



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“EFECTO DEL RECEPTOR MGL EN EL DESARROLLO DEL  
CÁNCER COLORRECTAL ASOCIADO A COLITIS EN UN  
MODELO MURINO”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A:

FLORES ACOSTA ALEXIS

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Miriam Rodríguez Sosa



Cd. Mx. 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Apoyos recibidos:

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

Sin duda de las partes más difíciles, por el hecho de no saber con exactitud cuáles son las palabras que puedan aproximarse a lo que siento. Trataré de ser lo más fiel posible a lo que llevo dentro y al leerse pueda generarse una idea de lo que pobremente quiero expresar con palabras. Sin duda alguna debo iniciar agradeciendo a la persona que ha hecho posible esto; y sin exageración alguna decir que esa persona es la Dra. Miriam Rodríguez Sosa. Fue y ha sido un apoyo desde que inicie mi camino en su laboratorio. Desde que me acogió cuando estaba perdido, sin ella no hubiese sido posible esto. Es por eso que le agradezco por todo, ha sido una guía y pilar no solo en materia sino en la propia vida. No existen tantas palabras para agradecer algo así, es por eso que creo que la mejor manera de agradecimiento es siendo mejor, no solo académicamente sino también como persona. No sé qué me depara el destino pero sin duda alguna trataré de dar lo mejor de mí sea cual sea mi camino. Y sin duda alguna le puedo asegurar que no la olvidaré porque me ha enseñado que el ayudar y confiar puede crear un lugar mejor. La quiero.

También quiero agradecer a Imelda que ha sido más que una compañera de laboratorio, ha sido una amiga. De igual manera me ha ayudado más allá de lo ordinario, más allá de lo común. Me ha enseñado más que tecnicismos, me enseñó que la ayuda puede llegar cuando uno menos lo espera. Gracias por todos los consejos y pláticas a lo largo del tiempo y el transcurso hacia el hogar.

Al buen amigo Tony, ha sido una gran persona y amigo que nunca ha dudado ni un momento en ofrecerte su ayuda y apoyo. Ha sido mi conciencia y el amigo que no da tregua al momento de recordar lo que debes hacer. En verdad gracias por eso, ya que como lo ha visto mi concentración y disciplina está en trabajo todo el tiempo.

Al Dr. Oscar el cual se convirtió en un amigo, que hacía que lo tedioso y muchas veces aburrido fuera mejor. Con el cual aprendí varias cosas, que confío no las olvidaré. Gracias por su ayuda y su apoyo cada vez que lo necesitaba, realmente gracias.

A la Dra. Cristian por enseñarme que no necesitas conocer a alguien para brindarle tu ayuda, por sus consejos y regaños que en verdad necesitaba. Gracias.

A Danae y Alexia que me apoyaban cada vez que podían y por sus consejos y guías hacia el futuro que espero alcanzar.

A Beth porque siempre estaba dispuesta a ayudar y a brindar su apoyo siempre que uno lo requería.

A Andrés y Memin, amigos que aunque el tiempo de vernos de manera frecuente ha terminado no los olvido y recuerdo con cariño todos los buenos momentos de risas y alegría. Gracias.

Por último pero no por eso menos importante, a Mariana porque aunque fugaz, los días en los que la vida nos permitía coincidir, sin lugar a dudas los días se volvían mejores.

Gracias a la UNAM y al CONACyT por su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

## Dedicatoria

Este trabajo no es la culminación de un esfuerzo único, es en realidad el resultado del trabajo y esfuerzo de mis padres, familia y amigos. Las personas que te apoyan, cuidan y guían por siempre. Escribo lo que no puedo pronunciar con palabras, no me faltan ganas pero sí valor. A mis padres por su apoyo en todo momento, y su gran esfuerzo para que se pudiera lograr este objetivo, mirando atrás y observar todo lo vivido me doy cuenta de todo el trabajo que viene detrás. Hubo momentos difíciles en los que creía que esto no iba ser posible pero gracias a su apoyo se logró. Termina una etapa pero inicia otra, sé que contaré con su apoyo, solo espero poder devolverles aunque sea un poco todo el apoyo que me han brindado. Esto también es para mis hermanos soy el primero pero en verdad espero y confío en que no seré el último. A mis amigos, la familia que uno elige. No nombraré a cada uno, no por antipático, sino porque guardo sus recuerdos y confío en que logran saber quiénes son. Como alguna vez leí, no importa lo que se dice sino lo que no es necesario decir. Gracias a ustedes es que la palabra amigo tiene un significado. Para concluir esta breve dedicatoria, quiero iniciar dando una disculpa, porque dentro de mí, sé que no he sido el mejor hijo, estudiante, amigo y compañero, tanto para mi familia de sangre como para la que no lo es. Y puedo prometerles que no exagero, aún hay dentro de mí muchas cosas por cambiar y otras tantas por luchar. Puedo asegurarles que les reservo lo mejor de mí. Para despedirme les dejo una cita de uno de mis autores favoritos, no creí necesario escribir algo propio ya que esta frase describe perfectamente lo que siento. Sin antes mencionar que llevo a todos en mi mente y corazón. Tengo de ustedes, un recuerdo... un gesto... una canción... que atesoro y guardo siempre en mí, hasta el último de mis días.

*"No camines delante de mí, puede que no te siga..."*

*No camines detrás de mí, puede que no te guíe..."*

*Camina junto a mí y sé mi amigo.*

*(Albert Camus)*

## ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Cáncer .....	2
1.1.1. Mantenimiento de la señalización de proliferación celular .....	3
1.1.2. Evadir los supresores de crecimiento .....	3
1.1.3. Resistencia a la muerte celular .....	4
1.1.4. Inmortalidad Replicativa .....	4
1.1.5. Angiogénesis.....	5
1.1.6. Metástasis.....	5
1.2. Cáncer de Colón .....	5
1.2.1. Cáncer de colón en México .....	6
1.2.2. Factores de riesgo (sexo, raza, edad) .....	6
1.2.3. Factores de riesgo genéticos .....	8
1.2.4. Etapas de desarrollo del CCR.....	8
1.2.5. Vías de carcinogénesis del CCR .....	8
1.2.6. Vías cancerígenas.....	10
1.2.7. Subtipos de cáncer colorrectal.....	11
1.2.8. Inflamación en el colon.....	12
1.2.9. Participación de los TLRs .....	14
1.3. MGL en la respuesta inmune.....	15
1.3.1. MGL en cáncer .....	16
2. Justificación.....	18
3. Objetivo general .....	18
4. Objetivos particulares .....	18
5. Metodología .....	18
5.1 Ratones. ....	19
5.2 Confirmación de la presencia del gen que codifica para MGL en ratones WT. ....	19
5.3 Establecimiento del Modelo AOM/ DSS. ....	19
5.4 Análisis Histológico.....	20
5.5 Determinación de la expresión de MGL1 y MGL2 en MØ WT ( <i>Mgl</i> +/+) y MØ 20	

5.6 Determinación de poblaciones celulares mediante citometría de flujo .....	20
5.7 Niveles de proteínas de las vías ERK1/2 y AKT.....	21
5.8 Análisis estadístico .....	22
6. Resultados .....	23
6.1 Análisis de la expresión del receptor MGL1 en macrófagos y células dendríticas .....	23
6.2 Los ratones WT CCR no obtienen una ganancia de peso normal desde el primer ciclo de DSS.....	24
6.3 Los ratones MGL -/- desarrollan menos tumores de menor tamaño.....	25
6.4 Los ratones WT CCR tienen más daño histológico en comparación con los ratones MGL1-/- CCR.....	27
6.5 Citometría de Flujo .....	30
7. Discusión .....	33
8. Conclusiones .....	37
9. Literatura citada.....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Sellos distintivos del cáncer.....	3
<b>Figura 2.</b> Los 10 países con más incidencia de cáncer colorrectal.....	7
<b>Figura 3.</b> Vías de carcinogénesis colorrectal .....	11
<b>Figura 4.</b> Subtipos anatómicos de cáncer colorrectal y sus asociaciones con características moleculares tumorales y otros factores. ....	12
<b>Figura 5.</b> Esquema general de las células del colon y del sistema inmunológico.....	13
<b>Figura 6.</b> Se encontró que el receptor MGL1 solo está presente en células dendríticas y macrófagos de ratones WT .....	24
<b>Figura 7.</b> Seguimiento de peso corporal (expresado en porcentaje) de los ratones WT y MGL <sup>-/-</sup> .....	25
<b>Figura 8.</b> Inducción de cáncer en el modelo murino. ....	26
<b>Figura 9.</b> Número de tumores en cada grupo experimental.....	27
<b>Figura 10.</b> Tamaño de tumores entre grupos experimentales .....	27
<b>Figura 11.</b> Evaluación histológica de desarrollo tumoral.....	28
<b>Figura 12.</b> Tinción de azul Alcian en los diferentes grupos experimentales. ....	29
<b>Figura 13.</b> Análisis de linfocitos T provenientes de bazo mediante citometría de flujo. ....	30
<b>Figura 14.</b> Análisis de células mieloides supresoras provenientes de circulación mediante citometría de flujo.....	31
<b>Figura 15.</b> Análisis de los factores de transcripción ERK y AKT mediante Western Blot .....	32

## **ABREVIATURAS**

**ADN** ácido desoxirribonucleico

**CCR** cáncer colorrectal

**CAC** cáncer asociado a colitis

**EII** enfermedad inflamatoria intestinal

**CD** células dendríticas

**TLRs** receptores tipo toll (del inglés Toll-like receptors)

**MØs** macrófagos

**CLR** receptores de lectina tipo C (del inglés C- type lectin receptors)

**MGL** lectina tipo C de galactosa de macrófagos (del inglés macrophage Galactose lectin)

**APC** células presentadoras de antígenos (del inglés Antigen presenting cell)

**GalNAc** N-acetilgalactosamina

**MHC** complejo principal de histocompatibilidad (del inglés major histocompatibility complex)

**AOM** azoximetano

**DSS** dextran sulfato de sodio

**WT** silvestre (del inglés wild-type)

## Resumen

La lectina tipo C de galactosa de macrófagos (MGL), se une con alta afinidad a las glicoproteínas que expresan residuos terminales de N-acetilgalactosamina (GalNAc) o galactosa (Gal), esta característica le permite reconocer patrones de glucosilación anormales de las células malignas, que permite la interacción de las células cancerosas con plaquetas, leucocitos y células endoteliales, facilitando la invasión tumoral, la metástasis y la respuesta inmunosupresora. Sin embargo, no se ha descrito la participación de MGL en los procesos inmunológicos durante el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis (CAC). Establecer la participación de MGL en esta patología permitirá conocer los mecanismos asociados a su desarrollo y malignidad. Para determinar el papel de MGL en el CAC, analizamos el desarrollo tumoral en ratones WT ratones WT (*Mgl* +/+) y KO (*Mgl* -/-) con fondo genético C57BL/6 tratados con azoximetano (AOM) y dextran sulfato de sodio (DSS). Después de la inducción de CAC, los ratones WT mostraron un mayor daño en la arquitectura colónica, así como un mayor número de tumores en comparación al grupo (*Mgl* -/-) De igual manera el grupo (*Mgl* -/-) presentó una mayor población de linfocitos CD8. Sin embargo, el grupo WT presentó mayor número de células mieloides supresoras de origen monocítico. Por último, se encontró que los ratones WT con CAC registraron una mayor fosforilación de ERK en comparación de los ratones (*Mgl* -/-). Estos hallazgos sugieren que MGL juega un papel importante en la promoción y progresión de la carcinogénesis asociada a colitis.

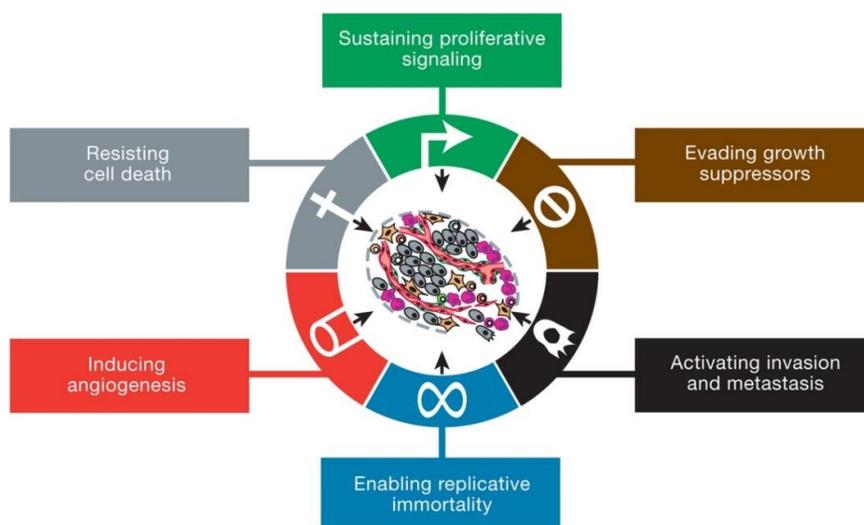
## **1. Introducción**

### **1.1 Cáncer**

El cáncer es una enfermedad en la cual se desarrollan células anormales que adquieren la capacidad de dividirse sin control y pueden invadir los tejidos cercanos. Esta alteración es considerada una enfermedad heterogénea, (especialmente por su localización anatómica, por las diferencias raciales, genéticas y por las interacciones del estilo de vida que influyen en su desarrollo), y muy dinámica con múltiples componentes moleculares en evolución [2].

