transcripción por RNAm a células blanco. A partir de este momento β catenina puede interactuar con el gen APC, al unirse el APC ayuda a empujar hacia el citoplasma a β catenina por el poro nuclear para que, en el citoplasma, el proteosoma pueda degradar a β catenina y es el final de la vía. Debido a las mutaciones en el gen APC se elimina su extremo carboxilo terminal, entonces β catenina no se puede unir en el núcleo. También β catenina puede mutar en su extremo amino terminal, evitando así que sea blanco de fosforilación y no se pueda degradar [15] (Figura 6).

Al ocurrir estos fenómenos no se regula la transcripción de β catenina, se acumula en el citoplasma y migra al núcleo, se activa la proliferación celular descontrolada y se genera un pólipo que puede convertirse a un adenoma y finalmente a un carcinoma [15].

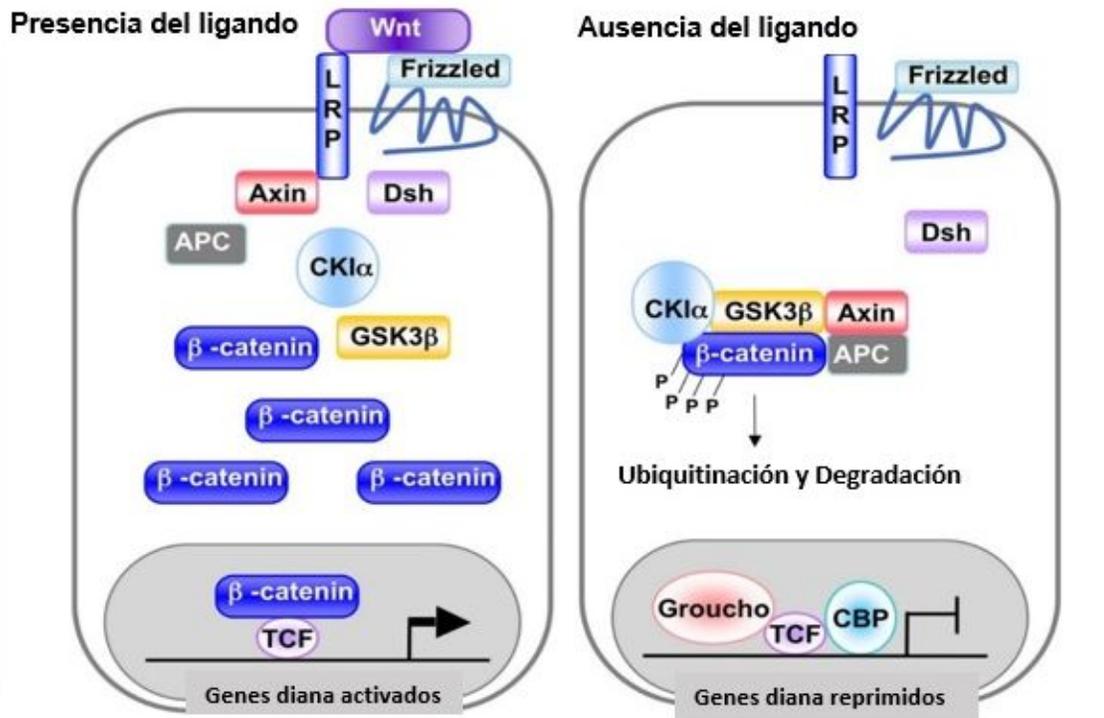


Figura 6. Vía de señalización canónica de Wnt / Beta-Catenina / Tc. Presencia y ausencia del ligando Wnt. Eisenmann, 2005. La vía de señalización Wnt- β -catenina juega un papel decisivo en los procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular. Las proteínas Wnt forman parte de la familia de glucoproteínas de secreción que se unen al receptor frizzled (Fz) y en una proteína relacionada con el receptor LRP5/6. La vía de señalización Wnt β -catenina depende principalmente de la estabilidad y cantidad de la β -catenina en el citoplasma de la célula, y su posterior traslocación al núcleo, donde ejerce su actividad transcripcional. Existen dos vías principales de la señalización Wnt; en presencia del ligando Wnt los genes se expresan ya que el incremento de β -catenina activa la transcripción de un grupo de genes, como se puede ver en la imagen, generando procesos de división celular, desarrollo embrionario y morfogénesis, a esta vía se le conoce como **vía canónica a)**; en ausencia del ligando Wnt las β -cateninas son reclutadas por el complejo APC/axina/ GSK-3 β y fosforiladas por GSK-3 β . Las β -cateninas fosforiladas son degradadas y ubiquitinadas en los proteosomas como resultado no hay expresión génica, a esta vía se le conoce como **vía no canónica b)**.

6. Interacciones entre el cáncer y el sistema inmune

El sistema inmune tiene la capacidad de detectar y eliminar células tumorales, por otro lado también puede proveer un microambiente favorable para el crecimiento tumoral. La inmunoección del cáncer se podría definir como un proceso de selección natural en el ambiente tumoral para que estos sean editados o modificados. Consta de tres fases:

Eliminación: Esta etapa corresponde al concepto original de inmunovigilancia. En esta fase, el sistema inmune innato y adaptativo trabajan en conjunto para erradicar el crecimiento de tumores de forma exitosa. Los linfocitos TCD4+ (Th1), los linfocitos Th17, los linfocitos TCD8+ citotóxicos, las células NK, las células NKT, los macrófagos y los linfocitos T $\gamma\delta$, son claves en la eliminación de las células transformadas. Los linfocitos Th1, T $\gamma\delta$ y las células NK son la mayor fuente de IFN- γ , citocina clave en el proceso de eliminación tumoral, ya sea actuando directamente sobre la célula tumoral o activando células efectoras de la respuesta inmune [31]. Las células NK son clave en la eliminación temprana de tumores dependiendo de la producción de IFN- γ y a la manifestación de su potencialidad citotóxica [50].

Equilibrio: Las células tumorales que no son eliminadas por el sistema inmune en la primera fase, proceden hacia una fase de equilibrio, en donde si bien son controladas, ya no pueden ser eliminadas. En esta etapa interviene solo el sistema inmune adaptativo [28]. Aquí los linfocitos TCD4+ y TCD8+ e IFN- γ mantienen a las células transformadas en estado de “dormancia” o latencia para impedir el crecimiento y proliferación del tumor por largos periodos de tiempo, generando así una presión de selección sobre las células tumorales propiciando la edición del tumor [50].

Escape: Finalmente los tumores que ya no son susceptibles al reconocimiento y al ataque del sistema inmune progresan hacia la fase de escape. Esta fase coincide en general, con la aparición de manifestaciones clínicas. Y es, en esta fase donde los tumores despliegan múltiples mecanismos inmunosupresores para evadir la respuesta de las células T efectoras, ya sea eludiendo el reconocimiento inmunitario o inhibiendo a los mecanismos inductores efectoras en la respuesta inmune antitumoral [50]. El escape de las células

tumorales puede ocurrir a nivel de la misma célula y/o a nivel del microambiente tumoral [28].

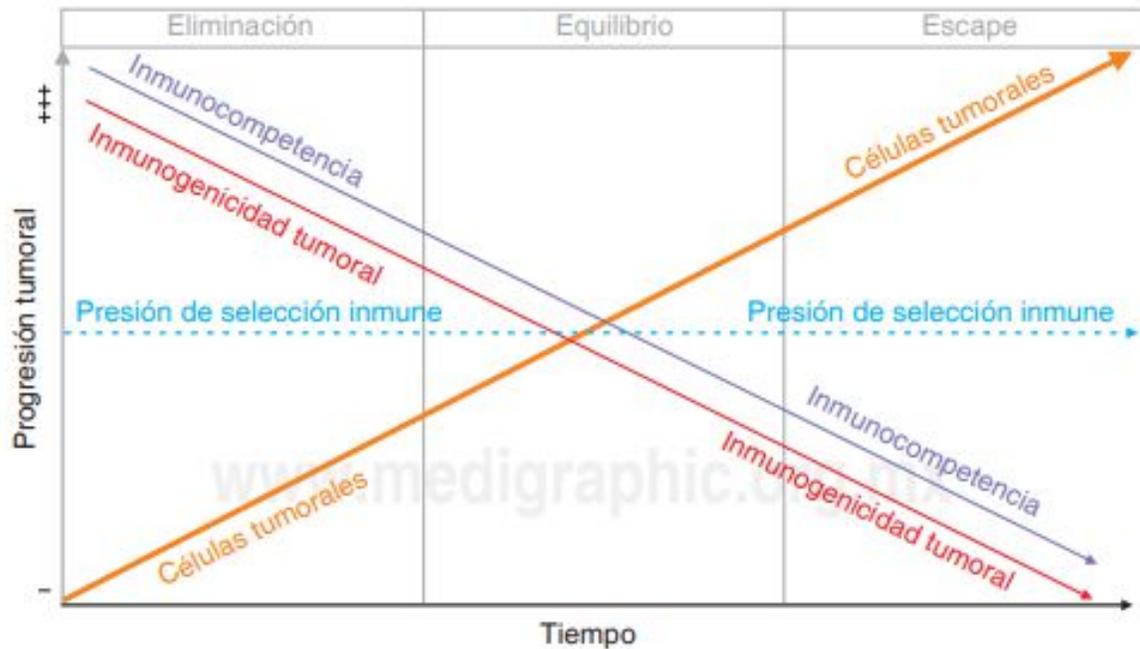


Figura 7. Conceptualización gráfica de la inmunoedición. Jacobo, 2017. Células tumorales con alta inmunogenicidad en un hospedero inmunocompetente podrán ser eliminadas con éxito. Mediante la presión de selección inmune pueden surgir células tumorales con una menor inmunogenicidad, capaz de eludir la respuesta inmunológica del hospedero. Si el tumor progresa le quedará la fase de escape, donde el equilibrio y aparición de nuevas células tumorales se inclinan hacia la proliferación tumoral, con la aparición subsecuente del cáncer.

