



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**Participación de MIF durante el desarrollo
tumoral de cáncer colorrectal asociado a colitis
en un modelo murino**

TESIS

Para obtener el título de

BIÓLOGA

P R E S E N T A

Brenda Alarcón Campos

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Miriam Rodríguez Sosa



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
SECRETARÍA GENERAL ACADÉMICA
CARRERA DE BIOLOGÍA



Los Reyes Iztacala a 10 de Octubre del 2023
Registro: **BIO/83/23**

LIC. CAROLINA CONSUELO VEGA VILLAGÓMEZ
JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR

Los profesores abajo firmantes, miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo escrito para la titulación en la modalidad de **TESIS**, titulado **Participación de MIF durante el desarrollo tumoral de cáncer colorrectal asociado a colitis en un modelo murino** realizado por **Brenda Alarcón Campos** con número de cuenta **317023561** de la generación **2020**, manifestamos que después de haber revisado cuidadosamente el trabajo escrito, este reúne las características de calidad y decoro académico requeridas para la obtención del grado académico de la Licenciatura en **BIOLOGÍA**, razón por la cual otorgamos el **VOTO APROBATORIO** para la presentación del examen profesional correspondiente:

| GRADO | NOMBRE | CARGO | FIRMA |
|-------|-----------------------------------|------------|-----------------|
| Dr. | Luis Ignacio Terrazas Valdés | Presidente | |
| Dr. | José Luis Reyes Hernández | Vocal | |
| Dra. | Miriam Rodríguez Sosa | Secretario | |
| Dra. | Monica Graciela Mendoza Rodríguez | Suplente | |
| Dra. | Christian Daniela Ortiz Robles | Suplente | Christian Ortiz |

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Vo. Bo. DIRECTORA
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA

Vo. Bo. JEFE DE CARRERA
DR. HUGO VIRGILIO PERALES VELA

"Si haces las cosas bien, lo demás viene solo."

- Mi papá

Dedicatoria

A mis padres, quienes han estado a mi lado en cada paso de esta aventura llamada vida. Nada de esto hubiese sido posible sin su sabiduría, consejos, apoyo, regaños y, sobre todo, amor. Les prometo que este solo será un logro de los muchos que compartiremos juntos. Los amo.

Mamá, tu apoyo incondicional, el estudiar conmigo cosas que, aunque no entendías, no me dejabas sola y sufríamos juntas. Gracias por los abrazos y palabras de aliento que me diste cuando más las necesitaba.

Papá, mi Titi, tu confianza en mí aun cuando yo no me sentía capaz de seguir, la motivación constante para dar mi mejor esfuerzo en cada prueba que se me ponía enfrente. Hace diez años me dijiste que estaba por llegar a la mitad de mi camino, hoy con tu apoyo, he llegado a la estrella del árbol.

Hermano, mi pequeña ratita, el aguantarme aún en mis momentos más malos merece toda una ceremonia, me motivaste en cada paso aun cuando eras un niño, gracias por permitirme ser tu ejemplo durante todos estos años.

Daniel, eres mi confidente y mi incondicional, me has enseñado a confiar en mí y ver que soy capaz de lo que me proponga. Este el primer paso de muchos juntos. Recuerda, dos palabras, cinco letras.

Breayka, mi compañera de desvelos. Me alegras los días con solo existir. Te amo.

Agradecimientos

A la Dra. Miriam, por permitirme ser parte del laboratorio 5 de la Unidad de Investigación en Biomedicina y elaborar el presente proyecto. Por brindarme su tiempo y oportunidades para un mejor desarrollo como estudiante de la ciencia.

A los miembros del comité tutorial: Dra. Christian Daniela Ortiz Robles, Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, Dra. Mónica Graciela Mendoza Rodríguez, Dr. José Luis Reyes Hernández; por su guía, sugerencias y apoyo para la escritura y presentación del proyecto.

A Ulises, por estar conmigo en todo este año y medio enseñándome desde cero, motivándome, regañándome y, sobre todo creyendo en mí. Nunca había tenido un mentor más dedicado y atento, me siento muy orgullosa de ser tu hija académica.

Al equipo rojo, Uli, Dra. Christian, Monste, Sampe, Ime y Enrique. Por su constante apoyo en muchos aspectos, enseñanza, paciencia, risas, vivencias dentro y fuera del laboratorio que siempre tendré en el corazón.

A Caro y Maes, mis hermanas. Aunque ya no nos frecuentamos como antes, ustedes han formado parte de cada paso en esta trayectoria, y me siento feliz de poder seguir a su lado en las buenas, malas y peores.

A Nirvana y Kooka, son mi otra mitad. Les agradezco su paciencia y apoyo en mi desarrollo académico y personal. Con ustedes comprendo la palabra 정 'Jung' y agradezco a la vida porque seguimos juntos.

A mis cariñosas: Mery, mi lobita (Karla), Vicky, Pau y mi partner Xia. Han estado a mi lado en cada crisis y carcajada de la carrera. Les agradezco por todo su cariño, comprensión y los ánimos que me dieron cuando más lo necesitaba.

A mis abuelitos Herlinda Luna Velázquez y Joel Campos Ramírez, su interés por mi proyecto me hacía sentir feliz, me alegro de poder compartirlo con ustedes. Les agradezco por todo su cuidado, confianza en mí, palabras de aliento y amor.

† A María Estela Alarcón Sánchez, teté, la vida no nos permitió llegar hasta este punto juntas, pero en cada paso estuviste en mi mente. En nuestra última llamada me dijiste que sería un gran bióloga y, hoy sé que donde quiera que estés, te sientes orgullosa de mí. Gracias por tus cuidados y tanto amor. Te mando un beso.

El presente trabajo de investigación fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT), No. De proyecto: A1-S-10463.

Tabla de contenido

| | |
|---|----|
| Índice de tablas y figuras..... | V |
| Abreviaturas | VI |
| Resumen | 1 |
| Introducción..... | 2 |
| 1. Cáncer | 2 |
| 1.1 <i>Cáncer colorrectal</i> | 2 |
| 1.2 <i>Enfermedades inflamatorias intestinales</i> | 2 |
| 1.2.1 <i>Enfermedad de Crohn</i> | 3 |
| 1.2.2 <i>Colitis</i> | 3 |
| 2. Cáncer colorrectal asociado a colitis | 3 |
| 2.1 <i>Inflamación</i> | 4 |
| 3. Células inmunes en el cáncer colorrectal | 4 |
| 3.1 <i>Células mieloides</i> | 4 |
| 3.2 <i>Células linfoides</i> | 5 |
| 4. Citocinas..... | 5 |
| 5. Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) | 6 |
| 6. Receptores de MIF | 7 |
| 6.1 <i>CD74</i> | 7 |
| 6.2 <i>Interacción de MIF con receptores para quimiocinas</i> | 7 |
| 6.2.1 <i>MIF – CXCR2</i> | 8 |
| 6.2.2 <i>MIF – CXCR4</i> | 8 |
| 6.2.3 <i>MIF – CXCR7</i> | 8 |
| 7. MIF en la hipoxia..... | 8 |
| 8. MIF en la angiogénesis | 8 |
| Justificación..... | 9 |
| Hipótesis..... | 9 |
| Objetivo general..... | 10 |
| Objetivos particulares | 10 |
| Materiales y métodos..... | 11 |
| <i>Organismos</i> | 11 |
| <i>Genotipo</i> | 11 |
| <i>Electroforesis</i> | 11 |
| <i>Desarrollo del cáncer colorrectal asociado a colitis</i> | 11 |

| | |
|--|----|
| <i>Manifestaciones clínicas</i> | 12 |
| <i>Obtención de muestras del colon</i> | 12 |
| <i>Análisis histológico</i> | 12 |
| <i>Hematoxilina y eosina/Azul alcian</i> | 12 |
| <i>Disociación del tumor</i> | 12 |
| <i>Citometría de flujo</i> | 13 |
| Resultados..... | 15 |
| <i>Genotipo</i> | 15 |
| <i>La presencia de MIF favorece el desarrollo tumoral en el colon</i> | 18 |
| <i>La presencia de MIF evidenció un mayor daño en el colon</i> | 20 |
| <i>MIF modificó la expresión de CD74, CXCR7 y CXCR4 sin alterar CXCR2</i> | 23 |
| Discusión | 24 |
| Conclusión..... | 28 |
| Perspectivas..... | 28 |
| Referencias | 29 |
| Anexo Técnico | 35 |