Esta enfermedad es uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial, reconocida como la segunda causa de muerte en los Estados Unidos de América. Se reconocen, por su alta incidencia principalmente 5 tipos de cáncer: pulmonar, hepático, colorrectal, gástrico y mamario (Organización Mundial de la Salud, 2018).

El cáncer posee sellos distintivos, los cuales comprenden seis capacidades biológicas adquiridas durante el desarrollo de los tumores. Los sellos constituyen un principio organizador para racionalizar las complejidades de la enfermedad neoplásica. Incluyen; 1) mantener la señalización proliferativa, 2) evadir los supresores del crecimiento, 3) resistir la muerte celular, 4) permitir la inmortalidad replicativa, 5) inducir la angiogénesis 6) activar la invasión y la metástasis (Gráfico 1). Detrás de estos sellos se encuentra la inestabilidad del genoma, que genera la diversidad genética que acelera su adquisición; y la inflamación, que fomenta varios sellos distintivos [3].



**Gráfico 1.** Sellos distintivos del cáncer. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* (2011)

### 1.1.1.

#### **Mantenimiento de la señalización de proliferación celular**

Las células normales requieren señales de crecimiento mitogénico antes de que puedan pasar de un estado inactivo a un estado proliferativo activo. Estas señales se transmiten a la célula mediante receptores transmembrana que se unen a clases distintivas de moléculas de señalización: factores de crecimiento difusibles, componentes de la matriz extracelular y moléculas de adhesión / interacción de célula a célula. Sin embargo, las células cancerígenas generan propias señales de crecimiento, reduciendo así su dependencia de la estimulación de su microambiente tisular normal. Esta liberación de la dependencia de señales derivadas exógenamente interrumpe un mecanismo homeostático de importancia crítica que normalmente opera para asegurar un comportamiento adecuado de los diversos tipos de células dentro de un tejido [4].

#### **1.1.2. Evadir los supresores de crecimiento**

Además de la capacidad característica de inducir y mantener señales estimulantes del crecimiento que actúan positivamente, las células cancerosas también deben eludir

programas poderosos que regulan negativamente la proliferación celular; muchos de estos programas dependen de la acción de los genes supresores de tumores [4].

### **1.1.3. Resistencia a la muerte celular**

La muerte celular programada por apoptosis funciona como un mecanismo natural para evitar el desarrollo del cáncer. Las vías de señalización que regulan el programa apoptótico han revelado cómo se desencadena la apoptosis en respuesta a diversos tipos de estrés fisiológicos que experimentan las células cancerosas durante el curso de la tumorigénesis o como resultado de la terapia contra el cáncer. Entre los factores de estrés que inducen la apoptosis destacan los desequilibrios de señalización que resultan de niveles elevados de señalización oncogénica, y el daño del ADN asociado con la hiperproliferación. Sin embargo, diversas investigaciones han revelado cómo se atenúa la apoptosis en aquellos tumores que logran progresar a estados de malignidad de alto grado y resistencia a la terapia [5].

### **1.1.4. Inmortalidad Replicativa**

Hace tiempo se aceptó que las células cancerosas requieren un potencial replicativo ilimitado para generar tumores macroscópicos. Esta capacidad contrasta notablemente con el comportamiento de las células en la mayoría de los linajes celulares normales en el cuerpo, que solo pueden llevar a cabo un número limitado de ciclos sucesivos de crecimiento y división celular. Múltiples evidencias indican que los telómeros que protegen los extremos de los cromosomas están involucrados de manera central en la capacidad de proliferación ilimitada [6]. Las dos limitantes de la proliferación; senescencia y crisis / apoptosis, están integradas en nuestras células y se utilizan para impedir el crecimiento de clones de células preneoplásicas y neoplásicas. Por lo tanto, el acortamiento de los telómeros se considera como un dispositivo de reloj que determina el potencial de replicación limitado de las células normales y, por lo tanto, solo superado por las células cancerosas [3].

### **1.1.5. Angiogénesis**

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren sustento en forma de nutrientes y oxígeno, así como la capacidad de evacuar los desechos metabólicos y el dióxido de carbono. La neovasculatura asociada a tumores, generada por el proceso de angiogénesis cubre estas necesidades. Durante la progresión del tumor, un "interruptor angiogénico" casi siempre se activa y permanece encendido, lo que hace que en la vasculatura normalmente inactiva brote continuamente nuevos vasos que ayudan a sostener los crecimientos neoplásicos en expansión [7]. Algunos de estos reguladores angiogénicos son proteínas de señalización que se unen a receptores estimulantes o inhibidores de la superficie celular, expresados por las células endoteliales vasculares. Los prototipos bien conocidos de inductores e inhibidores de la angiogénesis son el factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) y la trombospondina-1 (TSP-1), respectivamente [3].

### **1.1.6. Metástasis**

El proceso de múltiples pasos de invasión y metástasis se ha esquematizado como una secuencia de pasos discretos, a menudo denominada cascada de invasión-metástasis[8]. Esta representación visualiza una sucesión de cambios biológicos celulares, comenzando con la invasión local, luego la intravasación de las células cancerosas en los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos , el tránsito de las células cancerosas a través de los sistemas linfático y hematógeno, seguido por el escape de las células cancerosas de la luz de tales vasos en el parénquima de tejidos distantes (extravasación), la formación de pequeños nódulos de células cancerosas (micrometástasis) y finalmente el crecimiento de lesiones micrometastásicas en tumores macroscópicos, este último paso se denomina "colonización" [3].

## **1.2. Cáncer de colon**

Los factores de riesgo para el desarrollo del CCR son antecedentes familiares de neoplasias colorrectales, el desarrollo de pólipos, las enfermedades intestinales inflamatorias (IBDs), como la colitis ulcerativa, la obesidad, el abuso del consumo de tabaco y/o alcohol y el estrés [9] Una de las principales causas de algunos tipos de

cáncer es la inflamación crónica, por ejemplo, el cáncer asociado a colitis (CAC) se desarrolla bajo condiciones inflamatorias crónicas en el tejido intestinal [10]

La patogénesis del CAC refiere la existencia de un proceso inflamatorio crónico que promueve el desarrollo de células cancerosas. Los pacientes con IBDS, como la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa tienen un mayor riesgo de desarrollar CAC.

La necesidad de nuevas estrategias terapéuticas ha llevado a la inmunología a desarrollar inmunoterapias dirigidas a la inmunidad antitumoral, por lo que los avances que definen los mecanismos y moléculas que regulan las respuestas inmunes han proporcionado nuevos objetivos para la intervención terapéutica [11].

En el año 2020, el CCR representó el 10% de la incidencia mundial de cáncer y el 9,4% de las muertes por cáncer, un poco menos que el cáncer de pulmón que representó el 18% de las muertes. Se prevé que el número mundial de nuevos casos de CCR alcance los 3,2 millones en 2040, según la proyección del envejecimiento, el crecimiento de la población y el desarrollo humano. El aumento de la incidencia de CCR se atribuye principalmente a la elevada exposición a factores de riesgo ambientales como resultado del cambio de estilo de vida y dieta hacia la occidentalización [12, 13] .

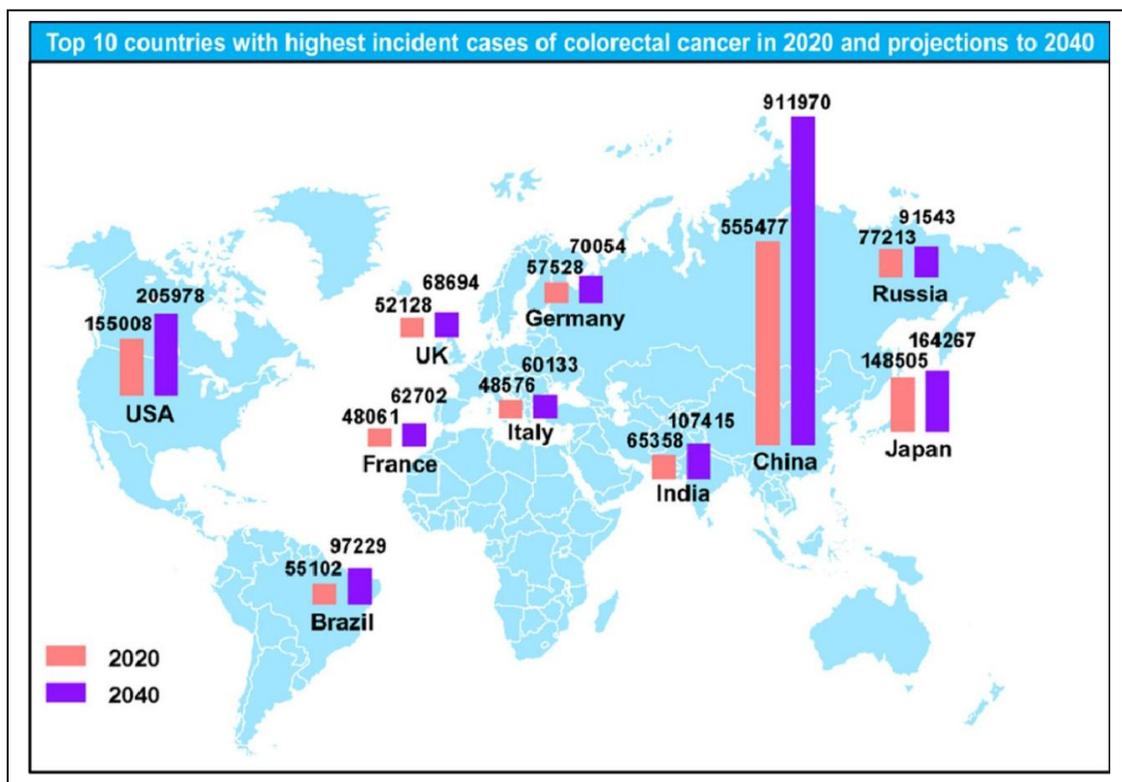
### **1.2.1. Cáncer de colon en México**

En México, el CCR es el tercer tipo de cáncer más frecuente, con 14,900 casos nuevos cada año, lo que representa el 7.8% de todas las neoplasias, siendo con 5,700 muertes la sexta causa de mortalidad, lo que representa el 7.41% de las muertes por cáncer en México [14]. La tasa de mortalidad por CCR en México ha ido aumentando con los años, de 2.6 muertes por cada 100,000 habitantes en el año 2000 a 4.8 muertes por 100,000 habitantes en el año 2015 [1]

### **1.2.2. Factores de riesgo (sexo, etnicidad, edad)**

En 2020, la tasa de incidencia mundial de CCR en hombres (23,4 casos por 100.000 personas) fue 44% más alta que en mujeres (16,2 casos por 100.000 personas). Y se observa una mayor disparidad en el cáncer de recto en comparación con el CCR. En

los hombres, se diagnostican 9,8 casos de cáncer de recto y 13,1 casos de CCR por cada 100.000 personas. Estas cifras son 75 y 31% más altas que en las mujeres, respectivamente (5,6 casos y 10,0 casos por 100.000 personas) [15]. Sin embargo, un estudio de cohorte multinacional en 10 países europeos mostró que la prevalencia de CCR ubicado en la región proximal del colon era mayor entre las mujeres [16]. Además, la ubicación preferencial del CCR se desplaza al colon proximal con la edad, especialmente en pacientes blancos y negros [17]. El riesgo de padecer cáncer aumenta considerablemente después de los 50 años.



**Gráfico 2.** Los 10 países con más incidencia de cáncer colorrectal. Xi, Y. and P. Xu, Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040.

### **1.2.3. Factores de riesgo heredables**

Los casos esporádicos de CCR, sin antecedentes familiares o alteraciones genómicas hereditarias, comprenden el 60-65% de todos los casos [12]. El inicio del CCR esporádico se atribuye en gran medida a mutaciones genéticas somáticas adquiridas o alteraciones epigenéticas inducidas por factores de riesgo modificables [18]. Sin embargo, el riesgo de padecer CCR aumenta considerablemente cuando las personas tienen antecedentes familiares de CCR o síndromes de cáncer hereditario. A excepción de los raros síndromes de cáncer hereditario, la mayoría de las mutaciones hereditarias conocidas, aunque predisponen genéticamente al CCR, son de baja penetrancia [18]. Por lo tanto, una proporción sustancial de CCR agrupados en familias no se heredan, sino que ocurren a través de aberraciones genómicas adquiridas, lo que apunta a la importancia de los factores de riesgo ambientales en la modulación del riesgo de CCR [12].

### **1.2.4. Etapas de desarrollo del CCR**

La historia del CCR puede dividirse en cuatro etapas, iniciación, promoción, progresión y metástasis.[19] La iniciación implica un daño genético irreversible (como los aductos de ADN) que predisponen a las células afectadas a una transformación neoplásica posterior. En la etapa de promoción, las células iniciadas proliferan, induciendo un crecimiento anormal (neoplasma). En la siguiente fase de progresión, al sufrir más alteraciones genéticas y epigenéticas que podrían conferir una ventaja de crecimiento selectivo a las células, las células tumorales benignas se transforman en células cancerosas malignas y adquieren características agresivas y potencial metastásico [12].