6.1 Linfocitos TCD4+

Las células TCD4+ reconocen péptidos unidos a moléculas de MHC de clase II, las cuales se encuentran en las llamadas células presentadoras de antígeno (del inglés Antigen Presenting Cells –APCs-). Se trata de una población celular con un importante papel en la respuesta inmunitaria adaptativa. Los dos tipos principales de células T efectoras CD4+ se llaman células Th1 y Th2, aunque se han descrito más, estos dos tipos participan en el combate de infecciones bacterianas, pero de maneras muy diferentes. Las células Th1 son responsables del control de patógenos intracelulares, como virus y algunas bacterias, mediante la producción de IFN- γ . Además, cuando las células T son diferenciados hacia

un perfil Th1 pro-inflamatorio promueven la proliferación de linfocitos TCD8+ que son más eficaces en la destrucción de un tumor en un ambiente tumoral [1].

Las células Th2 son importantes en la defensa frente a organismos extracelulares grandes, como los parásitos helmintos, mediante la producción de citocinas como IL-4, IL5 e IL13 [9].

6.2 Linfocitos TCD8+

Las células T CD8+ están destinadas a convertirse en células T citotóxicas en el momento en que abandonan el timo como linfocitos indiferenciados. Su función es eliminar células infectadas. Las citocinas producidas por los linfocitos TCD8+ efectores contribuyen a la eliminación de muchos tumores. [1] (Abbas, 2002)

Los linfocitos TCD8+ pueden diferenciarse en CTL (Linfocitos citotóxicos) efectores, esta diferenciación implica la adquisición de la maquinaria necesaria para atacar células diana, las cuales pueden ser células infectadas o tumorales que, por expresar antígenos distintos a los propios asociados a las moléculas MHC-I, son identificadas como diferentes [14].

Los linfocitos TCD8+ vírgenes reconocen antígenos, pero necesitan proliferar y diferenciarse para generar un grupo suficientemente grande de CTL que destruya la fuente del antígeno. Además, los CTL diferenciados son capaces de secretar citocinas, sobre todo IFN- γ , que activa a los fagocitos [1] [14]. Gracias a estas funciones descritas se ha asociado la presencia y ubicación en el ambiente tumoral, de linfocitos TCD8+ infiltrados cercanos a las células tumorales con un buen pronóstico, es decir una mayor supervivencia para los pacientes con esta característica [1].

6.3 Macrófagos

Los macrófagos (M ϕ) son células multifuncionales presentes en la mayoría de los tejidos de vertebrados, conocidos por su actividad fagocítica que es importante para la defensa del huésped contra infecciones, así como para una variedad de funciones de "limpieza", como la eliminación de células apoptóticas y la remodelación de la matriz extracelular [40]. Estas células fueron descritas por primera vez en detalle por Metchnikoff a finales

del siglo XIX, quien descubrió su capacidad para engullir, digerir y destruir los componentes celulares de las células huésped y microbianas vivas y muertas [36].

Los M ϕ son pieza clave en el desarrollo y arquitectura del tejido, en la respuesta inmune contra patógenos al generar y resolver una respuesta inflamatoria, actúan como células centinela y efectoras, vigilando y controlando los cambios tisulares y especialmente en el mantenimiento de la homeostasis tisular (al despejar las células apoptóticas o senescentes, y al remodelar y reparar los tejidos) [27].

La activación del M ϕ es el resultado del contacto del éste con un inmunógeno, que favorece la producción de citocinas y otros mediadores inflamatorios, además del reclutamiento de monocitos. Como la nomenclatura en los linfocitos TCD4+, Th1/Th2, es común referirse a los M ϕ activados como células M1 ó M2, de acuerdo a las características moleculares que presenten [32].

7. Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos

En 1966 se descubrió la primera citocina, identificada como un factor soluble producido por los linfocitos que inhibe la migración de los macrófagos *in vitro*, razón por la cual se le llamo Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF). Desde entonces y hasta 1989 (cuando se clonó) [22] no se le atribuyó ninguna otra propiedad. En 1989 ocurrió el primer clonamiento de MIF [22].

Actualmente es ampliamente reconocido que MIF tiene propiedades de citocina pro-inflamatoria [33]. MIF es un trímero de 12.5 kDa, conformado por 115 aminoácidos, formado por subunidades idénticas (homotrímero) [14]. Cada monómero está formado por una estructura “beta sheet” o lámina beta que se trata del posicionamiento paralelo de dos cadenas de aminoácidos dentro de la misma proteína, formada por 2 α -hélice antiparalelas y 6 cadenas β [52]. MIF participa en interacciones receptor-ligando, dentro de los receptores descritos para MIF destaca CD74 en conjunto con CD44, CD74 es una proteína transmembranal tipo II también conocida como cadena invariante (Ii), implicada en el transporte de proteínas de MHC II del retículo endoplásmico al complejo de Golgi, así también se ha descrito que MIF puede interactuar con los receptores CXCR2 y 4 [12].

El gen MIF se localiza en el cromosoma 22 (22q11.2) y está compuesto de tres exones cortos de 107, 172 y 66 pares de bases (pb) y dos intrones de 188 y 94 pb [14].

Es producida por una variedad de tipos celulares que incluye monocitos/macrófagos, células B y T, y células endoteliales, endocrinas y epiteliales [7]. Se ha demostrado que MIF está implicado en patogénesis como sepsis, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes, lo que sugiere que las terapias dirigidas por MIF podrían ofrecer nuevas oportunidades de tratamiento para las enfermedades inflamatorias humanas en el futuro [7].

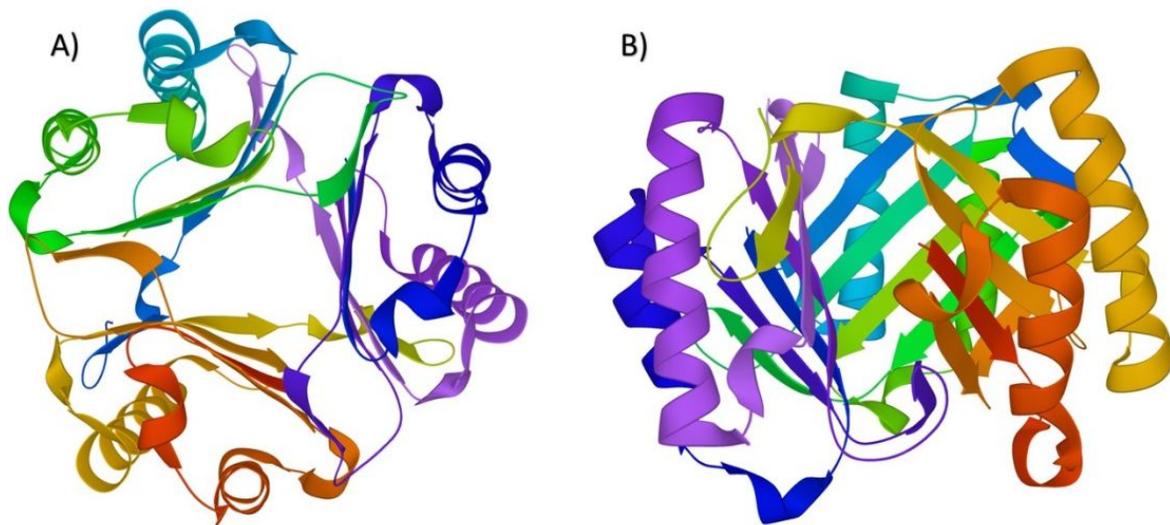


Figura 8. Estructura tridimensional del MIF. a) Vista frontal b) Vista lateral. Visualización en 3D de MIF en *Homo sapiens*. Protein Data Bank in Europe, 2008.

MIF se secreta en respuesta a estímulos inflamatorios como lipopolisacárido (LPS), TNF-alfa e IFN γ y MIF puede actuar de manera autócrina y parácrina e inhibe el efecto inmunosupresor de los glucocorticoides, al promover la secreción de una variedad de citocinas proinflamatorias, como TNF-alfa, IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ , IL-1 β , además de que inhibe a la citocina inmunomoduladora IL-10, lo que conlleva a la sobreexpresión de MIF y a un desarrollo con un microambiente inflamatorio [20].

Varias estrategias donde se inhibe MIF han demostrado tener éxito en el retraso del desarrollo de cáncer [26]. Estos inhibidores se unen típicamente en la tautomerasa, sitio activo de MIF, modificando covalentemente la prolina catalítica. Entonces los inhibidores

podrían revelar nuevas formas de bloquear la actividad del MIF para fines terapéuticos y así dilucidar las bases estructurales de las diversas propiedades reguladoras del MIF [16].

8. Inhibidores sintéticos de MIF

La función pleiotrópica de MIF hace posible identificar su posible inhibición [31]. Específicamente la inhibición del sitio enzimático activo de MIF con inhibidores competitivos, que tienen la característica de ser moléculas pequeñas, el sitio tautomerásico de MIF ha sido ampliamente estudiado como estrategia para generar estos inhibidores. Antagonistas de MIF pueden interactuar en su sitio activo de tautomerasa a través de diferentes formas, como inhibición competitiva e irreversible [39].

Los compuestos como las isoxazolininas (ISO) han sido ampliamente estudiados como prototipo de inhibidores competitivos de MIF. Son composiciones farmacéuticas involucradas en tratamientos y diagnósticos contra algunas bacterias, parásitos y algunos tipos de cáncer. Este tipo de compuestos son útiles para tratar una variedad de enfermedades que pueden implicar estado de inflamación en humanos u otros mamíferos, donde la actividad de MIF se presenta exacerbada, alterada o no regulada a nivel sistémico o local, o que presente cualquier estado de enfermedad que se module mediante la inhibición de la ruta de ERK/ MAPK [47].

Ejemplos de estos inhibidores que se unen al sitio activo (inhibición competitiva): ISO-1, ISO-66, CPSI-2705, CPSI-1306, SCD-19 y Debio1036 [31].