Índice de tablas y figuras

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Panel de anticuerpos utilizados para evaluación de receptores de MIF..... | 13 |
| Figura 1. Número de muertes estimadas en 2020 para hombres y mujeres de todas las edades por CCR mundialmente y en México. De acuerdo con GLOBOCAN 2020..... | 2 |
| Figura 2. Tipos de colitis ulcerativa. Hecho en Biorender..... | 3 |
| Figura 3. Estructura tridimensional de MIF. A) Vista frontal. B) Vista lateral [42]..... | 6 |
| Figura 4. Esquema del modelo de cáncer colorrectal asociado a colitis. | 12 |
| Figura 5. Estrategia de análisis para determinar las poblaciones celulares mediante citometría de flujo. | 14 |
| Figura 6. Gel de agarosa donde se observan los productos obtenidos de PCR en los genes Mif (200 pb) y Neo (500 pb). | 15 |
| Figura 7. Gráfica de ganancia de peso semanalmente de los grupos con CAC WT y Mif ^{-/-} | 16 |
| Figura 8. Consumo semanal de agua durante el desarrollo del modelo de CAC..... | 16 |
| Figura 9. Consumo semanal de alimento durante el desarrollo del modelo de CAC. | 17 |
| Figura 10. Fotografías representativas de los ratones con CAC que muestran daño ocasionado por el desarrollo del CAC. | 17 |
| Figura 11. Manifestaciones clínicas. La diarrea y sangrado se monitoreó semanalmente de acuerdo con la escala propuesta por Cooper 1993. Las barras representan el promedio del puntaje obtenido de acuerdo con la escala utilizada, por cada individuo \pm SE. N=2 | 18 |
| Figura 12. Desarrollo del CAC A) Semana cinco (33 d.p.i.) B) Semana ocho (54 d.p.i.) C) Semana once (75 d.p.i.). Tejido representativo de cada grupo experimental. | 19 |
| Figura 13. Longitud del colon a las cinco, ocho y once semanas. La longitud del tejido se midió con ayuda de una vernier. Las barras representan la media \pm SE. N=2. | 19 |
| Figura 14. Número de tumores a las cinco (33 d.p.i), ocho (54 d.p.i) y once (75 d.p.i) semanas. Las barras representan la media \pm SE. N=2 | 20 |
| Figura 15. Imágenes representativas del colon en ratones control y CAC (WT y Mif ^{-/-}). Tinción H&E en colon a la semana cinco (33 d.p.i), ocho (54 d.p.i), y once (75 d.p.i). | 21 |
| Figura 16. Imágenes representativas del colon en ratones control y CAC (WT y Mif ^{-/-}). Tinción azul alcian en colon a la semana cinco (33 d.p.i), ocho (54 d.p.i), y once (75 d.p.i). | 22 |
| Figura 17. Porcentaje de células epiteliales que expresan los receptores de MIF. A) Semana cinco (33 d.p.i) B) Semana ocho (54 d.p.i)..... | 23 |

Abreviaturas

| Abreviatura | Significado |
|--------------------|--|
| AOM | Azoximetano |
| APC | Adenomatous polyposis coli |
| CCR | Cáncer colorrectal |
| CAC | Cáncer colorrectal asociado a colitis |
| COX | Ciclooxygenasa |
| CXCR | Receptor de quimiocina tipo CXC |
| DC | Células dendríticas |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| dNTPs | Desoxinucleótidos de Trifosfatos |
| DSS | Dextrán Sulfato de Sodio |
| ERK | Cinasas Reguladas por señales Extracelulares |
| HIA | Apoptosis Inducida por Hipoxia |
| HIF | Factor Inducible por Hipoxia |
| IBD | Enfermedades inflamatorias intestinales (del inglés -inflammatory bowel disease-) |
| IFN- γ | Interferón gamma |
| IL | Interleucina |
| MAPK | Proteína cinasa activada por mitógenos |
| MDSC | Células Supresoras Derivadas de Mieloides |
| MgCl ₂ | Cloruro de Magnesio |
| MHC | Complejo principal de histocompatibilidad |
| MIF | Factor inhibidor de la migración de macrófagos |
| MMP | Metaloproteinasas de matriz |
| mRNA | RNA mensajero |
| NF-KB | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas |
| NK | Células asesinas naturales |
| NO | Óxido nítrico |
| PI3 | PI3-cinasa Fosfoinositol 3-cinasa |
| PGE2 | Prostaglandina E2 |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNS | Especies reactivas de nitrógeno |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| SDF-1 α | Factor derivado de células estromales 1-alfa |
| TGF- β | Factor de crecimiento transformante beta |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral-alfa |
| Treg | Linfocito T regulador |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular |

Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) es causado por un crecimiento descontrolado en las células epiteliales del colon o del recto. Las enfermedades inflamatorias intestinales (IBD), como la colitis, se asocia con un incremento en la posibilidad de desarrollar cáncer colorrectal asociado a la colitis (CAC). Recientemente se ha descrito que algunos mediadores inflamatorios como el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) podrían promover el desarrollo de CAC y/o favorecer el crecimiento tumoral. El objetivo de este trabajo fue establecer la participación de MIF en el desarrollo del CAC. En esta tesis se indujo un modelo de carcinogénesis química mediante inyección única vía intraperitoneal de azoximetano (AOM) y tres ciclos de Dextrán Sulfato de Sodio (DSS) en ratones BALB/c, knockout de *Mif* (*Mif*^{-/-}) y ratones silvestres (WT). Los resultados demostraron que la ausencia de MIF se asocia a un menor daño en la estructura de las criptas, disminución en el infiltrado celular y mayor cantidad de células goblet en comparación con los animales con expresión de MIF. No se encontraron diferencias en la pérdida de peso, consumo de alimento y agua. Sin embargo, los ratones *Mif*^{-/-} presentaron menos tumores y daño (diarrea y sangrado) en comparación con los ratones WT. Adicionalmente, CD74 y CXCR2 se encontraron en porcentajes disminuidos para todos los grupos, y se observó un incremento en la expresión de los receptores de MIF, CXCR4 y CXCR7, en las semanas cinco y ocho respectivamente, en células epiteliales de los ratones *Mif*^{-/-}. Debido a la deficiencia de MIF todas estas moléculas que participan en procesos angiogénicos y metastásicos se desregulan, lo cual indica que la expresión de MIF es importante en el desarrollo de CAC.

Introducción

1. Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado y la propagación de células anormales, las cuales han perdido su función y estructura original, generando un tumor [1]. Los tumores cancerosos se diseminan en tejidos cercanos o migran a otras partes del organismo (metástasis) y afectan diferentes órganos [2]. Cuando se traspasa la capa, entra al torrente sanguíneo o al sistema linfático, y puede alcanzar otros órganos o ganglios en el cuerpo; esto se conoce metástasis [3]. Las células capaces de generar metástasis deben desprenderse del sitio del tumor primario y luego adherirse a la capa o pared exterior de algún vaso linfático o sanguíneo generando un tumor secundario [4].

1.1 Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) ocupa el tercer lugar de incidencia y el segundo en mortalidad a nivel mundial. En México, los datos reportados no son tan diferentes, se clasifica como la segunda causa de muerte para ambos sexos de todos los casos de cáncer [5]. En el año 2020 se le diagnosticó a 1,880,725 personas con CCR, de las cuales 915,880 fallecieron (Figura 1) [5]. Se le denomina CCR cuando el cáncer se originó en el colon o el recto [6].

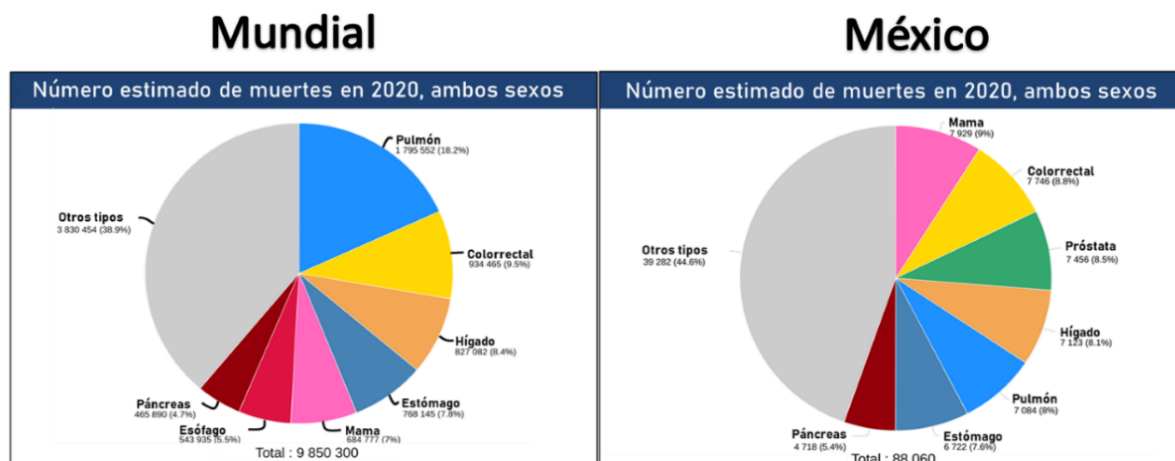


Figura 1. Número de muertes estimadas en 2020 para hombres y mujeres de todas las edades por CCR mundialmente y en México. De acuerdo con GLOBOCAN 2020.