### **1.2.5. Vías de carcinogénesis del CCR**

La carcinogénesis colorrectal abarca tres aberraciones genéticas y epigenéticas globales importantes: inestabilidad cromosómica (del inglés chromosomal instability CIN), fenotipo metilador de islas CpG (del inglés CpG island methylator phenotype

CIMP) e inestabilidad de microsatelites (del inglés microsatellite instability MSI) [20] [21]. La CIN se caracteriza por anomalías en el número de copias cromosómicas y estructura, que se propone que son causadas por errores durante la mitosis, incluidos defectos en las proteínas del punto de control mitótico y el número del centrosoma [22]. La CIMP se caracteriza como una forma de modificación epigenética, se refiere a la hipermetilación en dinucleótidos CG repetitivos (las llamadas islas CpG) en las regiones promotoras de genes supresores de tumores (como MLH1 , MINT1 , MINT2 y MINT3) que silencian la expresión génica [23]. Y por último la MSI se caracteriza por alteraciones en la longitud del microsatélite (es decir, repeticiones cortas en tándem de nucleótidos en las secuencias de ADN). Es impulsada por la pérdida funcional de genes de reparación de errores de apareamiento de ADN (por ejemplo, MLH1) y se sugiere que la hipermetilación del promotor es la principal causa del silenciamiento de genes [24]. A pesar de que estos fenotipos moleculares poseen características distintas, no son excluyentes. Se ha comprobado que el estado de CIMP y MSI están correlacionados ya que la hipermetilación de la isla CpG es un mecanismo que inactiva los genes de reparación de errores de apareamiento del ADN y conduce a niveles altos de MSI. [25]

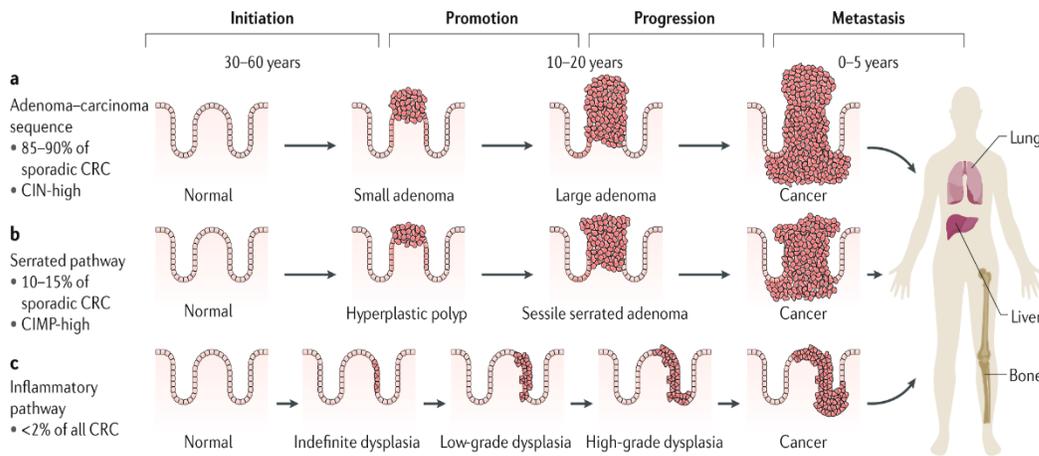
Una característica clave en la carcinogénesis es la presencia de una lesión precursora benigna, definida como un **pólipo** (es decir, crecimientos anormales en el revestimiento del intestino grueso que sobresalen hacia la luz) [26]. Los **pólipos adenomatosos** (adenomas) y los **pólipos serrados** son dos subtipos principales que sirven como precursores directos de la mayoría de los CCR. Los adenomas representan el precursor clásico del CCR, porque aproximadamente 85 a 90% de los CCR esporádicos evolucionan a partir de adenomas. Sin embargo, menos del 10% de los adenomas progresan a CCR [26]. Los pólipos serrados representan un grupo de lesiones heterogéneas (pólipo hiperplásico, adenoma serrado tradicional, adenoma serrado sésil y pólipo mixto) que combinan la apariencia morfológica dentada de los pólipos hiperplásicos y las características displásicas de los adenomas. Estos pólipos son precursores de aproximadamente el 10-15% del CCR esporádico [26].

### 1.2.6. Vías cancerígenas

El CCR surge a partir de tres vías principales: secuencia adenoma-carcinoma, vía serrada y vía inflamatoria. La secuencia adenoma-carcinoma, en la que el adenoma actúa como precursor del CCR, es la vía clásica que explica la mayoría de los CCR. En este modelo, la acumulación gradual y escalonada de alteraciones genéticas y epigenéticas impulsa la transformación de células normales en adenomas pequeños, adenomas grandes y, finalmente, en cáncer [12]. Las mutaciones inactivadoras en APC, (del inglés adenomatous polyposis coli), un gen supresor de tumores considerado como el guardián de las neoplasias colorrectales, dan como resultado la sobre activación de la vía de señalización Wnt /  $\beta$ -catenina, lo que desencadena la proliferación celular desregulada y el desarrollo de adenomas [27]. Una vía carcinogénica alterna es la vía serrada, en la cual el CCR se desarrolla a través de adenomas serrados, principalmente sésiles. Este modelo se destaca por la progresión de células normales a pólipo hiperplásico, posteriormente a adenoma serrado sésil y, finalmente, a CCR. Hay dos eventos moleculares característicos de la vía serrada. Un evento es el fenotipo metilador de la isla CpG (CIMP) y el otro la mutación del oncogén BRAF el cual se considera un evento temprano crítico que, al inducir la proliferación celular descontrolada a través de la activación constitutiva de la vía MAPK, contribuye a la formación de pólipos hiperplásicos [28].

Por último, respecto a la vía de inflamación crónica. En pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en particular colitis ulcerosa, hay un riesgo de 2,4 veces mayor de desarrollar CCR [29]. En estos pacientes, la carcinogénesis progresa desde no displasia a displasia indefinida, displasia de bajo grado, displasia de alto grado y, finalmente, a CAC. A diferencia de las lesiones precursoras displásicas discretas (adenomas tradicionales o adenomas serrados) en otras vías, la displasia que surge en el contexto de una inflamación crónica se presenta con frecuencia en la mucosa plana con multifocalidad, lo que dificulta la detección de las lesiones. Así mismo los eventos moleculares que ocurren en esta vía son diferentes. Contrariamente a la secuencia adenoma-carcinoma, en la que las mutaciones genéticas en APC y TP53 ocurren, respectivamente, al principio y al final de la carcinogénesis colorrectal, respectivamente, en la vía inflamatoria, las mutaciones en TP53 representan un

evento temprano, y las mutaciones en APC ocurren con poca frecuencia y ocurren al final de la carcinogénesis (Gráfico 3) [30].



**Gráfico 3.** Vías de carcinogénesis colorrectal. Keum, N. and E. Giovannucci, Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. (2019)

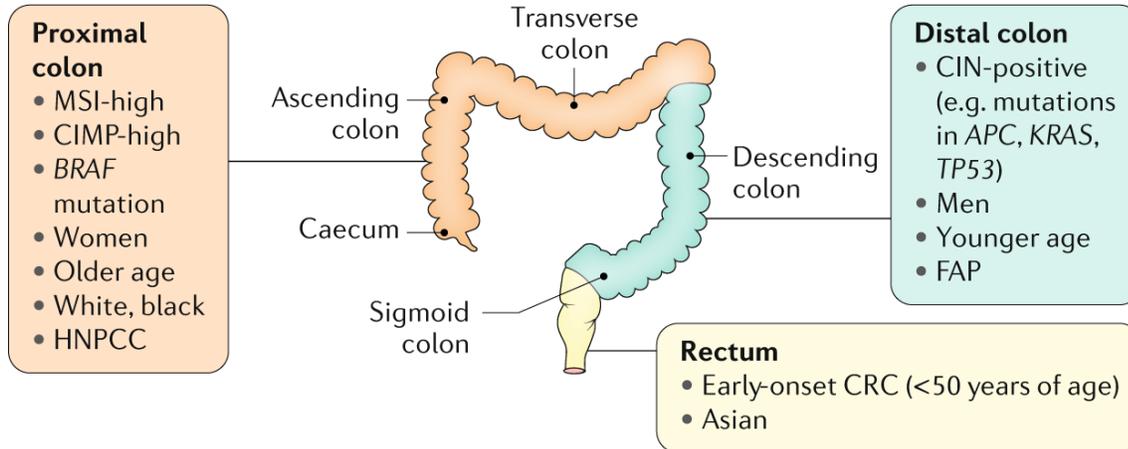
### 1.2.7.

#### Subtipos de cáncer colorrectal

El CCR se desarrolla en un órgano, el intestino grueso, debido a que es una enfermedad heterogénea que consta de subtipos con etiología y resultados clínicos variables. Los subtipos del CCR han definido por el sitio anatómico del tumor en tres segmentos del colon: colon proximal (ciego, colon ascendente, ángulo hepático y colon transverso), colon distal (ángulo esplénico, colon descendente y colon sigmoide) y recto (Gráfico 4) [31]. La heterogeneidad etiológica del CCR en las ubicaciones del tumor podría, en parte, relacionarse con variaciones en las características microbianas y del huésped del intestino grueso. A lo largo del eje colorrectal desde el colon proximal hasta el recto, hay un aumento progresivo del pH, la carga microbiana y la abundancia de ácidos grasos de cadena corta (es decir, metabolitos microbianos), lo que podría tener implicaciones divergentes para la carcinogénesis colorrectal. [32]

En particular, los subtipos moleculares de CCR también se distribuyen de manera desproporcionada a través del colon y recto. Por marcadores moleculares tumorales, el cáncer de colon proximal se enriquece con subtipos caracterizados por inestabilidad de microsatélites (MSI) -alto, fenotipo metilador de isla CpG (CIMP) -alto o BRAF

mutación y cáncer de colon distal por el subtipo positivo de inestabilidad cromosómica (CIN) [33].

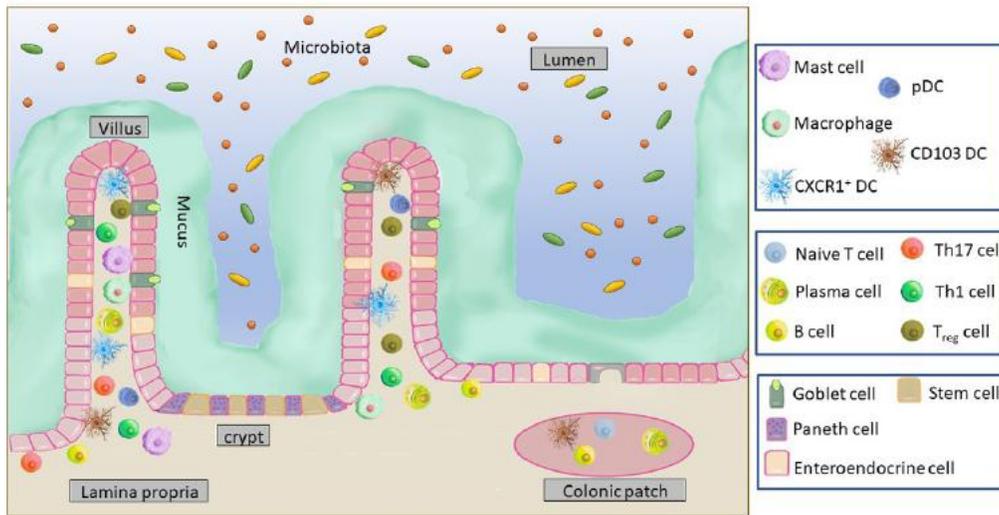


**Gráfico 4.** Subtipos anatómicos de cáncer colorrectal y su relación con características moleculares tumorales y otros factores. Keum, N. and E. Giovannucci, Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. (2019)

### 1.2.8. Inflamación en el colon

Cómo se ha descrito previamente para el desarrollo del CCR existen diferentes vías, y una de ellas está relacionada a enfermedades inflamatorias. Es importante mencionar que la inflamación es un proceso fuerte que requiere algunos pasos que incluyen cambios vasculares, reclutamiento de células inmunes y liberación de citocinas. Después de que la inflamación cumple su función básica de despejar daños infecciosos y no infecciosos, se realiza el proceso antiinflamatorio que reduce el impacto y daño causado por una fuerte respuesta inflamatoria, induciendo mecanismos tanto de vigilancia como de reparación de tejidos[34]. Sin embargo, una respuesta antiinflamatoria exacerbada o descontrolada se ha asociado con la inmunosupresión que reduce la capacidad del sistema inmunológico para combatir el cáncer; algunos tumores como el cáncer de colon, aprovechan esta supresión para desarrollarse y crecer [1].

El colon está compuesto de varias capas; la submucosa, la mucosa muscular, la lámina propia y la mucosa. La lámina propia es la región que alberga tanto las células inmunitarias innatas, como los macrófagos (MØs), los eosinófilos, las células dendríticas (DC); así como las células inmunitarias adaptativas, como los linfocitos T CD4 + y CD8 + (Gráfico 5) [35]. Además la mucosa es la región que da forma a la luz intestinal favoreciendo la interacción constante con la microbiota del colon que está compuesta por billones de especies diferentes de bacterias [36].