El inhibidor más estudiado es el isoxazol (ISO-1) que fue reportado por Lubetsky et al. en 2002. Se trata de un inhibidor de la actividad tautomerasa que ha demostrado inhibir muchas de las funciones biológicas de MIF, incluyendo la anulación de glucocorticoides, la translocación nuclear de NF- κ B, la liberación celular y la muerte de células beta inducida por citocinas. ISO-1 y sus derivados también han mostrado una actividad anti-MIF en una serie de estudios *in vivo* con ratones, incluyendo la mejora de la supervivencia en la endotoxemia, la colitis, el melanoma y el cáncer colorrectal [48]. Otro inhibidor muy utilizado es el ISO-66, un análogo de ISO-1 altamente estable. *In vitro* potenció la respuesta inmune anticancerígena específica y no específica, mientras que su administración prolongada en ratones con melanoma singénico establecido, y, cáncer de

colon, no resultó tóxica, además presentó una disminución significativa de la carga tumoral. Un posterior análisis *ex vivo* de los esplenocitos de los ratones reveló que la disminución observada en las tasas de crecimiento del tumor estaba mediada probablemente por la expansión selectiva *in vivo* de las células efectoras antitumorales inducida por ISO-66 [26].

Estos compuestos actúan de modo sistémico, es decir, tras la ingestión, la sustancia activa se absorbe en sangre, a través de la cual se distribuye por todo el cuerpo, de ahí la importancia de que se administren de manera oral [29].

La inhibición de MIF por ISO ha demostrado inhibir la viabilidad y función de distintas líneas celulares de cáncer humano como A549, DU145, LN229, LNH-18 y HS683 [53]. Por el contrario, en modelos *in vivo* se ejercen efectos beneficiosos en modelos de cáncer de próstata y colorrectal [24].

8.1 CPSI-156

Se han desarrollado dos oxazolinas orales derivadas de ISO-66: CPSI-2705 y CPSI-156 (1306). Se ha reportado que mejora significativamente el curso de la enfermedad en modelos de cáncer de vejiga y piel en modelos murinos [11].

CPSI-156, inhibidor sintético de MIF, es una molécula pequeña, hidrofóbica y con estructura de isoxazolina que actúa inactivando el trímero MIF, impidiéndole así, que se lleve a cabo cualquiera de sus actividades biológicas [49] (Sánchez, 2010), y en consecuencia altera también las actividades relacionadas con otras citocinas afectadas por la actividad de MIF, incluyendo interleucinas, IFN- γ y TNF-alfa. La actividad enzimática (tautomerasa) de MIF, así como sus otras actividades biológicas se ven afectadas debido a que estos agentes de bajo peso molecular se unen a MIF, cerca o específicamente en su "sitio activo" (donde MIF se une con sus receptores) [47].

Los vehículos de suministro para fármacos hidrófobos deben ser ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido (DMSO), en algún porcentaje de dilución para disminuir su toxicidad. Adicionalmente, los compuestos se pueden administrar también usando liposomas [47].

9. Ratones C57BL/6

La actual comprensión de la inmunología se definió en gran medida por los ratones de laboratorio, ya que pueden manipularse genéticamente, permite que se realicen análisis de tejido cinético desde el inicio de la enfermedad y además de facilitar su uso en enfermedades que se puedan tratar. Comparativamente, los experimentos reduccionistas no son técnica ni éticamente posibles en los humanos [5].

Los ratones y las ratas son relativamente económicos de criar y mantener. Se pueden reproducir rápidamente y por ende permiten a los investigadores estudiar la función de genes particulares a lo largo de varias generaciones durante un período de tiempo razonable. Sus fisiologías y genéticas han sido estudiadas en profundidad, y pueden ser comparadas a humanos fácilmente [34].

Los ratones C57BL/6, también llamados "C57 black 6" o simplemente "Black 6", tienen como ventajas la estabilidad de la cepa y su fácil crianza. Este también es el primer ratón cuyo genoma fue secuenciado por completo en el año 2005, después del genoma humano [5].

La aplicación de los ratones C57BL/6 sirve como modelo fisiológico o patológico en experimentos *in vivo*. Sus principales características es ser una cepa endogámica. Tienen una vida útil de 10 a 12 meses y se obtiene de ocho a diez camadas [4].

Sus ventajas son la estabilidad de la cepa, de fácil cría y las principales aplicaciones son que sirven como modelos fisiológicos o patológicos para experimentos *in vivo*, cepa de fondo genético para transgénicos y congénitos [3].



Figura 9. Ratón macho de 8 semanas de la cepa C57BL6. Las ventajas del uso de estos ratones son su fácil mantenimiento y cuidado, además de ser una cepa definida y tener eficiencia reproductiva. Montes, 2017, Instituto Tecnológico de Colima.

Justificación

El cáncer colorrectal es la segunda causa de muerte en el mundo ocasionada por tumores malignos [35]. La colitis ulcerativa crónica es una de las enfermedades inflamatorias intestinales que se asocia con un incremento substancial del riesgo de padecer CCR a largo plazo [6].

La inflamación recurrente produce una activación de macrófagos residentes y la infiltración de leucocitos que a su vez inician la producción de citocinas que originan una cascada de eventos esenciales para la respuesta inflamatoria, entre estas citocinas se encuentra MIF, que es una citocina pro-inflamatoria [33]. Es producido por una variedad de tipos celulares que, además de las células inmunes, incluye monocitos/macrófagos, células B y T, y células endoteliales, endocrinas y epiteliales [7].

Actualmente, se reconoce que MIF está fuertemente implicado en patogénesis como sepsis, enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes, lo que sugiere que las terapias dirigidas contra MIF podrían ofrecer nuevas oportunidades de tratamiento para las enfermedades inflamatorias humanas en el futuro [7].

Nosotros queremos analizar la participación de MIF en el CCR asociado a colitis crónica (inflamación crónica), para lo cual desarrollamos en ratones C57BL/6 CCR inducido con Azoximetano (AOM) y Dextrán Sulfato de Sodio (DSS), otro grupo de ratones con CCR tratados con CPSI-156 (el inhibidor sintético de MIF) al inicio de la formación de los pólipos (40 días post-inducción), y como controles se utilizarán ratones sanos con el mismo fondo genético. El fondo genético C57BL/6 se caracteriza por desarrollar respuesta inmune inflamatoria con relativa facilidad y de mayor intensidad que ratones con otros fondos genéticos, como los BALB/c. Utilizar estos ratones ayudará a establecer la influencia de MIF en el desarrollo de la respuesta inmune inflamatoria y su influencia en el desarrollo de CCR.

Hipótesis

MIF participa en la contención del desarrollo del CCR. La inhibición sintética de MIF en el inicio de la formación de pólipos contribuye a la progresión y desarrollo del CCR en ratones con cepa C57BL/6.

Objetivos

Objetivo principal

Estudiar la participación de MIF en el desarrollo de CCR inducido con Azoximetano (AOM) y Dextrán Sulfato de Sodio (DSS) utilizando el inhibidor sintético de MIF CPSI-156 (administrado vía oral) en ratones con fondo genético C57BL/6.

Objetivos particulares

- 1) Desarrollar el modelo de CCR con AOM y DSS en ratones con fondo genético C57BL/6.
- 2) Establecer grupos experimentales: grupo 1) Ratones inducidos con CCR (CCR) grupo 2) Ratones inducidos con CCR y tratados con inhibidor CPSI-156 a partir del día 40 hasta el día 62 post-inducción (CCR+CPSI-156), y grupo 3) Ratones sanos como grupo control (CONTROL)
- 3) Registrar los signos clínicos de los ratones al transcurso del modelo.
- 4) Al término del modelo, comparar longitud, carga tumoral y tamaño de tumores del intestino en los diferentes grupos del modelo.
- 5) Analizar el daño morfológico a nivel microscópico mediante histología al final del modelo.

Material y Métodos

Animales

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa C57BL/6 de 8 a 10 semanas de edad, se mantuvieron durante todo el tratamiento en un ambiente libre de patógenos con libre acceso a agua y alimento en la Unidad de Biomedicina de la FES-Iztacala, UNAM. Todos los estudios en animales se realizaron de acuerdo con las pautas para el cuidado y uso de animales de laboratorio, según lo adoptado y promulgado por los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU. y la regulación mexicana de cuidado y mantenimiento de animales (NOM-062-ZOO-1999, 2001).

Inducción del cáncer colorrectal (CCR) asociado a colitis crónica

Se utilizaron ratones macho de 8 semanas de edad para estandarizar, el experimento se realizó una vez, no hubo repeticiones, el modelo de inducción a CCR en la cepa C57BL/6 ya que estos ratones se caracterizan por una respuesta inicial de perfil Th1, son más susceptibles a desarrollar enfermedades de tipo pro inflamatorio. Los ratones se distribuyeron de esta manera: 3 ratones para CCR, 3 ratones para CCR+CPSI-156 y 2 ratones como CONTROL, n=8. Con una variante del modelo de Neufert (Neufert, 2007) la inducción de CCR consiste en una inyección única de azoximetano (AOM) (10mg/kg peso del ratón) vía intraperitoneal y 3 ciclos de Dextrán Sulfato de Sodio (DSS), marca MP Biomedicals, México, al 2.0 % disuelto en el agua para beber durante 7 días. Cada ciclo comprende un ciclo de DSS 2.0 % seguido por 14 días de descanso donde el agua potable libre de DSS. A partir del día 40 del modelo el inhibidor fue administrado 5 días a la semana, siendo 12 días en total, vía oral con ayuda de una cánula metálica, el vehículo utilizado fue aceite de maíz. La concentración utilizada fue 7.5 mg CPSI / 62,500 µg de aceite de maíz para todo el grupo CCR+CPSI-156.