1.2 Enfermedades inflamatorias intestinales

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa son enfermedades inflamatorias intestinales (del inglés Inflammatory Bowel Disease “IBD”) que aumentan las posibilidades de desarrollar CCR [7]. Ambas se caracterizan por la inflamación desregulada ocasionada por la infiltración de células inmunitarias y la sobreproducción de citocinas inflamatorias en el intestino. Por ello, se ha considerado a la inflamación

crónica intestinal como el factor clave en la predisposición a CCR asociado a colitis (CAC) [8].

Tras 30 años del diagnóstico, el porcentaje de personas con colitis ulcerativa es de 18% [9]. Además, la obesidad, inactividad física, tabaquismo, alcohol y una dieta alta en grasas y/o baja en frutas, verduras o fibra se asocian también al desarrollo de CCR [10].

1.2.1 Enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn es conocida también como enteritis regional [11]. Esta enfermedad suele afectar el segmento distal del íleon y el colon [12]. La formación de fístulas en la pared del intestino por el proceso inflamatorio y la inflamación transmural son lo que la diferencia de la colitis ulcerativa [9].

1.2.2 Colitis

La colitis ulcerativa afecta al colon y al recto [12]. Esta enfermedad se caracteriza por la formación de úlceras que afectan a la mucosa y a la lámina propia sin ser transparietal [13]. Existen diferentes tipos de colitis ulcerativa (Figura 2), dependiendo de su localización se puede establecer los grados de extensión de la enfermedad: proctitis aislada (solo el recto), proctosigmoiditis (colon sigmoide y recto), y pancolitis (afecta todo el colon y el recto) [14].

Estudios recientes han reportado una relación entre la inflamación crónica y la carcinogénesis del tracto gastrointestinal, se ha visto que el grado de inflamación y la duración de la enfermedad, incrementan el riesgo de que la colitis ulcerosa forme una displasia del tejido epitelial intestinal y posteriormente una carcinogénesis [15].



Figura 2. Tipos de colitis ulcerativa. Hecho en Biorender.

2. Cáncer colorrectal asociado a colitis

El CAC es un subtipo de cáncer colorrectal que está asociado con IBD, ocasionado la muerte del 10-15% de las personas que las padecen [15, 16]. Recientemente, se ha reportado que los pacientes con colitis ulcerativa pueden presentar brotes frecuentes de inflamación debido a la destrucción continua de la superficie epitelial de la mucosa provocando una alteración en la estructura de las criptas y mecanismos de reparación

[17-19]. El sistema inmune aumenta la proliferación celular para reparar las células epiteliales, sin embargo, una proliferación descontrolada podría generar CAC [20].

2.1 Inflamación

La inflamación es un mecanismo de defensa contra un agente patógeno que produce daño [21]. Las células de la respuesta inmune inflamatoria reconocen al patógeno iniciando un proceso inflamatorio para reclutar a otras células en el área con la finalidad de eliminar al patógeno, y posteriormente repararla lesión [14]. Sin embargo, la inflamación exacerbada y sostenida por largo tiempo da pie a enfermedades como esclerosis, artritis, asma y cáncer [9].

La colitis es la inflamación del epitelio intestinal [15]. Esta se desencadena generalmente por como respuesta a la disbiosis [22]. Cuando se desarrolla la inflamación crónica, la infiltración de células inmunes activadas producen elevadas cantidades de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y NOS, respectivamente) [23].

Estas especies reactivas de oxígeno generan alteraciones en el material genético (mutación o activación del gen *p53*), daño en el sistema de reparación de *missmatch* del DNA, acortamiento de telómeros y metilación de genes regulatorios como *APC*, la cual sea documentado en más del 80% de los casos de CCR en la etapa de pólipo [24].

3. Células inmunes en el cáncer colorrectal

Las células del sistema inmune como NK, linfocitos y macrófagos reconocen a las células cancerígenas y participan promoviendo o regulando la inflamación durante la progresión del tumor [2], dependiendo de la etapa del desarrollo del tumor.

3.1 Células mieloides

Los *neutrófilos* son células inmunes innatas que se reclutan en sitios inflamatorios, y llevan a cabo una amplia variedad de funciones antimicrobianas como la fagocitosis, la liberación de ROS, y la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) para eliminar la infección microbiana intestinal [25].

Los *macrófagos* son células capaces de fagocitar células tumorales [26]. Por otro lado, los macrófagos asociados a tumores (TAM), localizados en la masa tumoral, favorecen el crecimiento de los tumores al infiltrarse en el tejido tumoral, y adquieren funciones en respuesta a estímulos del microambiente tumoral. Estas células son abundantes en cada etapa de la progresión tumoral [27, 28]. Estudios recientes reportaron que en el cáncer de mama y próstata la presencia de macrófagos es un indicador desfavorable, mientras que para CCR es favorable [29].

Se ha reportado que los macrófagos M1 mediante la liberación de ROS, NO y la producción de TNF- α pueden eliminar a las células transformadas [30]. Por otro lado, los M2 promueven el desarrollo del tumor mediante la liberación de IL-4, IL-10, producción excesiva de TGF- β y reclutamiento de Tregs [28].

Las *células supresoras derivadas de mieloides (MDSC)* son células que resultan de la mielopoyesis aberrante y tienen la capacidad de inhibir la producción de IFN- γ producida por los linfocitos T CD8⁺ [31]. Recientemente se ha reportado que las ROS regulan la actividad de MDSC [32]. Además, se ha demostrado en modelos *in vitro* que las MDSC son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos, y promover la activación de las células Tregs [33].

3.2 Células linfoides

Las *células NK* son células cuya función principal es la inmunovigilancia [26]. Estas células expresan ligandos para los receptores (NKG2D/CD94, NKp30, NKp44 y NKp46) produciendo la secreción de citocinas como IFN- γ , TNF- α y factor de crecimiento de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF), e induciendo la apoptosis celular por diferentes vías, siendo la vía principal la citotóxica mediante la secreción de perforinas y granzimas [34, 35]. Además, se ha documentado que las células NK tienen la capacidad de eliminar células transformadas previniendo la formación de metástasis. Sin embargo, la actividad de estas células puede ser sesgada por la sobreexpresión de TGF- β [35].

Los *Linfocitos T CD8⁺* son células citotóxicas que reconocen antígenos expuestos en células tumorales por medio del complejo principal de histocompatibilidad tipo I (MHC-I), posteriormente se clonan y diferencian formando lisosomas modificados. Estas células modificadas pueden inducir la destrucción de células tumorales mediante la liberación de perforinas provocando la interrupción de la membrana celular creando poros que le permiten a las proteasas (principalmente granzima B) ingresar a la célula y promover la apoptosis. La mayoría de estos linfocitos mueren por apoptosis tras destruir a la células tumorales [26].

Los *Linfocitos T CD4⁺* son células que responden solamente ante a antígenos expuestos por medio del complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC-II), autorregulando su proliferación al liberar IL-2 en su superficie celular. Sin embargo, si estos linfocitos no son activados a un perfil proinflamatorio (Th1) promoviendo la proliferación de los linfocitos T CD8⁺, no se consideran suficientes para llevar a apoptosis a las células tumorales [26].

Los *Linfocitos T reguladores* conocidos como Tregs son células que median la supresión de tumores por medio la producción de citocinas inmunosupresoras (IL-10 y TGF- β) quienes suprimen la respuesta antitumoral ante tumores avanzados, la citólisis mediada a través de granzimas B y la modulación del microambiente con la participación de adenosina y receptores de superficie [31, 36].

4. Citocinas

Las células inmunes producen citocinas entre otras, TNF- α , IFN- γ , IL-1 α , IL- β , IL-6 y MIF quienes participan en la diferenciación, regulación de crecimiento y supervivencia de las células tumorales promoviendo su progresión [7, 37]. Los tumores pueden generar un microambiente para su progresión a través del reclutamiento de células inflamatorias [36].

Se ha observado que MIF se sobre expresa en CCR, cáncer de próstata metastásico, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de mama y hepatocelular [38]. La proliferación de células cancerígenas colorrectales, metástasis hepática y diferenciación tumoral se ha asociado con un aumento en la expresión de MIF [39].

5. Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF)

MIF es una citocina de 12.5 kDa con la estructura y actividad catalítica de una tautomerasa (Figura 3) [40]. Su nombre data de experimentos realizados en 1960, donde se probó que puede retener a los macrófagos y atraer a linfocitos y monocitos al lugar donde hay inflamación [41]. Actualmente se conoce como una citocina proinflamatoria con funciones similares a una quimiocina capaz de favorecer la respuesta innata a través de células del sistema inmune de manera autocrina o paracrina [38].

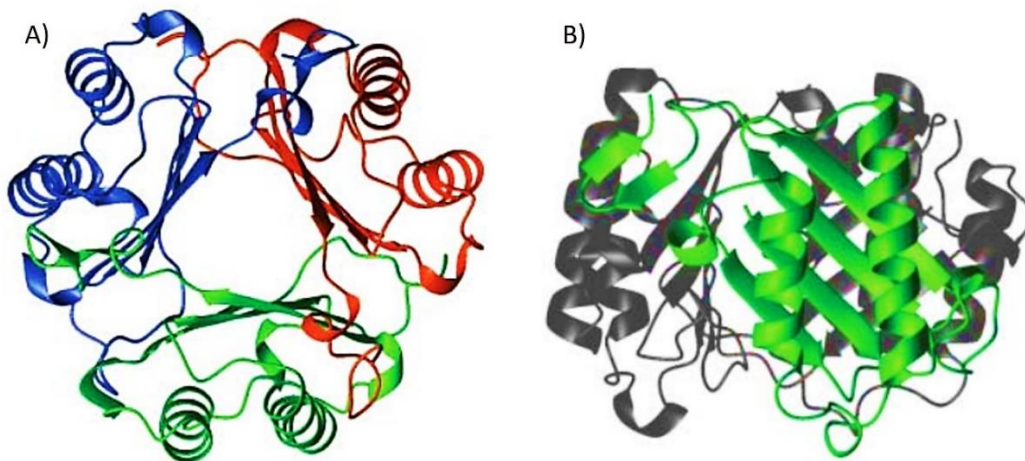


Figura 3. Estructura tridimensional de MIF. A) Vista frontal. B) Vista lateral [42].

MIF es producida por diferentes tipos de células y tejidos como Linfocitos (T y B), monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, células epiteliales, endoteliales y fibroblastos [43].

MIF promueve la producción de otras citocinas proinflamatorias como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-18, proteína inflamatoria de macrófago 2 (MIP-2), además de óxido nítrico (ON), COX-1 y productos de la vía del ácido araquidónico como PGE2 y metaloproteinasas 9 (MMP-9) de matriz [44]. Por otro lado, aumenta la expresión del receptor tipo Toll 4 (TLR-4), regula la transcripción de JAB-1 e inhibe la apoptosis dependiente de p53 [45].

Se ha documentado que MIF activa la vía de señalización por las MAPK dándole inicio al metabolismo araquidónico y suprimiendo la función de p53 [46]. Al inhibir p53, las células dañadas pueden replicarse sin control, detener la apoptosis, evadir al sistema inmune e incrementar las probabilidades de desarrollar cáncer [47].

Incluso, se ha demostrado el papel de MIF en enfermedades que tienen un componente inflamatorio; incluyendo choque séptico [48], artritis, asma, enfermedades autoinmunes [28] cáncer y trastornos metabólicos como la obesidad y la diabetes (tipo I y II) [30, 43].

6. Receptores de MIF

Se ha observado que MIF tiene un receptor canónico denominado CD74, el cual se incrementa en lesiones, inflamación y cáncer [49]. Además, por medio de su función como quimiocina puede unirse a los receptores CXCR2/4/7, los cuales se han documentado como promotores de metástasis [50].

6.1 CD74

CD74 es una proteína transmembranal de tipo II que se expresa en células inmunes [49]. Las isoformas en ratón son p31 y p41, mientras que en humanos es p33, p35, p41 y p43 [51]. Se ha reportado que CD74 se expresa en células endoteliales y epiteliales [52]. La presencia de enfermedades inflamatorias del intestino (por sus siglas en inglés, IBD) lesiones intestinales y CCR se han relacionado con la sobre expresión de CD74 [53].

MIF se une al dominio extracelular de su receptor canónico CD74 también conocido como la cadena α de MHC-II [54]. La unión MIF/CD74 necesita del correceptor CD44 para activar la vía de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), la cual promueve la expresión máxima de la ciclina D1 activando la cinasa dependiente de ciclina, fosforilación de RB y estimulación del factor de crecimiento y/o adhesión de células mesenquimales [49]. CD44 es una glicoproteína que regula la adhesión entre células, las interacciones célula-matriz y está involucrado en la migración e invasión celular, angiogénesis y metástasis [55].

Otra vía que se activa tras la unión MIF/CD74/CD44 es la vía PI3K/Akt/SRC que promueve una serie de respuestas celulares que están asociadas con la división celular, incluyendo el aumento en el tamaño de células, la supresión de la apoptosis, la inactivación de inhibidores del ciclo celular, migración celular, y la expresión de citocinas [42, 56].

6.2 Interacción de MIF con receptores para quimiocinas

Mediante la unión de MIF con los receptores de quimiocinas CXCR2, CXCR4 y CXCR7, se favorece la transformación y malignidad celular a través de sus mecanismos de señalización [57].

El factor 1α derivado de células estromales (SDF- 1α) es una citocina proinflamatoria que atrae quimiocinas [58]. En varios tipos de cáncer, la unión de SDF- 1α (CXCL12) CXCR4/CXCR7 e IL-8/CXCR2 se ha asociado con metástasis, lo cual incluye la proliferación celular, adhesión, migración e invasión [59].

6.2.1 MIF – CXCR2

Estudios recientes señalan que CXCR2 es el principal receptor de las quimiocinas que regulan la angiogénesis (ELR-CXC), y se expresa en neutrófilos, monocitos, eosinófilos, células endoteliales y mastocitos [60]. CXCR2 en conjunto con sus ligandos CXCL1-CXCL8 inducen a la migración y angiogénesis [61].

6.2.2 MIF – CXCR4

El receptor CXCR4 se expresa en células hematopoyéticas y contribuye a la proliferación e invasión en tumores de CCR, mama, ovario y próstata [62]. Se ha reportado que por las vías ERK, JNK y JAK/STAT mediante su ligando denominado factor derivado de células estromales 1-alfa (SDF-1 α), regulan el crecimiento y migración celular [63]. CXCR4 ha sido considerado un biomarcador de mal pronóstico porque induce al comportamiento metastásico de las células [64].

6.2.3 MIF – CXCR7

CXCR7 se expresa en basófilos, monocitos, células dendríticas y linfocitos B/T y células endoteliales [65]. Los niveles de CXCR7 aumentan en presencia de las citocinas IL-1, IL-6, IL-17, TNF- α e HIF-1 α [66]. Diversos estudios han reportado que la expresión de CXCR7 activa las vías de señalización STAT3 y MAPK induciendo a la proliferación, crecimiento, migración, invasión celular en cánceres gástricos e inducción a la hipoxia [67].

7. MIF en la hipoxia

En el microambiente tumoral es un factor clave para favorecer al crecimiento y diseminación del tumor [68]. Está caracterizado por presentar altas concentraciones de ácidos grasos producidos por células tumorales, pH bajo y bajas concentraciones de oxígeno, lo cual favorece a la hipoxia [69].

El factor inducible por hipoxia (HIF-1 α), es un factor de transcripción que regula la homeostasis del oxígeno y la respuesta celular a la hipoxia [70]. La hipoxia altera el metabolismo de las células cancerígenas evitando la apoptosis e induce a la angiogénesis [71]. Al evitar la apoptosis, activa el factor de transcripción HIF-1 α que está implicado en la progresión tumoral, la proliferación, privación de la glucosa y la metástasis [68].

8. MIF en la angiogénesis

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos a partir de micro vasos existentes para favorecer el desarrollo de los tumores, la invasión y metástasis [72]. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), se ha relacionado directamente con una mayor angiogénesis debido a la proliferación acelerada de las células cancerígenas y un ambiente hipóxico [73]. Se ha reportado que MIF es capaz de promover la diferenciación de células endoteliales en vasos sanguíneos [74].

Justificación

En los últimos años, el cáncer se ha posicionado como una de las principales causas de muerte por enfermedad en todo el mundo. Dentro de los tipos de cáncer, el CCR ocupa el tercer lugar en incidencia y el segundo en mortalidad a nivel mundial. En México, el CCR se posiciona como la segunda causa de muerte para ambos sexos de todos los casos de cáncer, presentando una incidencia del 7.6% y mortalidad del 8.6%. El desarrollo de CCR se ha asociado a patologías inflamatorias, entre las que destacan las IBD, como la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn. Por otro lado, MIF, es una citocina proinflamatoria, sobre expresada en estas patologías. Con estos antecedentes, es posible que MIF pueda tener un papel promotor en el desarrollo del CAC. Sin embargo, su participación al favorecer la malignidad durante el proceso carcinogénico del CAC no está completamente entendida.