**Gráfico 5.** Esquema general de las células del colon y del sistema inmunológico. El colon está compuesto por una capa de mucinas, una capa de epitelio cilíndrico y una región conocida como lámina propia. A su vez, el epitelio cilíndrico simple forma varias glándulas tubulares conocidas como criptas de Lieberkühn. Asimismo, en la lámina linfoide se pueden encontrar células inmunitarias, como células B y linfocitos T. Estos tejidos se llaman parches colonicos, por otro lado otros tipos de células inmunitarias como macrófagos, células dendríticas (DC), mastocitos y los linfocitos se pueden encontrar fuera de los parches colonicos [1]. Montor, J.M. and M. Segovia, Immunotherapy in Resistant Cancer: From the Lab Bench Work to Its Clinical Perspectives. (2020)

### **1.2.9. Participación de los TLRs**

Cuando la mucosa colónica sufre algún daño físico, químico o biológico, como en el caso de CCR, la microbiota puede interactuar con los receptores inmunitarios innatos, como los receptores tipo Toll (TLRs), que se encuentran en la superficie de las células inmunitarias en la lámina propia, como los macrófagos y CD [1]. Además, los TLRs reconocen la invasión de patógenos en el colon y la mucosa dañada. El reconocimiento del patógeno o de la microbiota por los TLRs induce una activación rápida de células de la respuesta inmune innata hacia un perfil inflamatorio [1]. Cabe destacar que las CDs, al igual que los (MØs) y las células B, están equipadas con un conjunto de receptores que reconocen, capturan e internalizan antígenos extraños para facilitar un procesamiento y presentación eficientes a través de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) I y II [37].

Mientras que las células B están especializadas para reconocer una amplia variedad de epítomos debido a la presencia de receptores de tipo inmunoglobulina de superficie somáticamente variables, las CD y MØ dependen de un conjunto de receptores de membrana codificados en la línea germinal para la discriminación y el reconocimiento de determinantes antigénicos [37]. Sin bien las CDs y los (MØs) cuentan con TLRs estos no pueden internalizar antígenos, por lo que esta función de internalización la cubren en gran medida por los receptores de lectina tipo C (del inglés C-type lectin receptors CLR). De hecho, la importancia de los CLR se destaca por el hecho de que estos receptores pueden desencadenar numerosas respuestas celulares e inmunológicas críticas para el control y la regulación de infecciones, homeostasis, autoinmunidad, alergias y cáncer [38].

### 1.3. MGL en la respuesta inmune

Las lectinas tipo C son una súper familia de proteínas caracterizadas por tener uno o más dominios tipo C. En los mamíferos, las lectinas de tipo C se encuentran como moléculas secretadas o como proteínas transmembranales y se les ha implicado en una amplia gama de funciones fisiológicas debido a su capacidad para reconocer ligandos propios (endógenos) y no propios (exógenos). De hecho, muchas lectinas tipo C pueden reconocer ambas clases de ligandos y están implicadas en numerosas funciones fisiológicas. Las lectinas solubles de tipo C pueden funcionar, por ejemplo, como factores de crecimiento, opsoninas, proteínas antimicrobianas y componentes de la matriz extracelular, y regulan muchos procesos esenciales como el desarrollo, la respiración, la coagulación, la angiogénesis y la inflamación. Mientras que las lectinas tipo C transmembranales (conocidas como receptores de lectina tipo C, del inglés C-type lectin receptors CLR) puede usar varias vías de señalización intracelular para modular directamente las respuestas celulares, de desarrollo, homeostáticas e inmunológicas [39]

Dentro de las moléculas más importantes de la familia CLR incluyen la lectina tipo C de galactosa de macrófagos (**MGL**), molécula de adhesión intercelular específica de células dendríticas-3-no integrina (**DC-SIGN**), receptor de manosa (**MR**), **DEC205**, **Dectin-1**, y **Langerin**. Estos receptores son capaces de desencadenar distintas vías de señalización que modulan las funciones de las células presentadoras de antígeno a través de la expresión de moléculas específicas y citocinas, lo que determina la polarización de las células T [40].

MGL es un CLR expresado en DCs de la piel y ganglios linfáticos e in vitro por macrófagos y CD8 dermátidas derivadas de monocitos [41]. Dentro de la familia CLR, MGL es el único receptor dentro del sistema inmunitario humano que reconoce exclusivamente los residuos terminales  $\alpha$  o  $\beta$  N-acetilgalactosamina (GalNAc). Así mismo también reconoce el epitopo Tn (GalNAc $\alpha$ -Ser/Thr) el cual es un antígeno expresados por células de adenocarcinoma y MUC1 glicosilado de forma anómala.[42]

Cabe destacar que en ratones, existen dos homologos de MGL humana, MGL1 y MGL2. Y se sabe que MGL1 es altamente específico para estructuras Lewis X y Lewis A, mientras que MGL2, similar a la MGL humana, reconoce N –GalNAc, galactosa y antígeno Tn [42]

Desde un punto de vista funcional, varias líneas de evidencia sugieren que la unión de MGL a sus ligandos amortigua la respuesta inmune adaptativa [43] En primer lugar, la unión de Tn a MGL expresada en DC, junto con la activación del receptor tipo Toll (TLR), da como resultado un fenotipo tolerogénico, con una mayor secreción de IL-10 y TNF- $\alpha$  [44] Además, la unión de MGL a CD45, un conocido ligando portador de Tn expresado en las células T efectoras , combinado con la activación del receptor de células T , suprime la activación de las células T, lo que da como resultado una reducción en la producción y proliferación de citoquinas proinflamatorias [43]

### **1.3.1. MGL en cáncer**

En el cáncer existen moléculas que pueden estar relacionadas con su inicio y promoción tumoral como lo son CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico) y PDL1 (ligando de muerte programada 1) que favorecen el desarrollo de células cancerosas a partir de procesos de inmunosupresión [45] Además, existen un gran número de moléculas involucradas en el reconocimiento de antígenos tumorales, entre las que podemos destacar a las lectinas tipo C. Recientemente se ha reconocido que los CLRs también son capaces de desencadenar numerosas respuestas celulares e inmunológicas, respuestas críticas para el control y regulación de infecciones, homeostasis, autoinmunidad, alergias y cáncer [37]

Las evidencias más cercanas que soportan la aseveración están relacionadas a los CLRs CD209, CD23, y, MGL. En estos tres casos se ha sugerido que juegan un papel importante en la homeostasis celular que va más allá de la detección y eliminación de células muertas o moribundas. Por ejemplo, se ha demostrado que MGL se une con alta afinidad a las glicoproteínas que expresan residuos terminales de N-

acetilgalactosamina (GalNAc) o galactosa (Gal), esta característica le permite reconocer patrones de glucosilación anormales de las células malignas, que permite la interacción de las células cancerosas con plaquetas, leucocitos y células endoteliales, facilitando la invasión tumoral, la metástasis y la respuesta inmunosupresora [43, 46]

Varias de las glicofomas de autoantígenos relacionadas con tumores son, de hecho, ligandos específicos para MGL. Esta es capaz de reconocer la mucina MUC1, una O Proteína transmembranal glicosilada ligada a  $\beta$ 2 normalmente expresada en la superficie apical de las células epiteliales, pero expresada de manera aberrante en un amplio espectro de carcinomas [37]. Tras la transformación maligna, MUC1 pierde polaridad y se sobreexpresa y se glucosila de forma aberrante, revelando una región inmunogénica de repeticiones en tándem de 20 residuos. Debido a que MGL reconoce los epítomos que contienen GalNAc que se expresan con frecuencia en la superficie de las células cancerosas y está implicado en la regulación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, se eligió como sonda para la determinación de perfiles glicosilados en el cáncer de mama [47]. Así mismo se ha demostrado que la unión de MGL es una herramienta poderosa para discriminar el tejido sano del cáncer colorrectal (CCR) [48]. Además, la alta expresión de los ligandos de MGL en los tejidos de pacientes con CCR en estadio III se ha asociado con una menor supervivencia libre de enfermedad estableciendo así la unión de MGL como un marcador pronóstico independiente [48]. La expresión de ligandos de MGL tiene una correlación positiva con la mutación oncogénica BRAF V600E en CRC [49]. Más recientemente, los altos niveles de expresión de los ligandos de MGL se correlacionaron con un peor pronóstico no solo en el CCR, sino también en el carcinoma de células escamosas de cuello uterino y el carcinoma adenoescamoso [50].

## **2. Justificación**

En la actualidad no se ha descrito la participación de MGL1 en los procesos inmunológicos durante el desarrollo del CAC, por lo que establecer la participación de MGL1 en esta patología nos permitirá conocer los mecanismos asociados al desarrollo de CAC, lo cual permitirá proponer nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a moléculas blanco que sean capaces de contener o mitigar el desarrollo del CAC.

## **3. Objetivo general**

Establecer la participación del receptor MGL1 en el desarrollo de CAC en un modelo murino.

## **4. Objetivos particulares**

- 1.-Monitorear el desarrollo de la patología y la mortalidad en ratones WT (del inglés Wild-type, *Mgl*+/+) y genéticamente deficientes para MGL1 (del inglés knockout KO *Mgl* -/-) con fondo genético C57BL/6 durante los 68 días del desarrollo del modelo de CAC
- 2.-Caracterizar la malignidad de los tumores del CCR mediante el análisis histológico en ratones WT y (*Mgl* -/-) C57BL/6.
- 3.- Analizar las poblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en ratones WT y (*Mgl* -/-) mediante citometría de flujo.
- 4.- Analizar la población de células mieloides supresoras en circulación de ratones WT y (*Mgl* -/-) mediante citometría de flujo.
- 5.- Evaluar cambios en la expresión de las proteínas ERK y AKT de ratones WT y (*Mgl* -/-) mediante Western Blot.

## **5. Metodología**

### **5.1 Ratones**

Se utilizaron ratones machos de 22 a 25g de peso WT y (*Mgl* <sup>-/-</sup>) con fondo genético C57BL/6. Los ratones WT con fondo genético C57BL/6 se adquirieron de Harlan (México), mientras que los ratones *Mgl*1<sup>-/-</sup> fueron donados por Glycomics Consortium, USA. Todos los animales se trataron de acuerdo con la norma mexicana NOM-062-ZOO-1999, 2001.

### **5.2 Confirmación de los ratones WT y *Mgl*<sup>-/-</sup> por PCR**

Se obtuvo DNA del ápice de la cola (<0.5 cm) de los ratones y se empleó la técnica convencional de lisis por proteinasa K (Invitrogen) y se amplificó el gen murino para *mgl* y de resistencia a la neomicina por PCR. Los cebadores usados fueron M*mgl*-F, (5'-CTTGGTCCCAGATCCGTATC), M*mgl*-R (5'-ATGTCATGACTCAGGATC), Neo-F (5'-AGGATCTCCTGTCATCTCTCACCTTGCTCCTG) y Neo-R (5'-AAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCG) (Todos sintetizados por Sigma-Aldrich, México). Se usó la DNA polimerasa (Amplicasa, marca BioTecMol) 0.5 ul, y DNTP's (Invitrogen, 0.2 mM) se utilizó la temperatura de desnaturalización 94 °C, de alineación 55° C para NEO y MGL respectivamente, y elongación 72°C por 35 ciclos.

### **5.3 Establecimiento del Modelo AOM/ DSS**

Para desarrollar el modelo de CAC los ratones WT y (*Mgl* <sup>-/-</sup>) recibieron 10 mg/kg de azoximetano (AOM) (Sigma-Aldrich, México) al día 1 vía intraperitoneal, y se mantuvieron con dieta regular y agua por 5 días. Después recibieron el primer ciclo de DSS al 2% (MP Biomedicals, México) y los ciclos restantes con DSS al 1% disuelto en el agua para beber. En total fueron 3 ciclos de 7 días, con 15 días de descanso en los cual los ratones se mantuvieron con agua libre de DSS y alimento regular. La patología clínica y la sobrevivencia fueron evaluadas durante todo el tratamiento. Los ratones fueron sacrificados en el día 75 (al final de tratamiento), el colon fue removido y procesado para análisis histológico.

#### **5.4 Análisis Histológico**

Después del sacrificio de los animales, se extrajo el colón y se abrió longitudinalmente, se lavó con PBS frío. Los tumores macroscópicos se contaron bajo un microscopio de disección y se midieron con una vernier digital. Los tumores se fijaron en paraformaldehído amortiguado al 4% y se transfirieron a etanol al 70% para después embeberse en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 5 micras de grosor para posteriormente ser teñidos con hematoxilina/eosina y azul alcian.