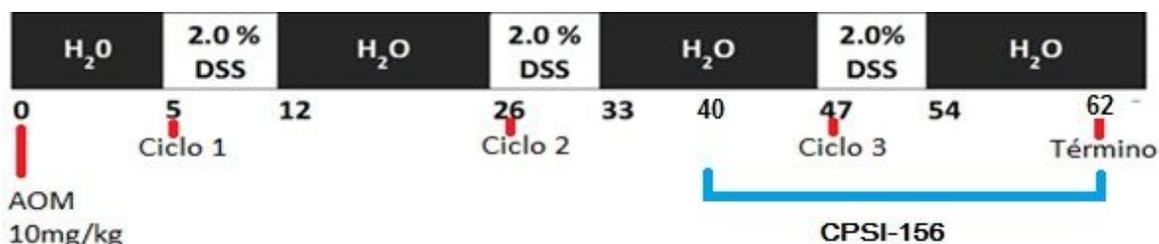


Figura 10. Modelo de CCR inducido por AOM/DSS administrando vía oral el inhibidor de MIF CPSI-156.

Monitoreo de los síntomas clínicos.

Los signos y síntomas clínicos fueron monitoreados según la escala de DAI (Índice de actividad de la enfermedad). Se registró la presencia de diarrea y sangrado rectal, así como la baja de peso de los 3 grupos cada semana durante todo el modelo.

Evaluación de los tumores

Los ratones fueron sacrificados en cámara de CO₂ al día 56 no al día 62 por el deterioro y la baja de peso excesiva que rondaba entre los 13 y 16 gramos al final. Se extrajo el intestino y se midió la longitud del intestino con la ayuda de un vernier. Posteriormente los intestinos fueron lavados con PBS frío para quitar materia fecal, se abrieron longitudinalmente para contar y medir el tamaño de los tumores. Se midió largo y ancho de cada tumor para así obtener la carga tumoral en mm³ con la fórmula: (largo x ancho²) /2.

Análisis histopatológicos

De cada intestino extraído se cortó 0.5 cm de tejido y se fijó en paraformaldehído al 4% durante 24 horas, posteriormente se procesó para su deshidratación (anexo 1 y 2) pasando por alcoholes desde el primero al 50%, hasta un alcohol absoluto, terminando en parafina de inclusión, para después realizar los cortes histológicos a 5 μm y realizar tinciones de Hematoxilina y Eosina (anexo 6) que nos sirvieron para examinar el grado de

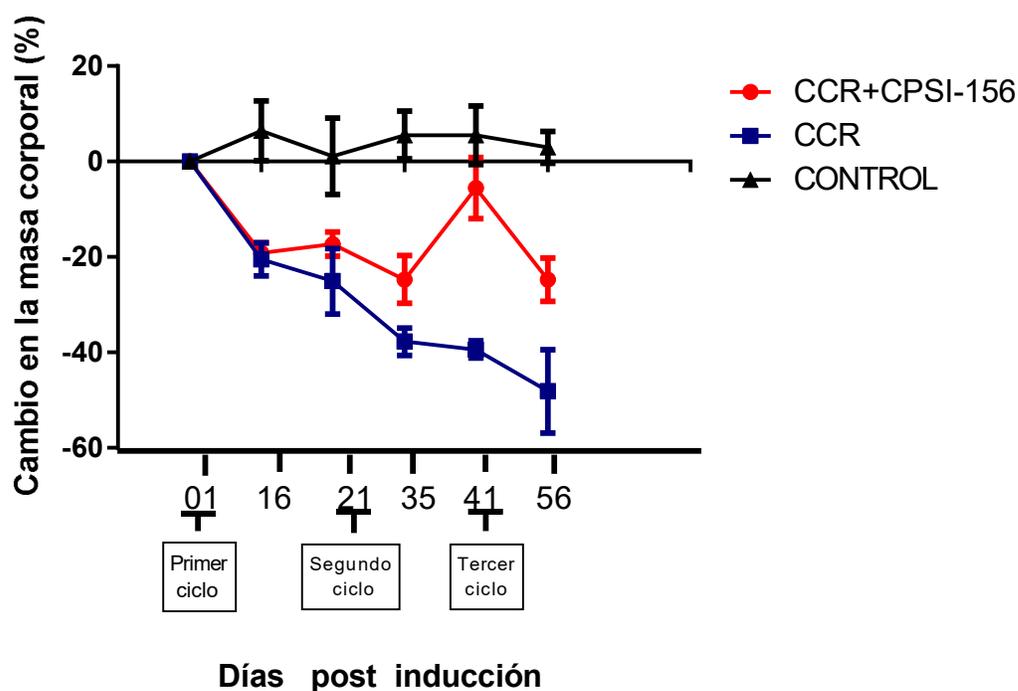
infiltrado celular además de los cambios morfológicos de las criptas intestinales presente en las muestras de cada grupo con ayuda del microscopio de luz.

Resultados

Síntomas clínicos

La pérdida de peso es un síntoma clínico asociado a alteraciones a nivel intestinal como diarrea, por presencia de sangrado y la alteración en la absorción de los nutrientes. Los ratones no alcanzaron a terminar los 62 días del modelo, se sacrificaron al día 56 por el deterioro y la baja de peso excesiva que rondaba entre los 13 y 16 gramos al final.

En la tabla 1 se muestra el registro del porcentaje de peso corporal de los ratones experimentales, los ciclos del suministro de DSS y el comienzo de la aplicación del inhibidor CPSI-156 a partir del día 40 y hasta el día 56.



Gráfica 1. Comparación de la masa corporal en los tres grupos. El eje «X» muestra los días transcurridos del tratamiento y el eje «Y» el porcentaje de cambio de peso tomando cómo 100% el peso del día 0 (antes de cualquier tratamiento). n=8

El grupo CCR y CCR+CPSI-156 tuvieron pérdida de peso a partir del final del primer ciclo. Como se muestra en la figura 11, hubo tres bajas de peso que coinciden con los días en que finalizan los ciclos de DSS, aproximadamente en los días 16, 35 y 41 post inducción en los grupos CCR. Mientras que, el grupo CCR+CPSI-156, recuperó peso en los días de descanso (día 21 y 41 post inducción). Los ratones del grupo CCR fue el grupo más afectado, pues la mayoría bajaron de peso a partir del término del primer ciclo de DSS post inducción y nunca recuperaron su peso. El grupo CONTROL incrementó el peso paulatinamente como resultado del crecimiento normal de los ratones (Figura 11).

El sangrado rectal se manifestó en los dos los grupos que se les indujo CCR, cómo se observa en la figura 11., se observó en mayor grado de daño en el grupo CCR+CPSI-156, ya que aparte del sangrado y diarrea hubo perdida de mucho mucus. Cabe destacar que en las semanas de descanso donde solo se les administraba agua potable, el sangrado paraba. La presencia de diarrea comenzó alrededor de la segunda semana, en el transcurso de primer ciclo de DSS y estuvo presente hasta el final del modelo, mientras que el sangrado rectal se agudizaba con el paso de los días, sobre todo en las últimas dos semanas de tratamiento.

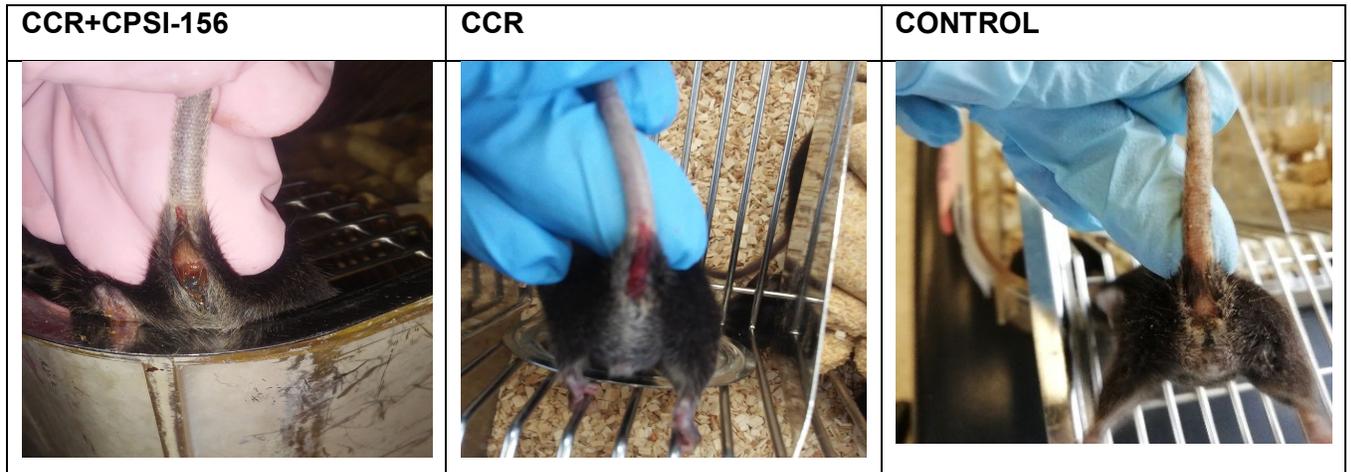
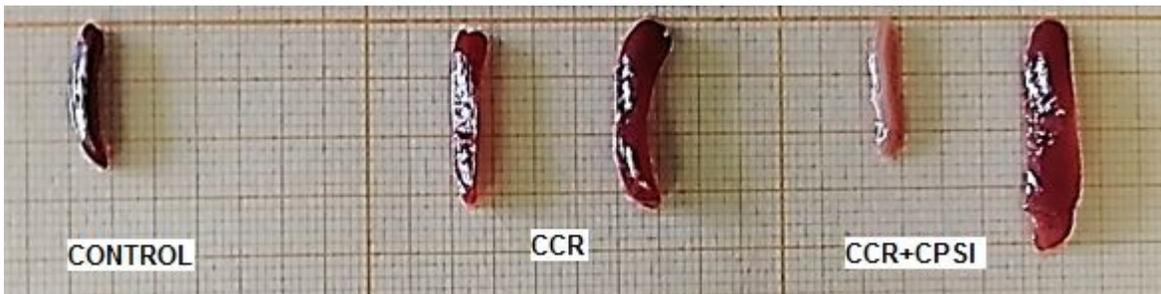


Figura 11. Sangrado rectal al final del segundo ciclo de DSS. Se observa un mayor daño en el grupo CCR+CPSI-156 que en el grupo solo con CCR, **n=8**

Comparación de los órganos 56 días post-inducción de CCR.