Hipótesis

La deficiencia de MIF disminuirá el desarrollo tumoral en un modelo murino de CAC.

Objetivo general

Determinar la participación de MIF durante el desarrollo tumoral de cáncer colorrectal asociado a colitis en un modelo murino.

Objetivos particulares

- Caracterizar el desarrollo del CAC en el inicio (33 días post-inducción –dpi-), desarrollo (54 dpi), y cronicidad del CAC (75 dpi).
- Evaluar las manifestaciones clínicas durante el desarrollo del CAC (peso corporal de ratones, alimento y consumo de agua, presencia o ausencia de diarrea o sangrado rectal).
- Analizar los cortes histológicos en del colon de ratones *Mif*^{-/-} y WT al final del modelo de inducción de CAC mediante la tinción con hematoxilina y eosina y azul alcian.
- Determinar la expresión de los receptores para MIF (CD74, CXCR2, CXCR4 y CXCR7) en las células epiteliales del tejido tumoral en el inicio, desarrollo y cronicidad del CAC.

Materiales y métodos

Organismos

Se utilizaron ratones macho de 8-12 semanas de edad de tipo silvestre (WT) y ratones genéticamente deficientes para la citocina MIF (*Mif*^{-/-}) de la cepa BALB/c. Los ratones se obtuvieron del bioterio de la FES-Iztacala (UNAM, México). Se mantuvieron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (NOM-062-Z00-1999, 2002) y por la “Guide for the care and use of laboratory animals” promulgada por The US National Institutes of Health. El proyecto fue aprobado por la comisión interna de ética, bajo la clave CE/FESI/032020/1354. Los ratones fueron mantenidos en cajas de policarbonato con encamado de material estéril en grupos de cinco individuos con libre acceso a agua y alimento. Los animales se mantuvieron en ciclos de 12:12-h luz/oscuridad con 50±10 % de humedad relativa a 22±1°C.

Genotipo

Se realizó el genotipo de los ratones mediante una obtención de 0.5 cm de la cola de cada uno de los ratones a verificar. Se colocó la muestra en tubos de 1.5 ml (Eppendorf), se añadieron 500 µl de buffer de lisis y 20 µl de proteinasa K (Invitrogen, 100 µg/µl) y se incubó toda la noche a 56 °C. Para comprobar la presencia o ausencia del gen *Mif* en los grupos de ratones WT y *Mif*^{-/-} se amplificaron los genes *Mif* y neomicina (*Neo*) mediante una PCR en el Thermo cycler (BIORAD) con el kit Taq DNA Polymerase (Ampliqon III) a una temperatura de alineación de 58°C (Anexo 1).

Electroforesis

Se realizó una separación de los productos obtenidos por la amplificación con PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % en amortiguador TBE 1x y 0.01 % de bromuro de etidio sobre un molde. A cada tubo de la reacción de PCR se le añadieron 4µl de buffer de carga blue juice; Después de mezclarlos, se tomaron 8 µl de la muestra y se cargaron en el gel a partir del segundo pozo, dejando el primer pozo libre para cargar 2 µl del marcador de peso molecular de 100 pb. El gel con las muestras se corrió a 100 v durante 45 min y fue revelado con el equipo Gel Doc EZ (Anexo 2).

Desarrollo del cáncer colorrectal asociado a colitis

Se indujo el CAC en el modelo murino por una inyección única de azoximetano (12.5mg/kg peso del ratón) vía intraperitoneal y tres ciclos de dextrán sulfato de sodio con un peso molecular de 40, 000 g/mol al 1.5% disuelto en agua bebible durante siete días. Posterior a cada ciclo de DSS al 1.5%, hubo periodo de dos semanas donde el agua bebible estaba libre de DSS (Figura 4). Se formaron cuatro grupos experimentales, dos inducidos con el modelo de CAC (WT y *Mif*^{-/-}) y dos controles (WT y *Mif*^{-/-}).

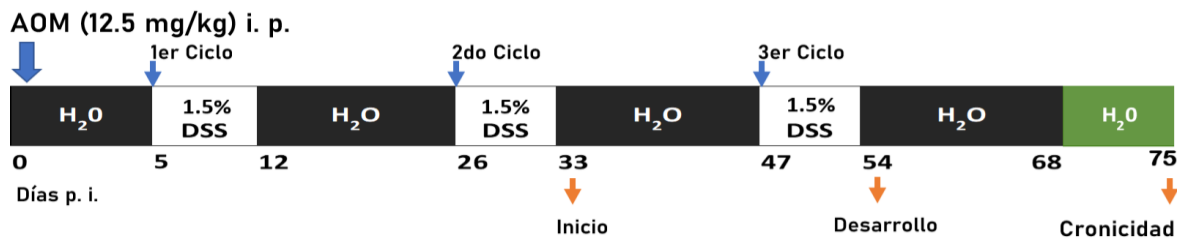


Figura 4. Esquema del modelo de cáncer colorrectal asociado a colitis.

Manifestaciones clínicas

Se monitoreó semanalmente (cada siete días), el peso de los ratones con ayuda de una balanza granataria con canastilla (OHAUS), y se evaluó el índice de daño de la enfermedad de acuerdo con la escala propuesta por Cooper [75] (Anexo 3).

Obtención de muestras del colon

Los ratones WT y *Mif*^{-/-} fueron sacrificados después del primer ciclo de DSS 1.5 % en la semana cinco (día 33 p.i), en la parte media del desarrollo semana ocho (día 54 p. i.) y en una etapa crónica del desarrollo del modelo en la semana once (día 75 p.i). Se realizó un lavado intestinal con PBS, una vez limpio el colon se obtuvo 0.5 cm de la parte distal para ser fijado, deshidratado e incluido en parafina. El resto del tejido se almacenó para su posterior procesamiento (Anexo 4).

Análisis histológico

A partir de los tejidos embebidos en parafina se realizaron cortes de 4 µm de grosor; los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) o rojo nuclear y azul alcian para su análisis. Posteriormente, se contó el número de células goblet (células caliciformes) presentes en 10 campos a 40X, y el resultado obtenido fue graficado (Anexo 5).

Hematoxilina y eosina/Azul alcian

Para observar la estructura de las criptas, grado de displasia e infiltración celular se utilizó la tinción H&E, en donde se tiñen de color rosa los componentes básicos y de morado los ácidos. Mientras que la tinción azul alcian tiñe las células caliciformes, las cuales son células epiteliales modificadas que tienen la función de secretar moco.

Disociación del tumor

El resto del colon obtenido fue disociado en una suspensión celular mediante el kit de disociación de tumores, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec) posteriormente, del pool celular se seleccionaron las células epiteliales (positivas a CD326+) mediante perlas magnéticas acopladas a anticuerpos, de acuerdo con el protocolo recomendado por el proveedor (Miltenyi Biotec) (Anexo 6).

Citometría de flujo

Las células, obtenidas del proceso de separación por perlas, fueron colocadas en un tubo eppendorf de 1 ml y centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. El botón obtenido de cada muestra fue re suspendido en 100 µl de la mezcla de anticuerpo-fluorocromo (Tabla 1) para la tinción celular donde se utilizó la concentración recomendada por fabricante para cada anticuerpo, Las muestras fueron incubadas por 30 minutos a 4°C, centrifugadas (1500 rpm por 10 minutos) y lavadas con solución FACS. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas y fijadas con paraformaldehído amortiguado al 4%. Se adquirieron al menos 10,000 eventos de cada muestra fueron en el citómetro de flujo NxT-Attune (TermoFisher).

La estrategia experimental para determinar las poblaciones celulares mediante la citometría de flujo comenzó con la selección de células individuales (singlets) y después células integras eliminando los restos celulares a través del tamaño y complejidad (cells) (Figura 5). A partir de las células CD326+ se identificaron los receptores de MIF (CD74, CXCR2, CXCR4 y CXCR7). Posteriormente se graficaron los porcentajes de cada grupo con relación a la población CD326+ (Anexo 7).