#### **5.5 Determinación de la expresión de MGL1 y MGL2 en macrófagos WT y *Mgl* <sup>-/-</sup> y en células dendríticas.**

Se obtuvieron células totales de la cavidad peritoneal (del inglés peritoneal exudates cells PECs) de ratones sanos WT y (*Mgl* <sup>-/-</sup>) por el método de exudado peritoneal, la purificación de MØ se realizó por el método de adherencia en placa. Los MØ obtenidos fueron ajustados a 10<sup>6</sup> células/ml en medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (FCS) 1% de penicilina-streptomicina (in vitro) y sembrados en placas de 12 pozos. Los MØ se estimularon con LPS por 24h. Posteriormente, los MØ fueron colectados y marcados para analizarse por citometría de flujo. Para esto, se incubaron con el anticuerpo FcyR anti-ratón (CD16/CD32), para evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos de interés. Después, para poder identificar la población de MØ se utilizó el anticuerpo monoclonal específico para ratón F4/80 conjugado con FITC, para MGL1 conjugado con PE y para MGL2 se utilizó un anticuerpo con especificidad tanto para MGL1 como para MGL2, se realizó esto debido a que no existe anticuerpo específico para MGL2. Para las CDs se siguió el mismo protocolo con la diferencia de que no fueron estimuladas y se usó el anticuerpo CD11c (Todos los anticuerpos son de Biolegen). Se determinó su expresión en un citómetro AttuneNxt.

#### **5.6 Determinación de poblaciones celulares mediante citometría de flujo**

Para analizar las poblaciones de linfocitos y mieloides supresoras se colectaron las células del bazo (linfocitos) y de circulación sanguínea (supresoras) en tubos

ependorf de 1.5 ml y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C. El botón se resuspendió en 100 ul de buffer para FACS con anticuerpo anti-ratón CD16/32 para bloquear el pegado inespecífico de otros anticuerpos, esto se incubo durante 15 min a 4°C. Posteriormente se centrifugó 10 minutos a 1500rpm a 4°C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 ul de PBS con el marcador de viabilidad Zombie Aqua por 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad para descartar las células muertas. Después se volvió a centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos y se resuspendió el botón en 100 ul de la mezcla de anticuerpos, para lo cual se usaron los siguientes anticuerpos.

Todas las células fueron teñidas bajo la recomendación del fabricante para cada anticuerpo y se fijaron en paraformaldehído amortiguado con SFB. La adquisición de las muestras se realizó en un citómetro de flujo Attune Nxt (Invitrogen). Los datos fueron analizados en el programa Flow Jo X (Becton Dickison).

### **5.7 Niveles de proteínas de las vías ERK1/2 y AKT**

Para este análisis usamos secciones del colón (proximal, medio y distal) de ratones WT y de (*Mgl -/-*) estas secciones se colocaron en tubos falcon de 15 ml con PBS para posteriormente ser macerados y así obtener la proteína. Dicha proteína se extrajo utilizando un tampón Laemmli con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las muestras se centrifugaron a 700 g durante 5 minutos a 4° C y la concentración de proteínas se determinó mediante ensayo de Bradford de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma-Aldrich). Las muestras de las proteínas (15ug) se separaron por electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% a 80 V y se transfirieron a membranas de PVDF (inmobilon) (0,22 uM) mediante electrotransferencia. Las membranas se bloquearon durante 2h a temperatura ambiente en solución salina con Twis-Tween 20 (TBST) suplementada con 5 % de albumina de suero bovino. Después se lavó dicha membrana tres veces con TBST y se incubo a 4°C durante toda la noche en placa agitadora con los siguiente anticuerpos primarios: B-actina, p-ERK1/2 y p-AKT. Después se lavó la membrana 4 veces con TBST, se añadió un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina en TBST

y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Por último, la membrana se lavó nuevamente con TBST 4 veces y se prosiguió a revelar la señal utilizando un Super Signal West Femto (Termo Fisher Scientific) y luego se escaneó y analizó con un escáner infrarojo fluorescente Odyssey.

### **5.8 Análisis estadístico**

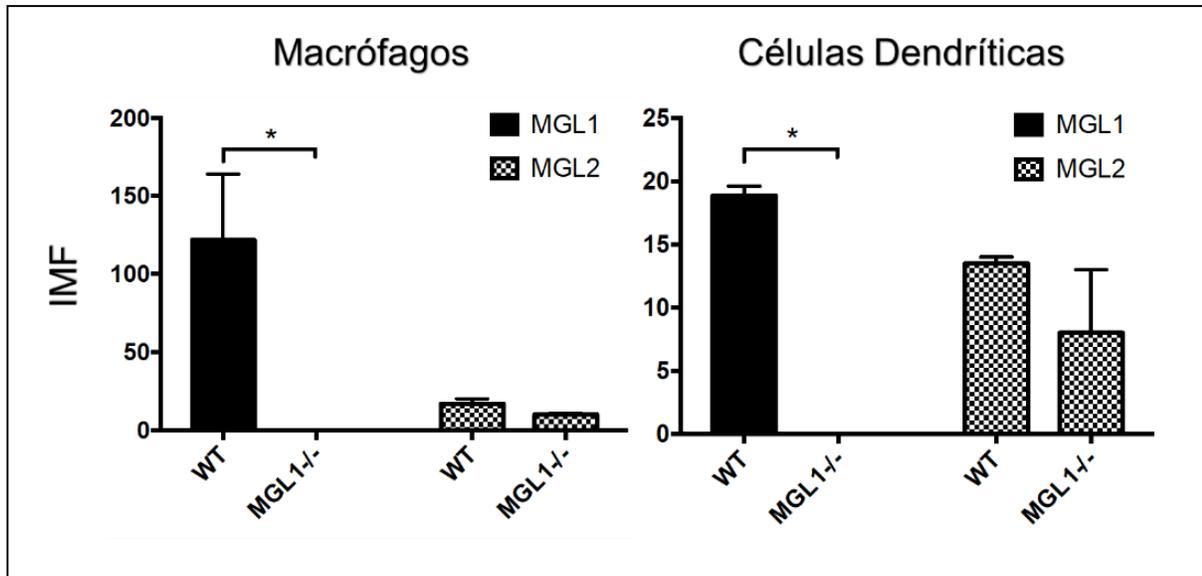
Las comparaciones pareadas se llevaron a cabo mediante la prueba *t* de student y entre diferentes grupos por ANOVA de dos vías, según fue el caso. Se utilizó un coeficiente de confiabilidad del 95% (programa Graph Pad Prism 6)

## 6. Resultados

### 6.1 La deficiencia en *Mgl* evita la pérdida de peso corporal inducida durante el tratamiento con AOM/DSS

Para verificar la expresión de los receptores MGL1 y MGL2 en MØ y CDs de ratones Wt, y (*Mgl* *-/-*) se realizó citometría de flujo. Las células adherentes de la cavidad peritoneal que expresaron el grupo de diferenciación (F4/80+) son (MØ), mientras que las células que expresaron el grupo de diferenciación (CD11c) corresponden a las CDs. Esto se realizó debido a que MGL1 y MGL2 se encuentra principalmente en células presentadoras de antígeno, y también poder determinar si se expresan en ratones Wt y ratones (*Mgl* *-/-*).

Los resultados obtenidos demuestran que tanto (MØ) como CDs de ratones Wt expresan el receptor MGL1, mientras que (MØ) y CDs de ratones (*Mgl* *-/-*) no tuvo expresión. Sin embargo, el receptor MGL2 si tuvo expresión tanto en (MØ) como en las CDs de ratones Wt y (*Mgl* *-/-*) (Fig. 1) lo que demuestra que el receptor MGL2 si se expresa.

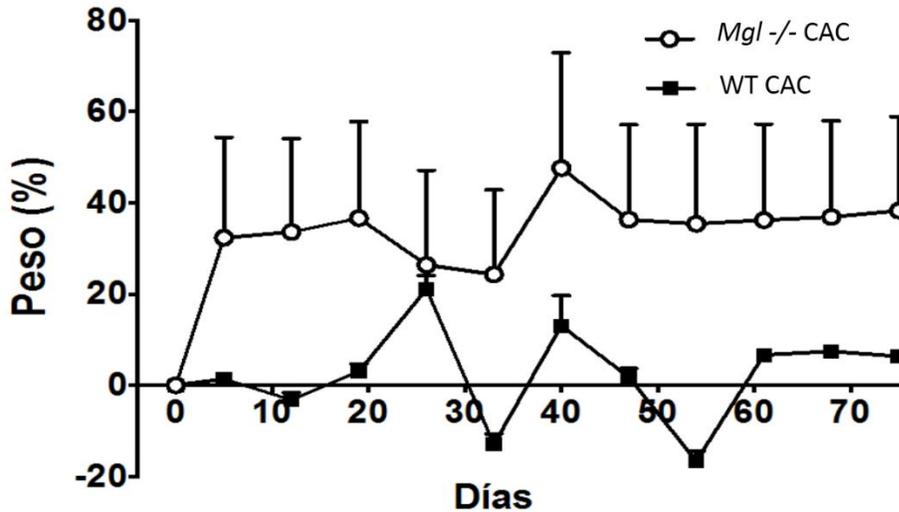


**Figura 1.** Expresión de MGL1 y MGL2 en (MØ) estimulados con LPS por 24h y CDs de ratones Wt y (*Mgl* -/-) Gráfico de barras de intensidad media de fluorescencia de (MØ). n=6 ratones por grupo. \*=p<0.05.

## 6.2 En deficiencia de *Mgl* hay un menor número de tumores y de menor tamaño en comparación a los animales WT

Para determinar si el receptor MGL1 participa en el desarrollo de CAC, sometimos a ratones WT y (*Mgl* -/-) a un modelo de CAC inducido químicamente con AOM/DSS. El primer ciclo de DSS fue de 2% y los siguientes de 1% debido a que los ratones presentaron gran sangrado desde el primer ciclo y posiblemente culminaría en una muerte temprana de los grupos inducidos con AOM/DSS. La administración conjunta de estos compuestos indujo tumorigenesis en el colon asociado a colitis crónica. Debido a que la pérdida de peso es uno de los síntomas clínicos del CCR, se monitoreo la pérdida de peso en ambos grupos y se observó que los ratones Wt no obtenían ganancia de peso y no mantenían un peso estable, y esto se mantuvo desde el primer

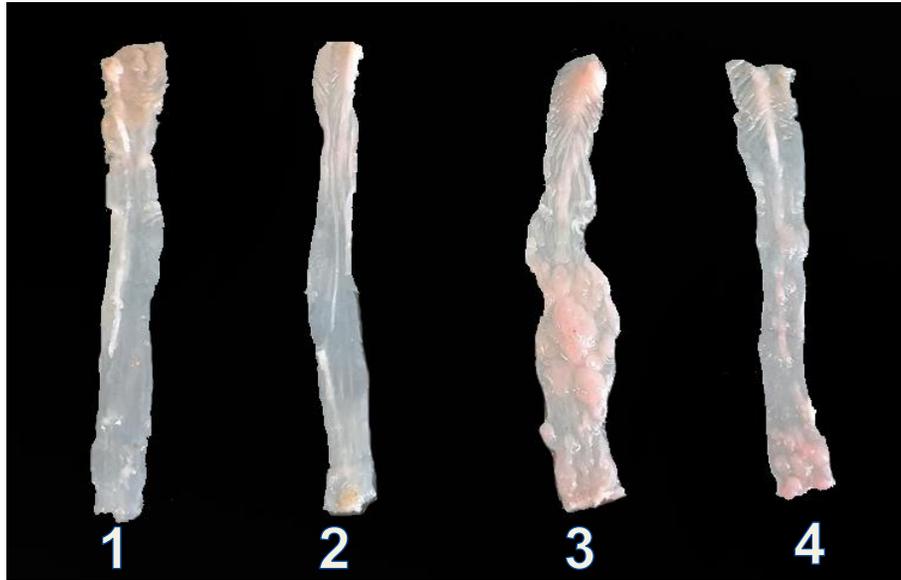
ciclo con DSS y hasta el último ciclo. Mientras que los ratones (*Mgl -/-*) no registraron pérdida de peso, por el contrario ganaron peso como se espera con el crecimiento. (Fig. 2)



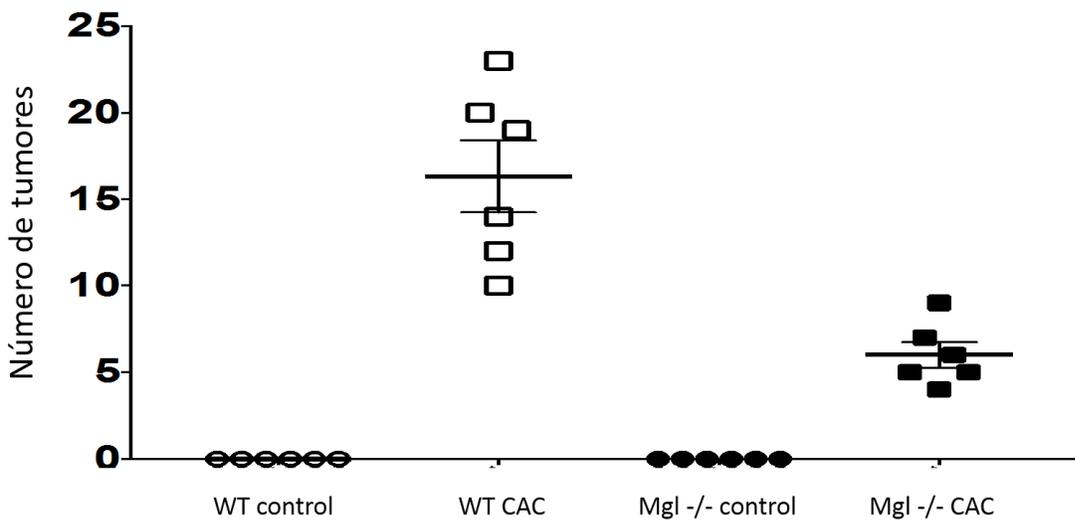
**Figura 2.** Seguimiento de peso corporal (expresado en porcentaje) de los ratones WT y MGL<sup>-/-</sup> durante la inducción del modelo de CCR con AOM y DSS. N=6