Al final del modelo, a los 56 días post-inducción de CCR los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO₂, se abrieron longitudinalmente con ayuda de tijeras y pinzas quirúrgicas para poder retirar bazo, hígado y el intestino. Se lavaron con PBS al 4% frío para limpiarlos.

12A)



12B)

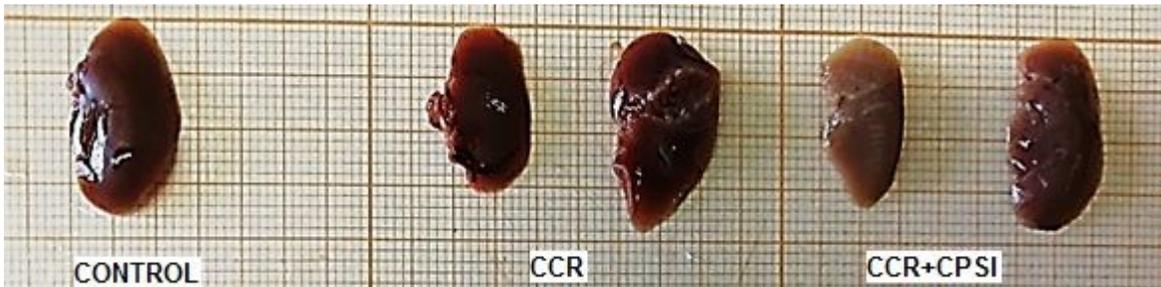


Figura 12. Comparación de bazo (12A) e hígado (12B) de los diferentes grupos de ratones: CCR y CCR+CPSI-156: CONTROL, a los 56 días post-inducción, el término del modelo de CCR inducido con AOM/DSS.

Como se puede observar en la figura 12 A, los bazos de los grupos con CCR cambiaron su morfología, hubo un incremento en el tamaño, en el grupo CCR+CPSI-156 ocurrieron dos cosas, un bazo disminuyó de tamaño muy visiblemente (hipoplenismo) y el otro bazo incrementó su tamaño (hiperplenismo). Todo es comparado con los bazos de los ratones CONTROL.

En cuanto a los hígados no se encontraron diferencias significativas respecto al grupo CONTROL, salvo la falta de coloración en los hígados del grupo CCR+CPSI-156.

Longitud del colon

Al sacrificarse los ratones a los 56 días post inducción se removió el intestino junto al ciego de cada ratón y se registraron las medidas de largo y ancho. La longitud del colon del grupo CONTROL fue de 80 mm, el grupo CCR osciló entre los 100 mm y 80 mm, mientras que el grupo CCR+CPSI-156 la medida osciló entre los 60 mm y 70 mm (Fig 13A).

En la figura 13B se observan los intestinos gruesos abiertos longitudinalmente, se hace visible un acortamiento del colon y el crecimiento de pólipos en el grupo CCR+CPSI-156. En la tabla 2 se graficó en GraphPad Prism 6 el largo del colon en cm de los tres grupos experimentales, siendo el grupo CCR+CPSI-156 el grupo con acortamiento mayor de la longitud del colon.

13A)



13B)

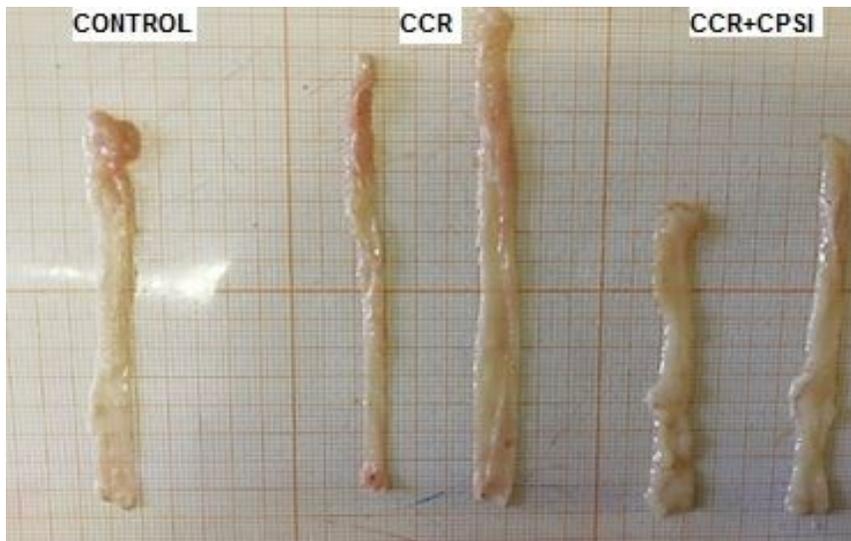
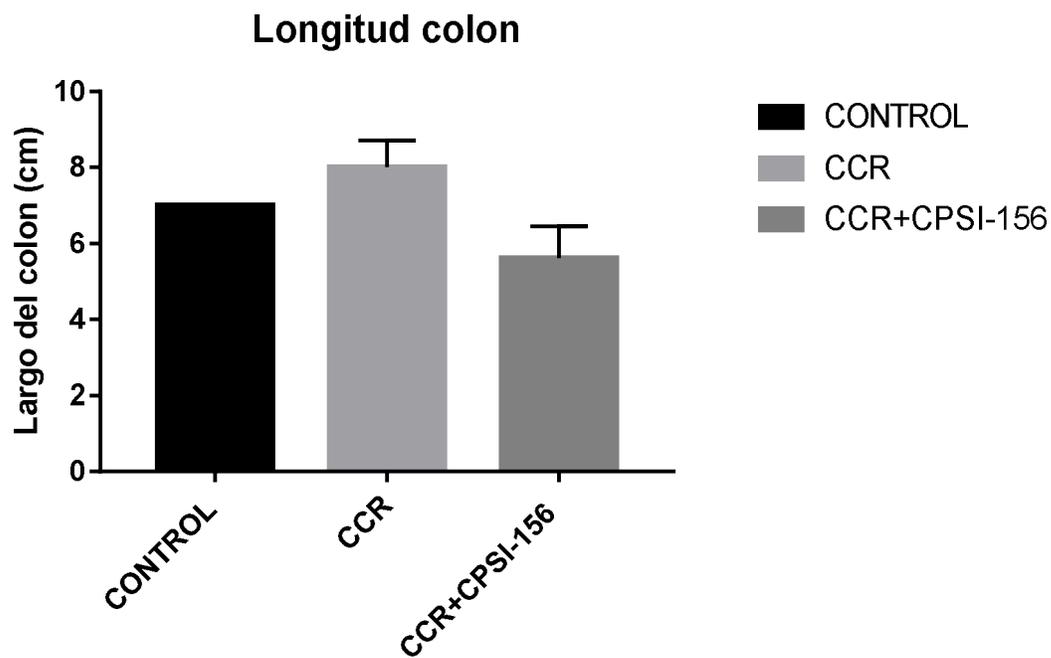


Figura 13. Longitud de los intestinos a los 56 días post-inducción de CCR. A). Fotografía representativa del largo de los intestinos con el ciego gástrico de los tres grupos experimentales. B) Fotografía representativa del largo de los intestinos sin el ciego gástrico, lavados previamente con PBS frío.



Gráfica 2. Gráfica de la longitud del colon de los tres grupos experimentales, CONTROL, Cáncer colorrectal (CCR) y Cáncer colorrectal tratado con inhibidor CPSI-156 (CCR+CPSI-156). N=6 prueba t-student, medias +/- SE(*P<0.05) GraphPad Prism 6.

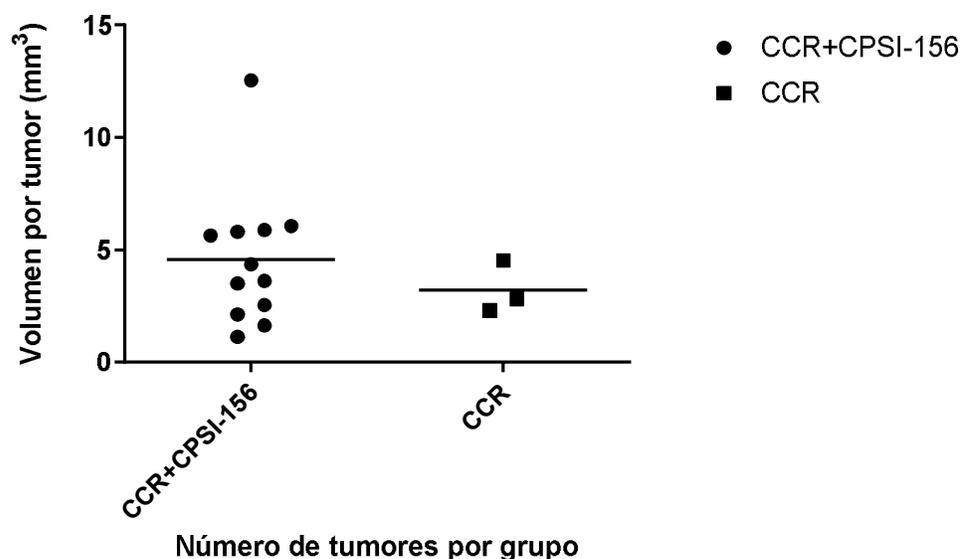
Carga tumoral

En la gráfica 3 se muestra la carga tumoral, referida como la media de las medidas del volumen por tumor que presentó cada grupo a los 56 días post-inducción de CCR. La carga tumoral se refiere al tamaño, en volumen (mm³) y numero de tumores por grupo. Evidentemente el grupo CONTROL no tuvo tumores por lo que no se muestra. El grupo CCR+CPSI-156 registro el mayor número de tumores y ligeramente más grandes comparado al grupo CCR.

El grupo CCR+CPSI-156 desarrollo mayor número de tumores y mayor carga tumoral (14.297±0.013) en comparación con el grupo CCR (4.536±2.304).

El 91.6% de los tumores en el grupo tuvieron un volumen desde 0.013 mm³ hasta los 6.3 mm³, con la excepción de uno que alcanzó los 14.297 mm³ saliéndose del promedio. En el grupo CCR todos los tumores midieron entre 2.3 mm³ a 4.5 mm³.