Tabla 1. Panel de anticuerpos utilizados para evaluación de receptores de MIF.

| Anticuerpo | Fluorocromo |
|-------------------|--------------------|
| CD326 | BV421 |
| CD74 | BV711 |
| CXCR2 | BV480 |
| CXCR4 | AF647 |
| CXCR7 | PE |

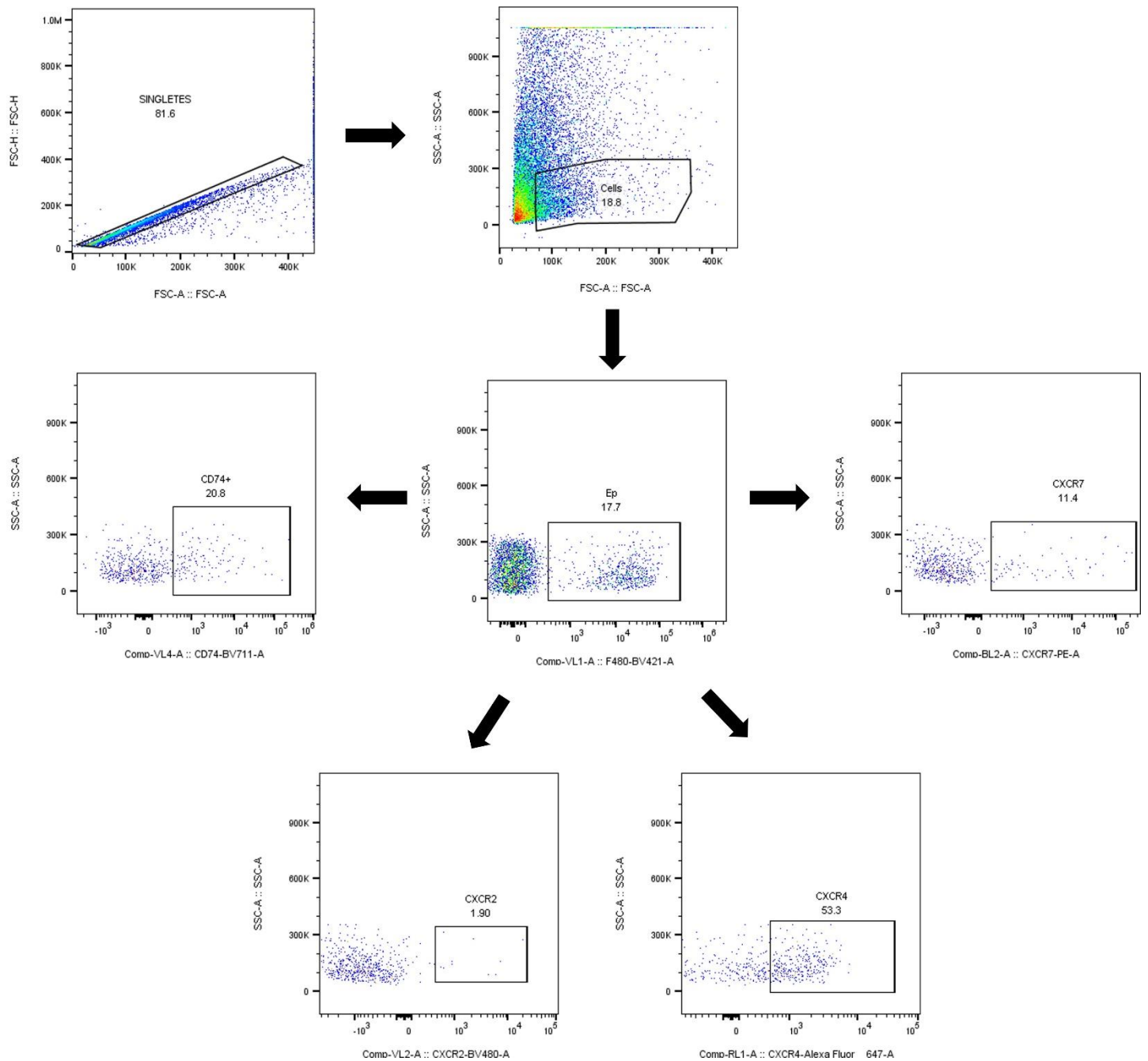


Figura 5. Estrategia de análisis para determinar las poblaciones celulares mediante citometría de flujo.

Resultados

Genotipo

Para verificar la pureza genética de los ratones se amplificaron los genes *Mif* y de *Neomicina* mediante PCR. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al **XX%(indica a que porcentaje)** (Figura 6). Los productos del amplificado para el gen *Mif* corresponde al fragmento de 200 pb en ratones WT, estando ausente en el amplificado de los ratones *Mif*^{-/-}. El producto amplificado para el gen *Neo* corresponde al fragmento de 500 pb únicamente en ratones *Mif*^{-/-}. Además, se utilizó un control negativo (sin muestra de DNA) para descartar contaminaciones en la técnica (C⁻). Todos los ratones empleados en los experimentos fueron homocigotos WT u homocigotos *Mif*^{-/-}.

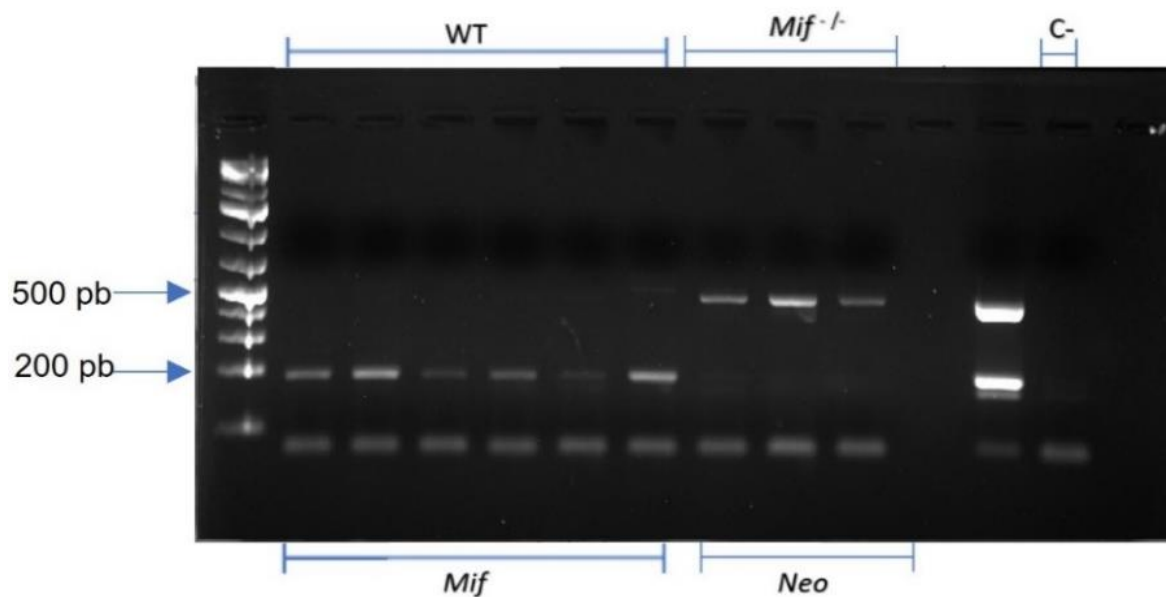


Figura 6. Gel de agarosa donde se observan los productos obtenidos de PCR en los genes *Mif* (200 pb) y *Neo* (500 pb).

MIF incrementa las manifestaciones clínicas de CAC sin afectar el peso ni el consumo de agua y alimento en ratones

Semanalmente, se monitoreó el consumo de agua, alimento, peso y las manifestaciones clínicas de los ratones inducidos con el modelo de CAC. En la evaluación del peso corporal, no se observó una variabilidad entre los cuatro grupos experimentales durante cada monitoreo. Se consideró como el 100% en la semana cero. Al final del modelo, el grupo que presentó el mayor porcentaje de peso ganado semanalmente fue WT CAC mientras que el grupo con menor porcentaje de peso ganado fue *Mif*^{-/-} CAC (Figura 7).

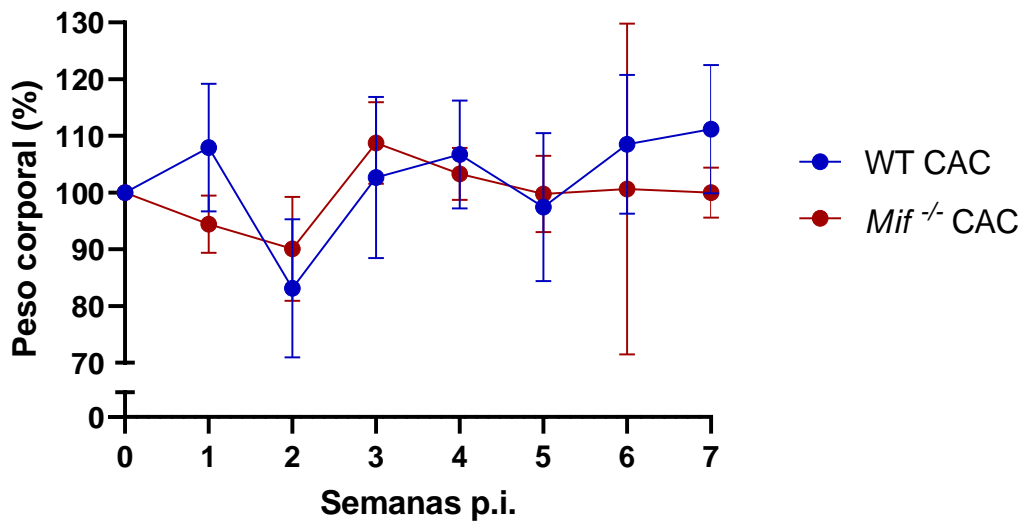


Figura 7. Gráfica de ganancia de peso semanalmente de los grupos con CAC WT y *Mif*^{-/-}.