### 6.3 Los ratones (*Mgl -/-*) desarrollan menos tumores de menor tamaño

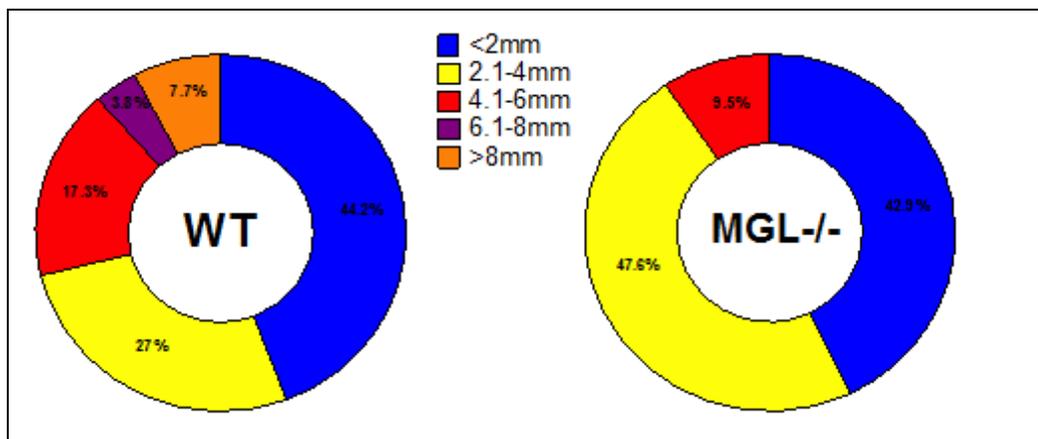
Al final del modelo AOM/DSS en el día 75, se sacrificaron todos los ratones, y se obtuvo el colon, el cual se abrió longitudinalmente y se midió con ayuda de una vernier. Se contó el número de tumores, así como la carga tumoral. No se encontraron diferencias significativas en la longitud del colon de los grupos experimentales. Sin embargo, sí hubo diferencias en el número y tamaño de los tumores (**Fig. 3**)



**Figura 3.** . Fotografías representativas de colon en la Inducción de CAC en un modelo murino. 1) WT control, 2) Mgl<sup>-/-</sup> control 3) WT CAC y 4) Mgl<sup>-/-</sup> CAC. Como se puede observar existe un menor desarrollo de tumores en los ratones Mgl<sup>-/-</sup> CAC en comparación con el grupo WT CAC.



**Figura 4.** Número de tumores en cada grupo experimental. Se encontró que el grupo de ratones (*Mgl -/-*) CCR tuvieron un menor número de tumores en comparación con los ratones WT CCR. N=6



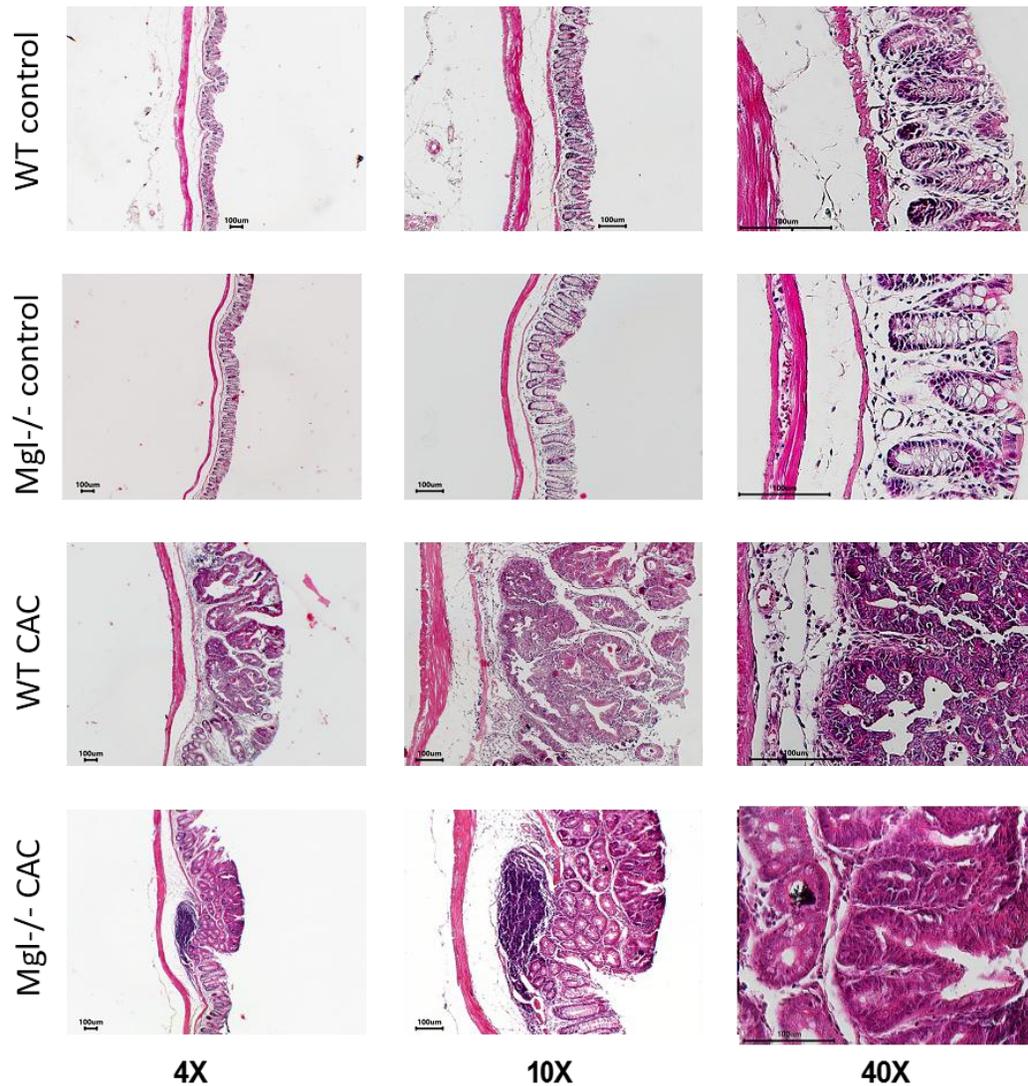
**Figura 5.** Tamaño de tumores entre grupos experimentales. Se observó que los ratones WT CAC presentaban una mayor cantidad de tumores, así como un mayor tamaño, superando los 8mm. = $p < 0.05$ .

#### 6.4 Los ratones WT CAC tienen más daño histológico en comparación con los ratones *Mgl-/-* CAC.

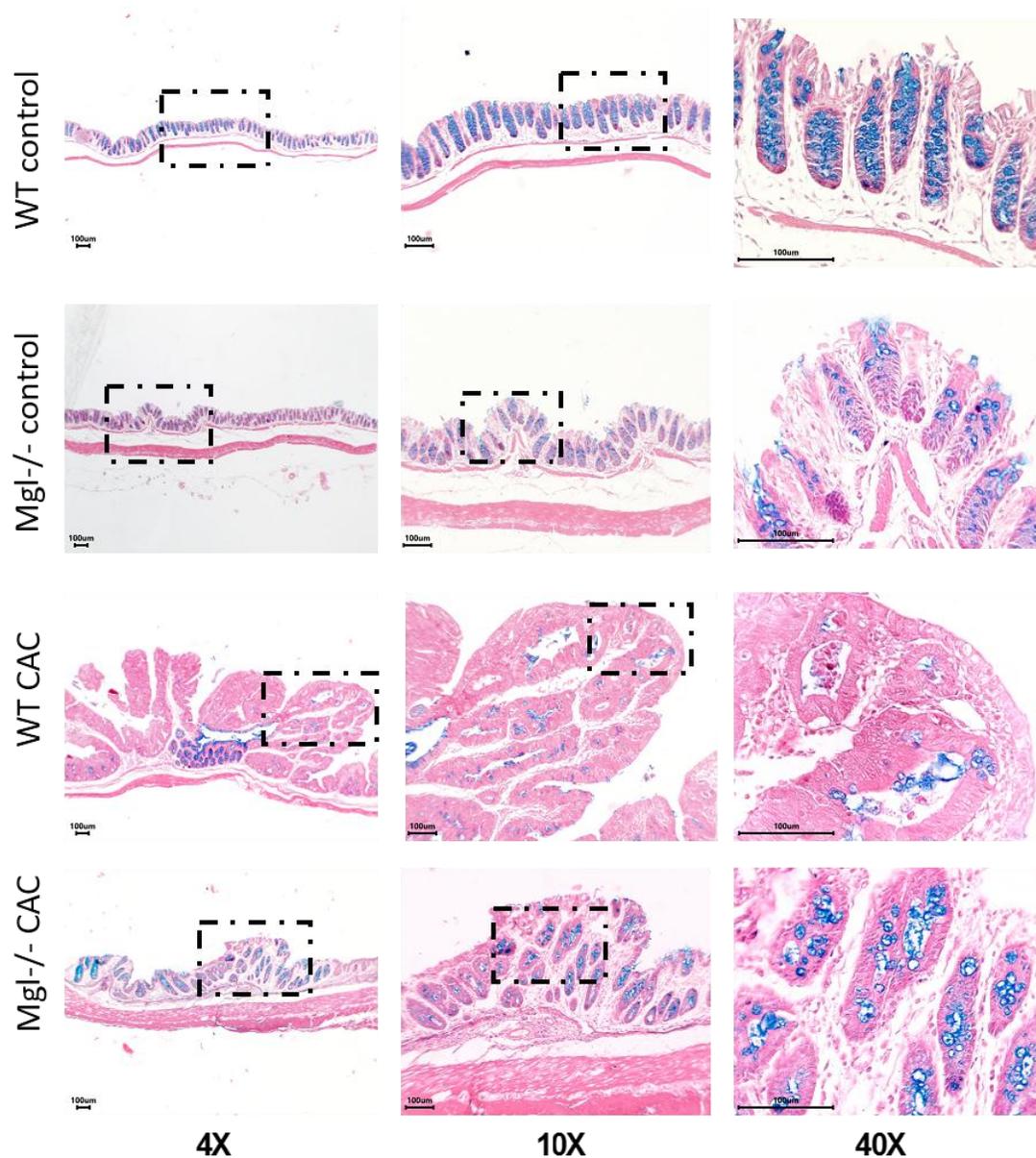
Para determinar si la ausencia de MGL1 contribuía a la progresión tumoral, se realizó un análisis histológico. Debido a que la morfología del tumor se relaciona con la malignidad. Para esto se realizaron cortes histológicos y posteriormente una tinción

con hematoxilina y eosina, así como de azul alcian para determinar la presencia de mucina.

Se observó que los ratones WT CAC desarrollaron una mayor inflamación caracterizada por un aumento en la infiltración de células inmunes. Así mismo, se observó pérdida en la arquitectura de las criptas y pérdida de células caliciformes.



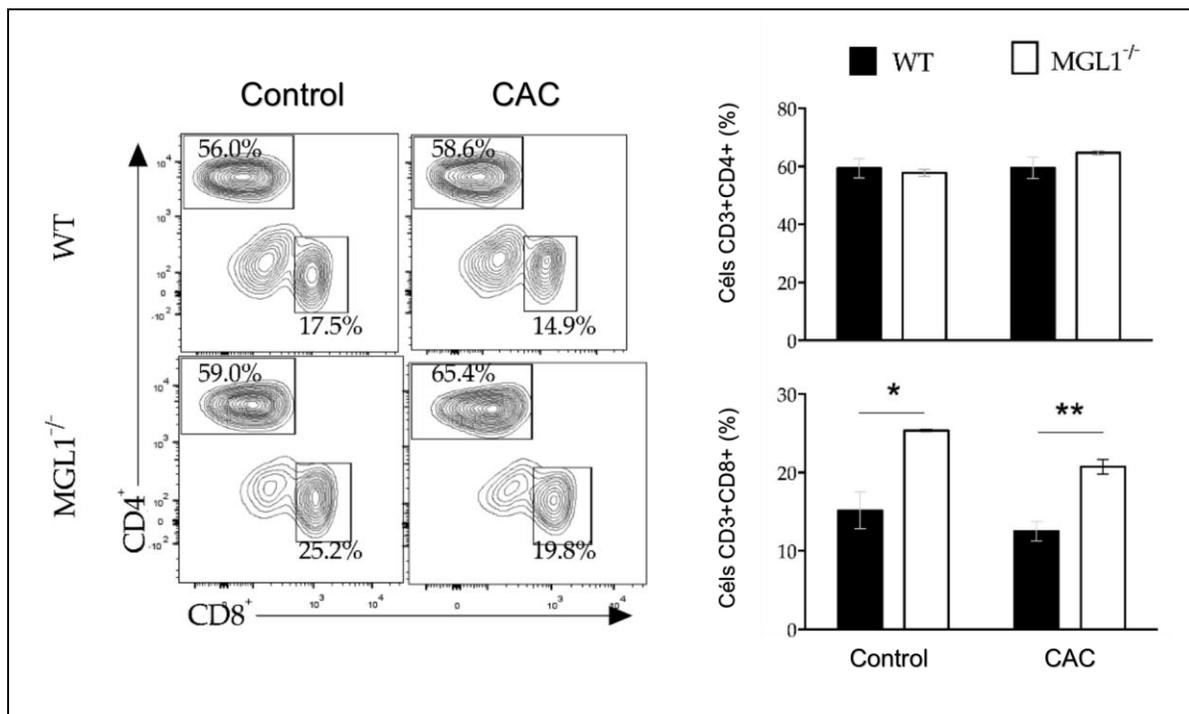
**Figura 6.** Fotografías representativas del desarrollo tumoral en los diferentes grupos experimentales. Se observa que los ratones (*Mgl* -/-) tienen una menor pérdida de la arquitectura intestinal y de desarrollo tumoral en comparación del grupo Wt CAC.