Carga tumoral por ratón inducidos a CCR con y sin inhibidor



Gráfica 3. Carga tumoral representada en volumen por tumor en mm^3 y el número total de tumores de ratones inducidos con CCR con y sin tratamiento del inhibidor de MIF CPSI-156 a los 56 días post inducción. N=4, prueba *t* de student, $P < 0.05$. GraphPad 6.

Análisis histopatológico

Para conocer el daño celular a nivel morfológico se realizaron cortes histológicos de $5 \mu\text{m}$ del intestino de los ratones del área donde se presentaron los tumores después de los 56 días post inducción, al final del experimento. Evaluamos el daño al epitelio intestinal que está asociado a la formación de criptas aberrantes además de contar con posible infiltrado celular. Para poderlo notar se utilizó la tinción Hematoxilina-Eosina (H&E).

En la figura 14 se muestra el panel de los cortes histológicos representando los tres grupos experimentales.

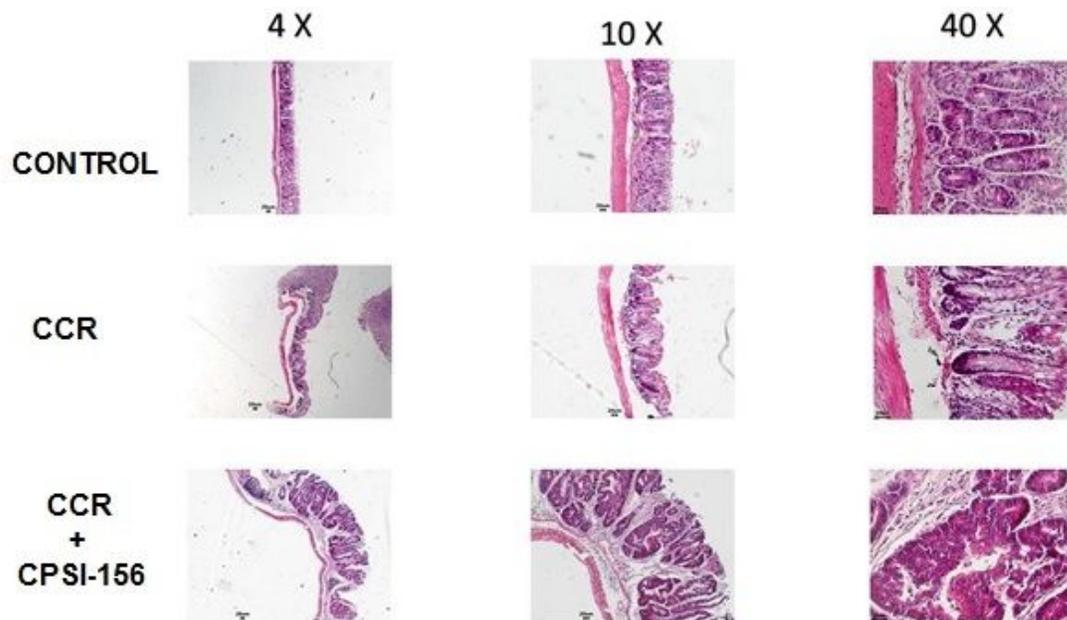


Figura 14. Panel de cortes histológicos del colon en los tres grupos experimentales CONTROL, CCR y CCR+CPSI-156 al final del ciclo del modelo. Visto a 4x, 10x y 40x aumentos. Microscopio marca UNICO.

Un colon sano presenta mucosa, submucosa, muscular externa y serosa. El epitelio es superficial y continuo; sus glándulas intestinales se llaman criptas de LieberkÜhn, estas son tubulares, rectas y no ramificadas. Un colon sano además presenta células caliciformes en abundancia que ayudan a la producción de moco.

En el grupo CCR se observó claramente una deformación en las criptas, éstas se encontraron aglomeradas en disposición tubular, los núcleos se observaron alargados, además de hipercromáticos y pseudoestratificados. Este grupo desarrolló displasia de bajo grado.

El grupo CCR+CPSI-156 desarrolló displasia de alto grado que se definen por la deformación total de las células y la pérdida de polarización de los núcleos. La displasia se basa en el porcentaje del componente vellosa, el cual se define como proyecciones digitiformes de epitelio que son por lo menos dos veces más altas que el grosor de la mucosa normal, llegando a abarcar el 75% del grosor. Se nota una atipia muy visible, las criptas además de estar aglomeradas tienen forma cribiforme y asimétricas. Como se puede observar los núcleos se encuentran más redondos y abiertos con nucléolo prominente, hay pérdida total de la polaridad y mayor grado de pseudoestratificación.

A pesar de que es posible observar el infiltrado celular y las atipias en las criptas; tanto el musculo, la submucosa y el epitelio aún conservan la estructura morfológica normal del intestino.

Discusión

MIF es una molécula con propiedades proinflamatorias que tiene una participación importante en enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la artritis reumatoide, glomerulonefritis, diabetes, aterosclerosis, sepsis, asma y síndrome de dificultad respiratoria aguda [39].

Recientemente se han reportado altos niveles de MIF en cáncer de tejidos como piel, cerebro, pulmón, colon, próstata, mama e hígado [39]. En algunos casos se ha sugerido que la sobreexpresión de MIF resulta en un mal pronóstico, y que probablemente promueva la tumorigénesis [52] al actuar en sinergia con células T reguladoras durante oncogénesis, favoreciendo el escape tumoral de la vigilancia inmunológica [10].

Por lo anterior, definir la participación de MIF en el CCR es de gran interés, ya que podría ser utilizado como marcador de pronóstico o incluso como blanco terapéutico.

En esta tesis proponemos estudiar la participación de MIF en el desarrollo del CCR asociado a colitis crónica inhibiendo sus efectos con el fármaco CPSI-156. El modelo que utilizamos es la generación de CCR en ratones C57BL6 a partir de una inyección de Azoximetano (AOM) y posteriormente la inducción de colitis con dextran sulfato de sodio (DSS). Este modelo tiene grandes ventajas, 1) proviene de un modelo de CCR asociado a colitis crónica, 2) estudiamos el desarrollo de CCR *in novo*, no cuando las células cancerígenas ya están formadas, 3) utilizamos ratones de la cepa C57BL/6 que se caracterizan por desarrollar respuestas inmunes de carácter inflamatorio con mayor intensidad y prontitud que otras cepas de ratones utilizadas comúnmente.

El mecanismo por el cual se genera CCR por este método ya ha sido ampliamente validado. El AOM es metabolizado en el hígado por el citocromo P450, el cual transforma el grupo metil del AOM en metilazoximetano (MAM). MAM produce especies alquilantes que viajan al intestino vía bilis; ahí la alquilación del ADN en células madre provoca que la guanina se convierta en 06-Metilguanina o 04-Metilguanina, causando mutaciones específicas a genes que están implicados en vías de señalización como es el caso de β -catenina y APC, que en humanos son los responsables del CCR [38]. Sin embargo, la sola presencia de AOM no es suficiente para la inducción del CCR, es decir, además de las condiciones generadas por el AOM es necesario generar un ambiente inflamatorio crónico en el colon con DSS que contribuya a la inestabilidad genética para que se desarrolle el CCR.

Los primeros inhibidores de la acción de MIF se reportaron en 1999 mientras se intentaba dilucidar el mecanismo de la actividad de tautomerasa de MIF probando el efecto inhibitor de varias estructuras análogas de su sustrato, el éster metílico de D-dopacromo. Posterior a esto, se estudió de manera más puntual el sitio tautomerásico de MIF con la intención de desarrollar inhibidores eficientes que se unan en este sitio. Así los antagonistas de MIF se pueden unir por diferentes maneras como la inhibición competitiva, alostérica irreversible y por estabilización.

Los inhibidores competitivos tipo isoxazolininas (ISO), como el inhibidor CPSI-156 que nosotros utilizamos, bloquean el sitio activo donde MIF se une a su receptor CD74.

Experimentos *in vivo* con el inhibidor ISO-1 mostraron efectos beneficiosos en modelos de cáncer de próstata y colorrectal [24]. A pesar de estos resultados que parecían prometedores, la cinética enzimática *in vivo* de ISO-1 y su aparente falta de eficacia cuando se administraba vía oral, obstaculizó la utilización en la clínica de este compuesto [31].

Nosotros probamos otro inhibidor tipo ISO, el CPSI-156, el cual se administró con cánula vía oral para tener certeza de que llegara al estómago y fuera asimilado de buena manera, ya que de otra forma era probable que el tratamiento no fuera absorbido adecuadamente por el ratón.

En este trabajo se observó, en el día 56 post-inducción, el desarrollo de pólipos adenomatosos (tumores no cancerosos que se forman en las paredes internas del colon, y que posteriormente pueden progresar a tumores malignos) en los dos grupos estudiados. Sin embargo, el grupo CCR+CPSI-156 presentó acortamiento del colon mayor y más pólipos con mayor volumen tumoral (displasia mayor), en comparación con el grupo CCR. Por lo que probablemente este grupo tenía mayor probabilidad de desarrollar tumores malignos, aunque en ninguno de los dos casos (CCR o CCR+CPSI-156) se observó desarrolló de vascularización como signo de malignidad.

Es probable que no se haya podido observar el desarrollo de tumores malignos debido a la corta duración del modelo. El modelo está basado en el descrito por Neufert, diseñado a 3 ciclos de DSS para inducir colitis severa y la generación de tumores malignos alrededor del día 60 post-inducción. Además, debido a que en esta tesis se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 que desarrollan respuestas inflamatorias severas los ratones tuvieron mucho sangrado y pérdida de peso como consecuencia de una respuesta

inflamatoria exacerbada, lo que resultó en una mortalidad alta y un daño mayor, sobre todo del grupo CCR, el cual después del inicio del tercer ciclo de DSS post inducción pues ya habían perdido entre un 40-50% de su peso.