No se observó una disparidad en el consumo de agua entre los grupos WT y *Mif*^{-/-} inducidos a CAC (Figura 8). El consumo de alimento entre los grupos no tuvo variabilidad (Figura 9).

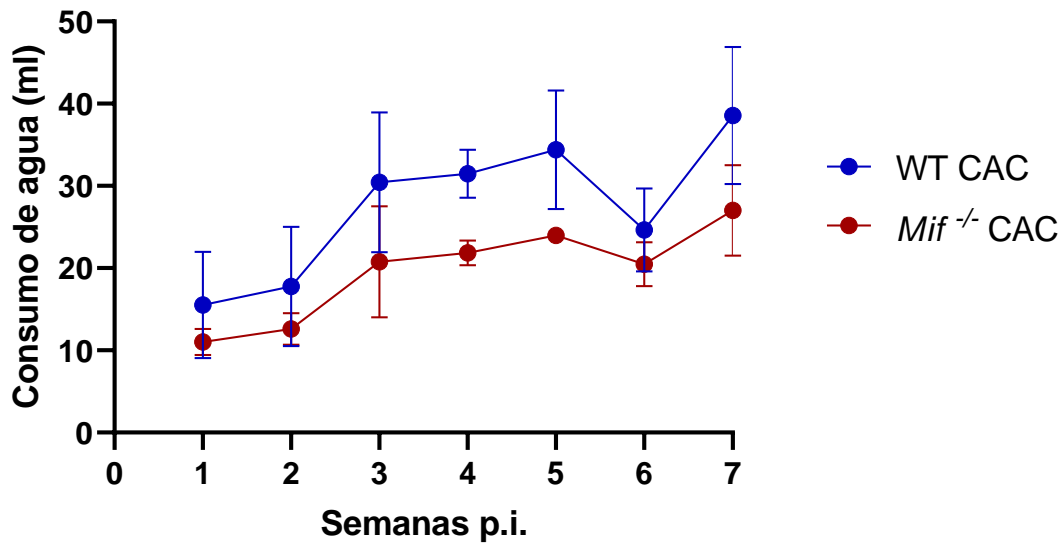


Figura 8. Consumo semanal de agua durante el desarrollo del modelo de CAC.

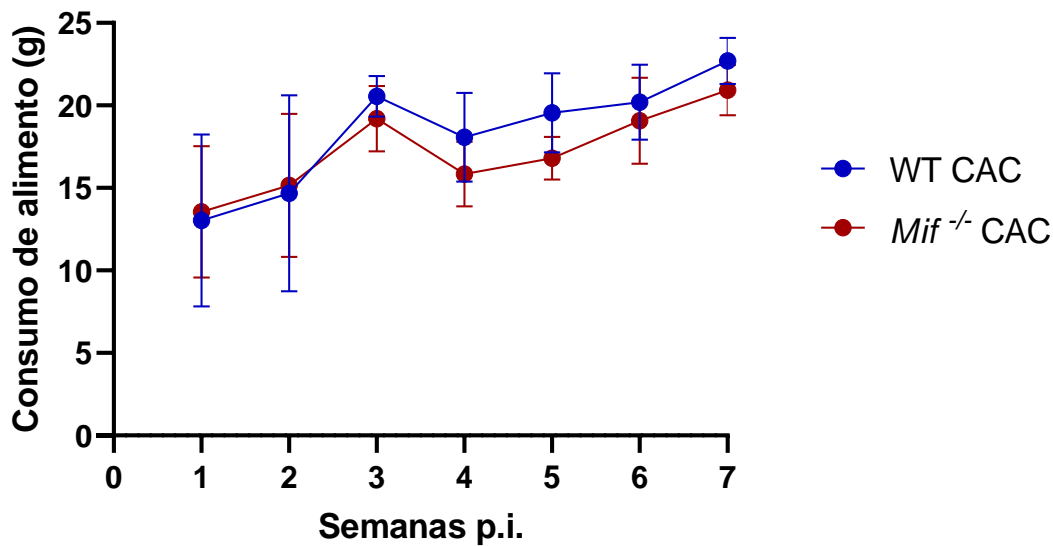


Figura 9. Consumo semanal de alimento durante el desarrollo del modelo de CAC.

Por otra parte, los grupos WT y *Mif*^{-/-} inducidos a CAC, al evaluar las manifestaciones clínicas de sangrado y diarrea en diferentes semanas posterior a la inducción de CAC presentaron sangrado rectal y/o diarrea a partir del fin del primer ciclo de DSS, el daño se mantuvo con el paso de las semanas y la administración de DSS (Figura 10).



Figura 10. Fotografías representativas de los ratones con CAC que muestran daño ocasionado por el desarrollo del CAC.

Al finalizar cada ciclo de DSS al 1.5% se evaluó el daño con una escala de valores 0, 2 y 4 siendo este último para un sangrado intenso y/o diarrea con ausencia de consistencia y forma de las heces. El grupo WT CAC presentó un mayor daño con respecto al grupo *Mif*^{-/-} CAC en la semana cinco (33 p.i.), y en la semana ocho (54 p.i.) (Figura 11).

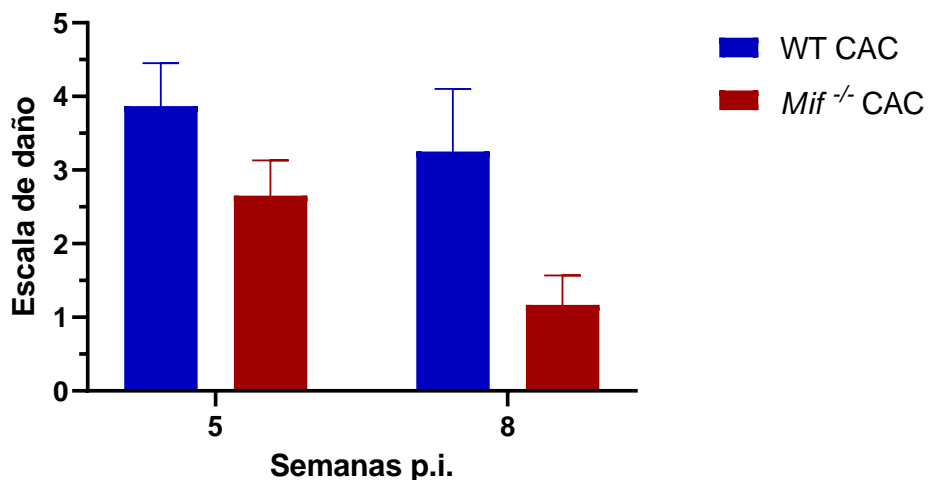


Figura 11. Manifestaciones clínicas. La diarrea y sangrado se monitoreó semanalmente de acuerdo con la escala propuesta por Cooper 1993. Las barras representan el promedio del puntaje obtenido de acuerdo con la escala utilizada, por cada individuo \pm SE. N=2

La presencia de MIF favorece el desarrollo tumoral en el colon

En las semanas cinco, ocho y once, se realizó la eutanasia de los ratones al azar. Se obtuvo el colon, el cual fue separado del ciego, se abrió longitudinalmente y se lavó con solución salina. En la figura 12 A, 12 B y 12 C se presentan las fotografías representativas de los colones en las semanas cinco, ocho y once respectivamente, en donde se observa una mayor longitud de los colones tanto de los ratones WT y *Mif*^{-/-} CTL en comparación a sus respectivos grupos con CAC. Sin embargo, en los ratones WT CAC se visualizó un ligero incremento en la longitud del colon en comparación a *Mif*^{-/-} CAC. En la figura 12 C se muestran los colones a la semana once en donde se observa la misma tendencia en la longitud de los colones que en las semanas cinco y ocho; sin embargo, los controles presentaron una longitud de colon muy parecida a los del grupo *Mif*^{-/-} CAC. Posteriormente, el tejido se colocó sobre una hoja milimétrica y se midió el largo del tejido con una vernier (Figura 13), donde fue posible observar que aumentó el tamaño del colon en los grupos a lo largo de la inducción de CAC; sin embargo, el colon del grupo WT CAC presentó una longitud ligeramente menor en comparación con el grupo *Mif*^{-/-} CAC.