**Figura 7.** Fotografías representativas del desarrollo tumoral en los diferentes grupos experimentales. Se pueden apreciar en color azul las regiones en donde se localizan las células caliciformes encargadas de producir moco. Como se puede observar en los ratones (*Mgl* *-/-*) con CAC tiene un mayor número de células caliciformes en comparación con el grupo WT con CAC.

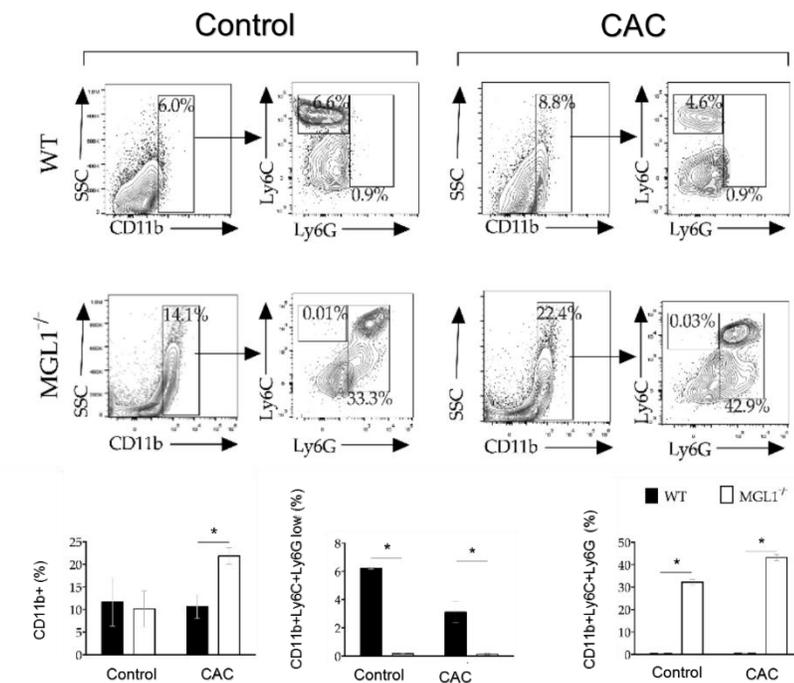
## 6.5 Citometría de Flujo

Se analizaron las poblaciones de linfocitos T presentes en bazo mediante tinción para citometría de flujo de acuerdo con un protocolo estándar, y utilizando anticuerpos específicos contra células T CD3+, T CD4+ y T CD8+. No se encontraron diferencias significativas en los linfocitos TCD4+, pero se encontró que en los ratones (*Mgl*<sup>-/-</sup>) mantuvieron un mayor porcentaje de linfocitos T CD8+.



**Figura 8.** Análisis de linfocitos T provenientes de bazo mediante citometría de flujo. Gráficas de CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> representadas en porcentajes. n=6 \*p<0.05

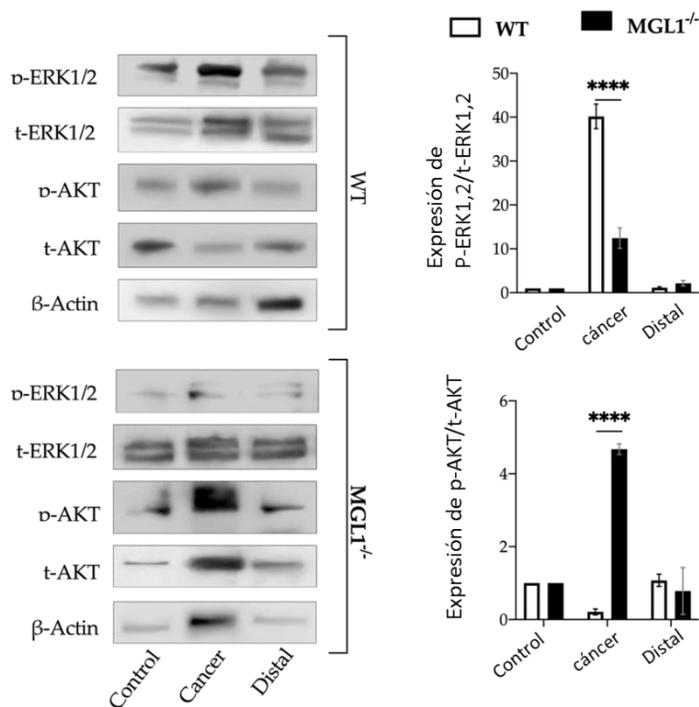
Debido a que las poblaciones de células CD11b + Ly6C ++ y Ly6G + están involucradas en procesos proinflamatorios y expresión de enzimas capaces de inmunosuprimir la actividad células T y la respuesta adaptativa hacia el tumor, se realizó un análisis mediante citometría de flujo para conocer el origen de dichas poblaciones para determinar el porcentaje de células presentes en los diferentes grupos experimentales. Se puede observar un mayor porcentaje de células CD11b en el grupo de (*Mgl* *-/-*) con CAC. Así mismo un mayor porcentaje de células de origen monocítico en los grupos control y CAC de los ratones WT. Y contrariamente a esto los ratones (*Mgl* *-/-*) presentaron un mayor porcentaje de células de origen granulocítico en los grupos control y CAC.



**Figura 9.** Análisis de células mieloides supresoras provenientes de circulación mediante citometría de flujo. Se encontró que los ratones WT presentaron un mayor número de células mieloides supresoras de origen monocítico.

## Análisis de los factores de transcripción ERK 1/2 y AKT mediante Western Blot

Con la finalidad de determinar el nivel de activación de las vías ERK 1/2 y AKT en diferentes zonas del colon (distal y medio) se realizó un western blot. En los ratones Wt CAC y fue posible observar una mayor fosforilación de ERK la parte media del colon en comparación de los ratones (*Mgl*<sup>-/-</sup>). Y respecto a la expresión de AKT de igual forma se mantiene mayor fosforilación en la parte media; sin embargo, es el grupo (*Mgl*<sup>-/-</sup>) el cual mantiene mayor expresión de esta vía.



**Figura 15.** Western blot de ERK1/2 y ARK en ratones WT y (*Mgl*<sup>-/-</sup>) (P-, fosforilados; t-, totales). Se usó B-actina como control de carga.

## 7. Discusión

El presente proyecto planteó analizar la participación del receptor (MGL1) en el desarrollo de CAC. Para ello se utilizó el modelo de AOM/DSS debido a que es un modelo de iniciación-promoción potente, reproducible y que utiliza la inducción química del daño en el ADN seguido de ciclos repetidos de colitis [51]. Además, de que la histopatología de los tumores inducidos por AOM/DSS recapitula facetas clave del CAC humano, como los tumores de ubicación distal y los adenocarcinomas invasivos [52]. Debido a esto se eligió este modelo que nos permitió analizar el desarrollo tumoral en la ausencia y presencia del receptor Mgl1 murino.

Los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de los tumores que se desarrollaron en el grupo WT estuvieron limitados al área del colon medio y proximal mientras que el grupo (*Mgl* *-/-*) la mayoría de los tumores aparecen en el la parte distal del colon. Esto podría deberse a que dentro de los marcadores moleculares tumorales en el cáncer de colon proximal existe un subtipo el cual se caracteriza por poseer mutaciones en el gen BRAF. [12] Hay evidencia de que la activación inducible de la mutación BRAF V600E in vivo resultó directamente en una mayor expresión de ligandos de MGL1, entonces la mutación BRAF se correlaciona positivamente con la unión a MGL1. Esto sugiere un modelo en el que la activación de mutaciones BRAF y posiblemente otras alteraciones oncogénicas que activan la vía MAPK conducen a un perfil alterado de glicosilación de células tumorales y expresión mejorada de ligandos de MGL1. Estos glicanos aberrantes en las células tumorales pueden tener la capacidad de suprimir las respuestas inmunitarias antitumorales mediante la activación del receptor MGL1 en las CDs, [49], y así promover el desarrollo tumoral.

Así mismo se observa de manera clara que los ratones WT CAC tuvieron un desarrollo tumoral exacerbado en comparación a los ratones (*Mgl* *-/-*). Esto indica una probable relación entre MGL1 y un mayor desarrollo tumoral. Por otro lado, se analizó la presencia de MGL1 y MGL2 tanto en macrófagos como en CDs, de ambos grupos dando como resultado que MGL1 no se expresa en estos tipos celulares; sin embargo, MGL2 se expresó tanto en Mo como en CDs de ambos grupos. Esto se debe a que

cuando se realizaron estos ratones (*Mgl* *-/-*) no se había reportado la existencia de MGL2. El cual es semejante a MGL humana debido a que es capaz de reconocer a N-GalNAc y galactosa y O-ligado Tn-antígeno, TF-antígeno [42] por lo tanto es probable que MGL2 se relacione con estos ligandos mediante algún mecanismo aún no elucidado, y que probablemente esté influyendo en el desarrollo tumoral, incluso cuando MGL1 no se expresa en los ratones (*Mgl* *-/-*). Sin embargo, los resultados sugieren que el mayor, el mayor grado de desarrollo tumoral fue visible en los ratones WT (los cuales expresan MGL1 y MGL2) lo que indica que, aunque MGL1 sea altamente específico para estructuras Lewis X y Lewis A de podría generar un mayor desarrollo tumoral.

Por otro lado el análisis histopatológico, mostró que el grupo Wt CAC tuvo mayor desarrollo tumoral en comparación al grupo (*Mgl* *-/-*), debido a que se puede observar la presencia de lesiones neoplásicas, que incluyen la formación de criptas aberrantes, lo que es una característica del desarrollo de CAC inducido químicamente, con AOM/DSS, donde el desarrollo de la neoplasia se origina a partir de focos de criptas aberrantes [53].

La presencia de criptas aberrantes en los cortes histológicos muestran un alto nivel de displasia y denominado microadenomas [54]. Por otro lado, el número de células caliciformes se reduce notablemente o las células se pierden por completo [52]. Las mucinas son glicoproteínas secretadas por las células caliciformes y actúan como protectoras del colon. Son de vital importancia debido a que recubren el epitelio y promueven la eliminación del contenido intestinal y proporciona la primera línea de defensa contra las lesiones físicas y químicas causadas por la ingestión de alimentos, microbios y productos microbianos [55]. Por ello, el grupo WT CAC mostró una mayor pérdida de células caliciformes y, por ende, de mucinas que fue evidente en la tinción azul alcian, lo que indica un mayor daño del tejido y por lo tanto, mayor desarrollo tumoral en comparación con el grupo (*Mgl* *-/-*).

El análisis de las poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ dio como resultado diferencias dentro de la población de CD8+ tanto para el grupo WT como para los inducidos con CAC. Esto podría deberse a que la unión de MGL con un anticuerpo

anti-MGL o un glucopéptido MUC1-Tn inducen la maduración funcional de las DCs que permiten una fuerte respuesta inmunitaria de células T CD8 + [56] . Sin embargo, de igual manera en los grupos sanos, la población de linfocitos CD8+ se mantuvo por encima de los CD4+ de una manera basal. Esto sugiere que no se puede afirmar que el alza en las poblaciones de CD8+ en los grupos con CAC se deba a una interacción entre un antígeno tumoral como MUC1 o algún otro antígeno que esté relacionado con el desarrollo tumoral.

Otros de nuestros análisis se basó en la población de células supresoras derivadas de mieloides, debido a que se sugiere que estas células son un componente principal del infiltrado celular y desempeñan un papel fundamental en la promoción de la progresión tumoral [57]. Analizamos las poblaciones CD11b + Ly6G + Ly6C ya que se reconoce que la tumorigénesis en ratones está asociada con el reclutamiento de neutrófilos asociados a tumores (TAN) [58]. Se clasifican así debido a que la mayoría de los TAN son CD11b + Ly6G + y, por lo tanto, se clasifican como un subconjunto de células CD11b + Gr-1 + , que también incluyen células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), una población heterogénea de células mieloides en ratones que se producen en exceso durante el desarrollo del cáncer [58]. En los resultados se obtuvo que existe un mayor porcentaje de población CD11b+ en el grupo CAC pero también un mayor porcentaje de Ly6G en el grupo (*Mgl -/-*) que son los que tuvieron menor desarrollo tumoral, deja dudas si estas células de origen granulocítico tienen un papel en el desarrollo o en la prevención del CAC en este modelo de cáncer inducido químicamente.