Los bazos de los grupos CCR y CCR+CPSI-156 cambiaron su morfología; en el grupo CCR se observó un incremento en el tamaño, esto puede deberse al mal funcionamiento del hígado por la colitis que desarrollaron los ratones.

En el grupo CCR+CPSI-156 el tamaño de los bazos fue diferente, de dos organismos que se examinaron uno fue muy pequeño y sin color, el que provenía del ratón que desarrolló más pólipos, y un bazo muchísimo más grande que el CONTROL. Los pacientes que padecen colitis ulcerativa tienen más probabilidades de desarrollar hipoplenismo que puede desencadenarse en septicemia [44]. La falta de coloración en los bazos de este grupo fue por la falta de irrigación de sangre, consecuencia de la enfermedad inflamatoria crónica característica de la colitis.

En un inicio se pensó que el inhibir MIF con CPSI-156 serviría como estrategia terapéutica, debido a los reportes que sugieren que MIF promueve la carcinogénesis, pero no resultó así, por el contrario, la inhibición de MIF en el día 40, al inicio de la formación de los pólipos adenomatosos, promovió el desarrollo de más pólipos con displasia mayor. Por lo que es posible que MIF tenga un papel favorable en la contención del CCR [41]. En este sentido, el presente estudio muestra una perspectiva diferente a los antecedentes sobre el papel de MIF en el desarrollo de CCR.

Podemos decir que el inhibidor sintético de MIF no promovió un evento de angiogénesis, ya que no se observó vascularización en ningún pólipo al evaluarlo al microscopio estereoscópico. Al inhibir MIF se promueve una respuesta inmunitaria inflamatoria fuerte y actúa en conjunto con más citocinas pro inflamatorias.

Es posible que MIF participe en el modelado del microambiente tumoral como lo ha reportado Pacheco-Fernández y col. Ellos demuestran que MIF tiene una participación importante en el reclutamiento de macrófagos y las poblaciones de células T que se infiltran al inicio del desarrollo de tumores colorrectales en modelos murinos [41].

En conjunto, con los resultados que obtuvimos durante el desarrollo de esta tesis, sugerimos que MIF podría actuar promoviendo el proceso inflamatorio, así como el

reclutamiento de células efectoras, lo cual resultaría benéfico en la contención del desarrollo inicial de los pólipos adenomatosos.

La participación de MIF en la fase crónica del CCR, sobre los tumores malignos, ya sea promoviendo la malignidad, angiogénesis o metástasis, es en abordaje de estudio posterior.

Finalmente, para establecer con mayor claridad la participación de MIF y la eficacia del inhibidor CPSI-156 en el CCR es necesario hacer más experimentos que nos permitan corroborar los resultados observados y profundizar en el reclutamiento de células inmunes infiltradas en el tejido tumoral en presencia de MIF o en ausencia por MIF por efecto del inhibidor CPSI-156.

Conclusiones

- El modelo es viable y reproducible en ratones con fondo C57BL/6.
- Los ratones con fondo C57BL/6 tienden a presentar perfil proinflamatorio, esto pudo influir en que los ratones inducidos a CCR tuvieran cuadros más severos de colitis en el desarrollo del modelo de CCR.
- Los ratones del grupo CCR+CPSI-156 presentaron un cuadro más agresivo durante el modelo de AOM/DSS.
- El inhibidor de MIF CPSI-156 favoreció un mayor desarrollo tumoral junto con una disminución en la longitud del colon en los ratones del grupo CCR.
- La administración del inhibidor de MIF CPSI-156 promueve el deterioro de la morfología intestinal al afectar las criptas del intestino.
- MIF juega un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune inflamatoria y probablemente en el reclutamiento de células inmunes, importantes para contener el desarrollo inicial del cáncer.
- Es probable que MIF tenga diferentes efectos sobre el CCR dependiendo de la etapa de desarrollo del cáncer que esté regulando.

Perspectivas

- Incrementar los ciclos de DSS alargando el modelo para analizar la progresión tumoral con más detalle.
- Analizar la producción de IFN-g y TNF-alfa además de interleucinas de interés.
- Realizar cortes histológicos antes del inhibidor (día 40) y posterior a la administración del inhibidor para corroborar si existe una influencia directamente en la génesis tumoral.
- Analizar colon en las tres etapas del modelo: al principio, durante y después de la génesis tumoral.
- Identificar el nivel de mucina en el intestino por la técnica de Eosina-Alcian.
- Por citometría de flujo analizar las poblaciones celulares presentes en el tumor.
- Determinar el perfil de otras citocinas en suero y en el tumor.

Referencias

1. Abbas Abul K, H. Lichtman Andrew, and S. Pober Jordan. Inmunología celular y molecular. Edición a, editor 2002. p.p 13
2. Barrios, E., Garau, M. 2017. Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos. Universidad República de Uruguay. AnFaMed – ISSN: 2301-1254.
3. Barnett B, Ciocca M, Goenka R, Barnett L, Wu J, Laufer T, et al. 2012. Asymmetric B cell division in the germinal center reaction. *Science*.;335:342-4
4. Benavides, F., Guénet, J. 2014. Manual de genética de roedores de laboratorio, principios básicos y aplicaciones. Recuperado de: <https://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/00-GENETICA-indice.pdf>
5. Beura L, Hamilton S, Bi K, Schenkel J, Odumade O, Casey K, et al. 2016. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature*.;532:512-6
6. Cabré, E. Domènech E. 2012. Manifestaciones y complicaciones extraintestinales de la enfermedad inflamatoria intestinal. Unidad de EII, Servicio de Aparato Digestivo. Centro de Investigación Biomédica en Red – Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Barcelona.
7. Calandra, T. Roger, T. 2003. Macrophage migration inhibitory factor: A regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol.*, 3 (2003), pp. 791-800
8. Canavan, C., Abrams, K. R. 2006. Meta-analysis: colorectal and small bowel cancer risk in patients with Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 231097–1104.
9. Chávez, S. F. R. 2017. Células T reguladoras tímicas: su origen, función e importancia en la salud y la enfermedad. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad de México, México. ISSN 0026-1742
10. Choi, S., Kim, H.R., Leng, L. 2012. Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulatory T cell response of tumor bearing mice. *J Immunol.* 2012; 189: 3905–13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102152>.

11. Choudhary S, Hegde P, Pruitt JR, Sielecki TM, Choudhary D, Scarpato K, et al. Macrophage migratory inhibitory factor promotes bladder cancer progression via increasing proliferation and angiogenesis. *Carcinogenesis*. 2013;34(12):2891-9.
12. Denking C et al., 2004. Macrophage migration inhibitory factor and its role in autoimmune diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 52(6):389–400.
13. DeNardo, D, G., Andreu, P., Coussens, L.M. 2010. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 309–316.
14. Díaz, C. S. D., Arámbula, V. F., Picos, C. V. J., Gallardo, D. D. Z. 2015. Tópicos selectos de biomedicina. Universidad Autónoma de Sinaloa, México. Ángel Flores s/n, colonia Centro, Culiacán, 80000 (Sinaloa).
15. Eisenmann, D. 2005. Wnt signaling. Department of Biological Sciences, University of Maryland Baltimore County, Baltimore, MD 21250 USA.
16. Fengwei, B., Oluwatoyin, A, A. 2012. A Novel Allosteric Inhibitor of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 287, NO. 36, pp. 30653–30663. The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Published in the U.S.A.
17. Fernández, J, N. 2006. Inflamación crónica, la clave de la carcinogénesis. Hospital Universitario San Ignacio Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá – Colombia *Rev. Arg. de Urol.* · Vol. 71 (4)
18. Galiano, M, T. 2005. Cáncer Colorrectal (CCR). *Revista Colombiana de Gastroenterología* vol.20 no.1 Bogotá. ISSN 0120-9957.
19. Garza, J, G. 2014. El Cáncer. Universidad Autónoma de Nuevo León. ISBN: 978-607-27-0215-8.
20. García, M, I. Mosso, U, G. Valle, M, J. Rojas, I, P. 2014. El factor inhibidor de la migración de macrófagos y su relación con la obesidad y la diabetes. Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes, Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero. Chilpancingo, Guerrero. Instituto de Investigación en Ciencias Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Genómica, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara. Jalisco, México.
21. GLOBOCAN World Health Organization. 2018: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. Lyon,France: International Agency for Research on Cancer

22. Grenón, S, L. Mereles, B, E. 2014. Citocinas y Quimiocinas. Cátedra de Inmunología de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias Exactas Química y Naturales. Universidad Nacional de Misiones. Provincia de Misiones, Argentina.
23. Hanahan, D. Weinberg, R. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. The Swiss Institute for Experimental Cancer Research (ISREC), School of Life Sciences, EPFL, Lausanne CH-1015, Switzerland. The Department of Biochemistry & Biophysics, UCSF, San Francisco, CA 94158, USA. Whitehead Institute for Biomedical Research, Ludwig/MIT Center for Molecular Oncology, and MIT Department of Biology, Cambridge, MA 02142, USA.
24. He, X., Chen, K., Yang, J., Li, X., Gan, H., Liu, C. Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer. 2008. *Mol Med.* 15: 1. <https://doi.org/10.2119/molmed.2008.00107>.
25. Instituto Nacional del Cáncer. 2015. Factores de riesgo de cáncer. Instituto Nacional del Cáncer de los Institutos Nacionales de la Salud de EE.UU.
26. Ioannou, K., Cheng, K. F., Crichlow, G. V., Birmpilis, A. I., Lolis, E. J., Tsitsilonis, O. E., & Al-Abed, Y. (2014). ISO-66, a novel inhibitor of macrophage migration, shows efficacy in melanoma and colon cancer models. *International journal of oncology*, 45(4), 1457–1468. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2551>
27. Italiani, P., & Boraschi, D. J. F. i. i. (2014). From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. 5, 514.
28. Jacobo, V. P. M., Huerta, L. J. M., Cravioto, Q. P. 2017. Interacciones entre el cáncer y el sistema inmunológico. Instituto Nacional de Pediatría. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. Vol. 26, Núm. 2 • Mayo-Agosto 2017 pp 56-63
29. Junquera P. 2016. Isoxazolinas para uso veterinario en perros contra pulgas y garrapatas.
30. Kolligs FT, Bommer G, Göke B. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*. 2002;66(3):131-44.
31. Mangano, K., Mazzon, E., Basile, M. S., Di Marco, R., Bramanti, P., Mammana, S., Petralia, M. C., Fagone, P., & Nicoletti, F. (2018). Pathogenic role for macrophage migration inhibitory factor in glioblastoma and its targeting with specific inhibitors as novel tailored therapeutic approach. *Oncotarget*, 9(25), 17951–17970. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24885>

32. Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., & Mantovani, A. J. T. J. o. I. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. 177(10), 7303-7311.
33. Mejía, J, M. Álvarez, M, M. 2015. Factor inhibitor de la migración de macrófagos en mujeres obesas y no obesas con síndrome de ovarios poliquísticos. *Endocrinología y Nutrición*. Volume 62, Issue 1, January 2015, Pages 31-37
34. Montes, G, E, S., Andrade, U, M, F., Hernández, S, D, A. 2017. Diseño de protocolo para el manejo de ratones cepa C57BL/6. Instituto Tecnológico de Colima. Tecnológico Nacional de México. SEP. México
35. Molina Villaverde, R. Jiménez Gordo, A, M. López Gómez, M. 2017. Cáncer Colorrectal. Servicio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología. Hospital Universitario Príncipe de Asturias. Alcalá de Henares. Madrid. España. *Medicine*. 2017;12 (32):1911-8 Vol. 12. Núm. 32.
36. Munro, D. A., & Hughes, J. J. F. i. p. (2017). The origins and functions of tissue-resident macrophages in kidney development. 8, 837.
37. National Toxicology Program. 2005. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program Report on Carcinogens. Eleventh Edition. U.S.
38. Neufert C, Becker C, Neurath MF. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nature protocols*. 2007;2(8):1998-2004.
39. Ouertatani, S.H., El, T., Fauvet, B. C. Identification and characterization of novel classes of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors with distinct mechanisms of action. 2010. *J Biol Chem*. 285: 26581–98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.113951>.
40. Okabe, Y., Medzhitov, R. J. N. Tissue biology perspective on macrophages. 2016. 17(1), 9. Onodera, S., Suzuki, K., Matsuno, T., Kaneda, K., Takagi, M., & Nishihira, J. J. I. (1997). Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. 92(1), 131-137.
41. Pacheco, F. T., Juárez, A. I., Illescas, O., et al. 2019. Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes the Interaction between the Tumor, Macrophages, and T Cells to Regulate the Progression of Chemically Induced Colitis Associated

- Colorectal Cancer. Research Article. Hindawi. Mediators of Inflammation. Volume 2019. Article ID 2056085. 16 pages. Unidad de Biomedicina. UNAM. México.
42. Pérez, C. T., Puebla, M, A., Miján, T. 2008. Tratamiento nutricional en la enfermedad inflamatoria intestinal. Servicio de Medicina Interna. Complejo Asistencial de Burgos. Servicio Aparato Digestivo. Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid, España. ISSN 0212-1611.
 43. Peterson, LW. Artis, D. 2014. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immuno*; 14:141–153. Doi: 10.1038/nri3608.
 44. Ryan, F. P. Smart, R. C., Holdsworth, C. D. 1978. Hyposplenism in inflammatory bowel disease. From the Departments of Medicine, Medical Physics, and Haematology, The Royal Infirmary, Sheffield. *Gut*, 1978, 19, 50-55
 45. Tarver T. Cancer Facts & Figures 2012. American Cancer Society (ACS). *J Consum Health Internet*. 2012;16(3):366–7.
 46. Rubín, D, C., Shaker, A., Levin, M, S. 2012. Chronic intestinal inflammation: Inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. Washington University School of Medicine. *Frontiers in Immunology*.
 47. Thais Sielecki-Dzurdz VFDLC. 2013. Compounds, compositions, processes of making, and methods of use related to inhibiting macrophage migration inhibitory factor.
 48. Trivedi-Parmar, V., & Jorgensen, W. L. (2018). Advances and Insights for Small Molecule Inhibition of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Journal of medicinal chemistry*, 61(18), 8104–8119. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00589>
 49. Sánchez-Zamora Y, Terrazas LI, Vilches-Flores A, Leal E, Juárez I, Whitacre C, et al. Macrophage migration inhibitory factor is a therapeutic target in treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The FASEB Journal*. 2010;24(7):2583-90
 50. Schreiber, R. D., Old, L. J., Symyth, M. J. 2011. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer. 1. Department of Pathology and Immunology, Washington. University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA
 51. Strasser, K. Birnleitner, H. Beer, A. Pils, D. Gerner, M. Klaus, G. Schmetterer, T. Bergmann, M. 2019. Immunological differences between colorectal cancer and normal mucosa uncover a prognostically relevant immune cell profile, *OncolImmunology*, 8:2, DOI: 10.1080/2162402X.2018.1537693

52. Suzuki, K., Onodera, S., Kaneda, K., et al. 1997. Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion. Dr J. Nishihira Central Research Institute, Hokkaido University School of Medicine, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060, Japan. Doi:10.1046/j.1365-2567.1997.00311.x
53. Winner, M., Zierow, S., Rendon, B.E. A novel, macrophage migration inhibitory factor suicide substrate inhibits motility and growth of lung cancer cells. 2008. *Cancer Res.* 68: 7253–7. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6227>.
54. U.S. 2006. Department of Health and Human Services. *The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General.* Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Coordinating Center for Health Promotion, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health.

ANEXO TÉCNICO

Anexo 1. Histología-deshidratación de intestino

1. Obtenido el tejido debe quedarse en paraformaldehído al 4%.
2. Si es un tejido grande debe cortarse a la mitad dependiendo de cómo se quieran los cortes si transversales o longitudinales.
3. Esto debe permanecer en paraformaldehído por lo menos 1 semana para empezar con el tren de deshidratación.

Anexo 2. Tren de deshidratación

El alcohol utilizado es etanol de 96° (este se toma como alcohol de 100%).

- | | |
|------------------------|----------|
| 1. Agua corriente | 30 min |
| 2. Alcohol al 50% | 30 min |
| 3. Alcohol al 60% | 20 min |
| 4. Alcohol al 70% | 20 min |
| 5. Alcohol al 75% | 20 min |
| 6. Alcohol al 80% | 20 min |
| 7. Alcohol al 85% | 20 min |
| 8. Alcohol al 90% | 20 min |
| 9. Alcohol al 96% | 20 min |
| 10. Alcohol al 100% I | 20 min |
| 11. Alcohol al 100% II | 20 min |
| 12. Alcohol amílico I | 20 min |
| 13. Alcohol amílico II | 20 min |
| 14. Parafina I | 24 Horas |
| 15. Parafina II | 24 horas |

16. INCLUSIÓN

Anexo 3. Inclusión en parafina

La inclusión o formación del bloque de parafina se efectuará empleando moldes de metal los cuales se llenarán con parafina caliente, se tomará el tejido y se sumergirá colocándolo de la manera de interés. El bloque de parafina deberá contener la muestra correctamente orientada para facilitar la obtención de las secciones o “cortes”.

Anexo 4. Realización de cortes en micrótopo

Una vez incluido el tejido en parafina, se realizarán cortes en el micrótopo a un grosor de de 3-5 μm , obteniendo una tira de secciones, que se podrán manipular con pinceles y lancetas para poder llevar a cabo el estiramiento y el tejido quede extendido adecuadamente antes del proceso de fijación en el portaobjetos, los cuales estarán previamente poli I-2 para que el tejido quede adherido.

Anexo 5. Histología

Poner a calentar el aparato Path Vicka a 40°C, se le agrega 100 ml de agua y aproximadamente 1 gramo de grenetina para fijar los cortes en los portaobjetos. Una vez que se realizaron los cortes en el micrótopo las láminas de los cortes se colocan en el Path Vicka previamente calentando, se deja unos segundos y se recolectan con el portaobjetos para sacarlos y que estos se sequen.

Poner a calentar el aparato Path Vicka a 40 °C. Agregarle 100 ml de agua y aproximadamente 1 gr de grenetina. Una vez realizados los cortes en el micrótopo las láminas resultantes se colocan dentro del Path Vicka previamente calentado, se deja unos segundos y se recolectan con los portaobjetos.

Anexo 6. Tinción de H & E

La técnica de H y E es usada para poder observar por el microscopio óptico las células individualizadas y núcleos.

1. Xilol 1	15 min.
2. Xilol 2	5 min.
3. Alcohol Absoluto	10 lavados.
4. Alcohol al 90%	10 lavados.
5. Alcohol al 80%	10 lavados.
6. Alcohol al 70%	10 lavados.
7. Agua corriente	10 lavados.
8. Hematoxilina de Harris	5 min.
9. Agua corriente	10 lavados.
10. Alcohol ácido 70% al 1%HCL	1 lavado.
11. Agua corriente	10 lavados.
12. Carbonato de Litio	1 lavado.
13. Agua corriente	10 lavados.
14. Alcohol absoluto	10 lavados.
15. Eosina	7 minutos.
16. Alcohol 70%	10 lavados.
17. Alcohol 80%	10 lavados.
18. Alcohol 90%	10 lavados.
19. Alcohol 100%	10 lavados.
20. Alcohol-Xilol	10 lavados.

21. Xilol 1 1 lavado.

22. Xilol 2 1 lavado.

23. Montar en Resina Entellan

Anexo 7. Canulación modelos murinos

1. Fijar la cánula de metal a una jeringa ultra fine 6mm, 0,5 mL.
2. Estirar ratón de manera firme para poder introducir la cánula de manera que esté en un ángulo de 90°.
3. Mover la lengua del ratón hacia un lado de manera que no lo ahogamos.
4. Deslizar de forma suave pero firme, hacer una pausa cuando se llegue al diafragma, esperar a que se abra y seguir introduciendo hasta llegar al estómago.