Por último, se analizó mediante western blot, la fosforilación de la vía de señalización ERK 1/2 debido a que forma parte de la vía de las (MAPK), reguladores centrales altamente conservados de la proliferación, la progresión del ciclo celular y la supervivencia celular. Esta cascada de señalización se activa como respuesta a numerosas señales extracelulares que incluyen estrés celular, citocinas y factores de crecimiento [59]. En línea con esto se ha reportado que ERK 1/2 se encuentra mutada en el 33% de los tumores humanos, y por otro lado, el 8 % expresa una forma activada de BRAF [60]. Por ello, la sobreexpresión de la vía ERK1/2 particularmente en la zona media-proximal del colon en el grupo WT CAC, podría deberse a que los objetivos

nucleares de ERK consisten en gran parte en factores de transcripción involucrados en la proliferación celular y son clave en la transformación oncogénica [61] lo cual podría explicar el mayor desarrollo tumoral que se observa en la zona media-proximal en comparación a la zona distal, en el grupo WT CAC en comparación con el grupo (*Mgl* *-/-*). Este resultado podría indicar una posible relación entre la mutación de BRAF la cual se correlaciona positivamente con la unión a MGL1.

Por otro lado, al igual que ERK 1/2 se analizó mediante wester blot la fosforilación de la vía de señalización AKT, la cual es una serina/treonina cinasa, también conocida como proteína cinasa B (PKB), que se considera una proteína oncogénica involucrada en la regulación de la supervivencia celular, la proliferación, el crecimiento, la apoptosis y el metabolismo del glucógeno [62]. Además se ha reportado que la AKT fosforilada (pAKT) está implicada en la desregulación de la apoptosis, la proliferación y la motilidad celular debido a que induce señales que interfieren con los mecanismos reguladores normales que activan mTOR por lo que la sobreexpresión de pAKT se considera una diana terapéutica para el tratamiento de tumores malignos [63]. Nuestros resultados indicaron que AKT está sobre expresada en la parte media-proximal del colón en el grupo (*Mgl* *-/-*) CAC. Es un resultado contrastante ya que el desarrollo tumoral en ese grupo fue menor en comparación con el grupo WT CAC, el cual tuvo una sobreactivación de ERK1/2. Esto nos podría sugerir que la activación de ERK1/2 es más relevante en el desarrollo tumoral para este modelo, mientras que la sobreactivación de AKT no fue suficiente para igualar el desarrollo tumoral con sobreactivación de ERK1/2.

## 8. Conclusiones

- Los animales deficientes en *mgl1* desarrollan un menor número de tumores, de menor tamaño y de menor daño histológico en comparación a los animales WT durante el transcurso del CAC experimental.
- La deficiencia de MGL1 favorece un incremento de más del doble en la frecuencia de células CD11b+ y Ly6C+Ly6G+ en los animales control la cual se mantiene al final del desarrollo del CAC.
- La deficiencia de MGL1 favorece la sobreexpresión de p-AKT, sin embargo, no se incrementa la fosforilación de pERK1/2 en comparación a los animales WT.

## Perspectivas

Me gustaría poder replicar el experimento pero con unos ratones que sean KO tanto para MGL1 como para MGL2 y así poder compararlo, para saber si existen diferencias en los resultados. También medir la expresión BRAF para poder determinar si existe alguna relación con el desarrollo tumoral y MGL. También medir citocinas pro inflamatoria para determinar si su producción aumenta en este modelo.

## 9. Literatura citada

1. Montor, J.M. and M. Segovia, *Immunotherapy in Resistant Cancer: From the Lab Bench Work to Its Clinical Perspectives*. 2020: Academic Press.
2. Moses, C., et al., *Hallmarks of cancer: The CRISPR generation*. Eur J Cancer, 2018. **93**: p. 10-18.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
5. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. Oncogene, 2007. **26**(9): p. 1324-37.
6. Blasco, M.A., *Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(8): p. 611-22.
7. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
8. Talmadge, J.E. and I.J. Fidler, *AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective*. Cancer Res, 2010. **70**(14): p. 5649-69.
9. Juárez-Vázquez, C.I. and M.A.J.G.M.d.M. Rosales-Reynoso, *Cáncer colorrectal (CCR): alteraciones genéticas y moleculares*. 2014. **150**(2): p. 154-164.

10. Leon-Cabrera, S., et al., *Deficiency in STAT1 Signaling Predisposes Gut Inflammation and Prompts Colorectal Cancer Development*. *Cancers (Basel)*, 2018. **10**(9).
11. Callahan, M.K., J.D. Wolchok, and J.P. Allison, *Anti-CTLA-4 antibody therapy: immune monitoring during clinical development of a novel immunotherapy*. *Semin Oncol*, 2010. **37**(5): p. 473-84.
12. Keum, N. and E. Giovannucci, *Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies*. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 2019. **16**(12): p. 713-732.
13. Murphy, N., et al., *Lifestyle and dietary environmental factors in colorectal cancer susceptibility*. *Molecular aspects of medicine*, 2019. **69**: p. 2-9.
14. Ferlay, J., et al., *Global cancer observatory: cancer today*. Lyon, France: international agency for research on cancer, 2018: p. 1-6.
15. Xi, Y. and P. Xu, *Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040*. *Translational Oncology*, 2021. **14**(10): p. 101174.
16. Murphy, N., et al., *Heterogeneity of colorectal cancer risk factors by anatomical subsite in 10 European countries: a multinational cohort study*. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2019. **17**(7): p. 1323-1331. e6.
17. Yang, L., et al., *Proximal shift of colorectal cancer with increasing age in different ethnicities*. *Cancer management and research*, 2018. **10**: p. 2663.
18. Jasperson, K.W., et al., *Hereditary and familial colon cancer*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(6): p. 2044-2058.
19. Pitot, H.C., *The molecular biology of carcinogenesis*. *Cancer*, 1993. **72**(S3): p. 962-970.
20. Ogino, S. and A. Goel, *Molecular classification and correlates in colorectal cancer*. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2008. **10**(1): p. 13-27.
21. Grady, W.M. and J.M. Carethers, *Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis*. *Gastroenterology*, 2008. **135**(4): p. 1079-1099.
22. Bakhoun, S.F., et al., *The mitotic origin of chromosomal instability*. *Current Biology*, 2014. **24**(4): p. R148-R149.
23. Mojarad, E.N., et al., *The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer*. *Gastroenterology and hepatology from bed to bench*, 2013. **6**(3): p. 120.
24. Pawlik, T.M., C.P. Raut, and M.A. Rodriguez-Bigas, *Colorectal carcinogenesis: Msi-h versus msi-l*. *Disease markers*, 2004. **20**(4, 5): p. 199-206.
25. Markowitz, S.D. and M.M. Bertagnolli, *Molecular basis of colorectal cancer*. *New England journal of medicine*, 2009. **361**(25): p. 2449-2460.
26. Conteduca, V., et al., *Precancerous colorectal lesions*. *International journal of oncology*, 2013. **43**(4): p. 973-984.
27. Dow, L.E., et al., *Apc restoration promotes cellular differentiation and reestablishes crypt homeostasis in colorectal cancer*. *Cell*, 2015. **161**(7): p. 1539-1552.
28. Leggett, B. and V. Whitehall, *Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis*. *Gastroenterology*, 2010. **138**(6): p. 2088-2100.
29. Jess, T., C. Rungoe, and L. Peyrin-Biroulet, *Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies*. *Clinical gastroenterology and hepatology*, 2012. **10**(6): p. 639-645.
30. Itzkowitz, S.H. and X. Yio, *Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation*. *American journal of physiology-gastrointestinal and liver physiology*, 2004. **287**(1): p. G7-G17.

31. Li, F.-y. and M.-d. Lai, *Colorectal cancer, one entity or three*. Journal of Zhejiang University Science B, 2009. **10**(3): p. 219-229.
32. Drewes, J.L., F. Housseau, and C.L. Sears, *Sporadic colorectal cancer: microbial contributors to disease prevention, development and therapy*. British journal of cancer, 2016. **115**(3): p. 273-280.
33. Missiaglia, E., et al., *Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features*. Annals of oncology, 2014. **25**(10): p. 1995-2001.
34. Chen, L., et al., *Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs*. Oncotarget, 2017. **9**(6).
35. Mowat, A.M. and W.W. Agace, *Regional specialization within the intestinal immune system*. Nature Reviews Immunology, 2014. **14**(10): p. 667-685.
36. Terzić, J., et al., *Inflammation and colon cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2101-2114. e5.
37. Zizzari, I.G., et al., *MGL Receptor and Immunity: When the Ligand Can Make the Difference*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 450695.
38. Engering, A., et al., *The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells*. The Journal of Immunology, 2002. **168**(5): p. 2118-2126.
39. Brown, G.D., J.A. Willment, and L. Whitehead, *C-type lectins in immunity and homeostasis*. Nature Reviews Immunology, 2018. **18**(6): p. 374-389.
40. Geijtenbeek, T.B. and S.I. Gringhuis, *Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(7): p. 465-479.
41. Raes, G., et al., *Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation*. Journal of leukocyte biology, 2005. **77**(3): p. 321-327.
42. Singh, S.K., et al., *Characterization of murine MGL1 and MGL2 C-type lectins: distinct glycan specificities and tumor binding properties*. Molecular immunology, 2009. **46**(6): p. 1240-1249.
43. van Vliet, S.J., et al., *Regulation of effector T cells by antigen-presenting cells via interaction of the C-type lectin MGL with CD45*. Nat Immunol, 2006. **7**(11): p. 1200-8.
44. van Vliet, S.J., et al., *MGL signaling augments TLR2-mediated responses for enhanced IL-10 and TNF- $\alpha$  secretion*. Journal of leukocyte biology, 2013. **94**(2): p. 315-323.
45. Nakamura, K. and M.J. Smyth, *Targeting cancer-related inflammation in the era of immunotherapy*. Immunol Cell Biol, 2017. **95**(4): p. 325-332.
46. Ding, D., et al., *C-type lectins facilitate tumor metastasis*. Oncol Lett, 2017. **13**(1): p. 13-21.
47. Nollau, P., et al., *Protein Domain Histochemistry (PDH) Binding of the Carbohydrate Recognition Domain (CRD) of Recombinant Human Glycoreceptor CLEC10A (CD301) to Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Breast Cancer Tissues*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2013. **61**(3): p. 199-205.
48. Lenos, K., et al., *MGL ligand expression is correlated to BRAF mutation and associated with poor survival of stage III colon cancer patients*. Oncotarget, 2015. **6**(28): p. 26278.
49. Sahasrabudhe, N.M., et al., *Oncogenic BRAFV600E drives expression of MGL ligands in the colorectal cancer cell line HT29 through N-acetylgalactosamine-transferase 3*. Biological chemistry, 2018. **399**(7): p. 649-659.

50. Sahasrabudhe, N.M., et al., *MGL ligand expression is correlated to lower survival and distant metastasis in cervical squamous cell and adenosquamous carcinoma*. *Frontiers in oncology*, 2019. **9**: p. 29.
51. Tanaka, T., et al., *A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate*. *Cancer science*, 2003. **94**(11): p. 965-973.
52. De Robertis, M., et al., *The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies*. *Journal of carcinogenesis*, 2011. **10**.
53. Bird, R.P. and C.K. Good, *The significance of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer*. *Toxicology letters*, 2000. **112**: p. 395-402.
54. Roncucci, L., A. Medline, and W.R. Bruce, *Classification of aberrant crypt foci and microadenomas in human colon*. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 1991. **1**(1): p. 57-60.
55. Kim, Y.S. and S.B. Ho, *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. *Current gastroenterology reports*, 2010. **12**(5): p. 319-330.
56. Napoletano, C., et al., *Targeting of macrophage galactose-type C-type lectin (MGL) induces DC signaling and activation*. *European journal of immunology*, 2012. **42**(4): p. 936-945.
57. Balkwill, F. and L.M. Coussens, *An inflammatory link*. *Nature*, 2004. **431**(7007): p. 405-406.
58. Yang, X.D., et al., *Histamine deficiency promotes inflammation-associated carcinogenesis through reduced myeloid maturation and accumulation of CD11b+ Ly6G+ immature myeloid cells*. *Nature medicine*, 2011. **17**(1): p. 87-95.
59. Roberts, P.J. and C.J. Der, *Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer*. *Oncogene*, 2007. **26**(22): p. 3291-3310.
60. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. *Nature*, 2002. **417**(6892): p. 949-954.
61. Maik-Rachline, G., A. Hacohen-Lev-Ran, and R. Seger, *Nuclear ERK: mechanism of translocation, substrates, and role in cancer*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. **20**(5): p. 1194.
62. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Acts*. *Genes & development*, 1999. **13**(22): p. 2905-2927.
63. Song, M., et al., *AKT as a Therapeutic Target for Cancer Challenging Cancer Therapy by Targeting AKT*. *Cancer research*, 2019. **79**(6): p. 1019-1031.