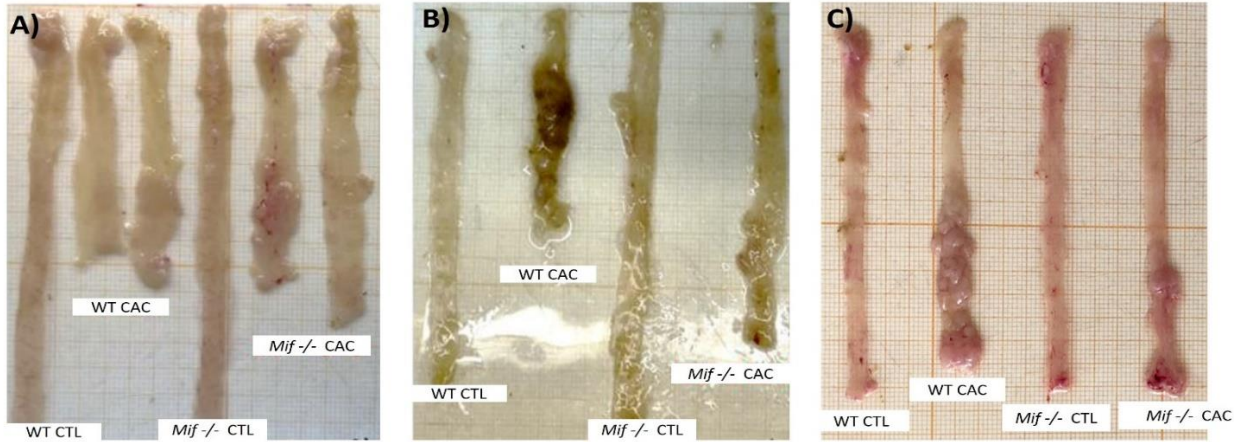


Figura 12. Desarrollo del CAC A) Semana cinco (33 d.p.i.) B) Semana ocho (54 d.p.i.) C) Semana once (75 d.p.i.). Tejido representativo de cada grupo experimental.

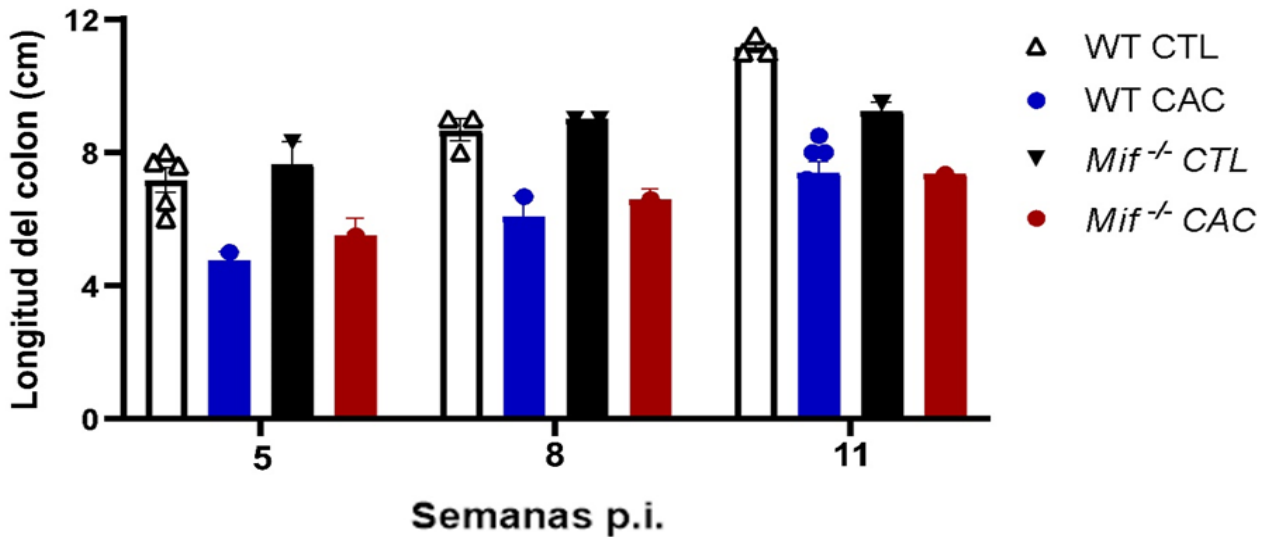


Figura 13. Longitud del colon a las cinco, ocho y once semanas. La longitud del tejido se midió con ayuda de una vernier. Las barras representan la media \pm SE. N=2.

Posteriormente, se realizó el conteo del número de tumores con ayuda de un microscopio estereoscópico y los datos obtenidos fueron graficados (Figura 14). El grupo WT CAC presentó mayor número de tumores a lo largo de las semanas, cantidad que fue aumentando en comparación con el grupo *Mif*^{-/-} CAC. Los grupos control no presentaron ningún tumor.

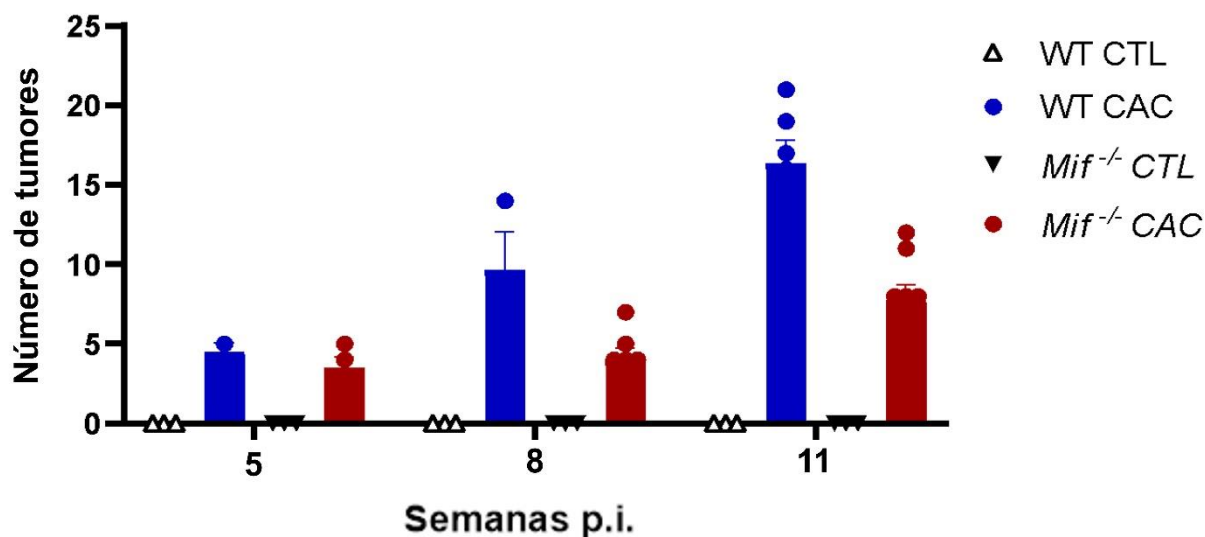


Figura 14. Número de tumores a las cinco (33 d.p.i), ocho (54 d.p.i) y once (75 d.p.i) semanas. Las barras representan la media \pm SE. N=2

La presencia de MIF evidenció un mayor daño en el colon

Los cortes obtenidos se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) (Figura 15) para distinguir entre núcleos y citoplasma celular, respectivamente, o con nuclear fast red para evidenciar el citoplasma y azul alcian para observar las células caliciformes). Los ratones de ambos grupos control mantuvieron de manera uniforme la estructura de las criptas y el grosor normal del tejido muscular. Por otro lado, los ratones WT CAC a la semana cinco presentaron pólipos, y a la semana ocho, se observan irregularidades en la estructura de las criptas, disminución en la producción de la mucosa lo cual produce un incremento de infiltrado inflamatorio y tumores. En el grupo WT CAC a semana cinco (Figura 15, WT 33 dpi), fue posible observar un aumento en el infiltrado inflamatorio hacia mucosa intestinal, con zonas donde se ha perdido la estructura y organización de las criptas intestinales; sin embargo, todavía fue posible observar regiones donde se conserva moderadamente la organización celular de forma similar a una cripta. En cambio, en la semana ocho en el grupo WT CAC se observó mayor cantidad de infiltrado inflamatorio en comparación con el control (Figura 15), donde el infiltrado se concentró hacia la luz intestinal; además, se observaron pocas estructuras similares a una cripta. Por el contrario, aunque en ambos tiempos los grupos *Mif*^{-/-} CAC mostraron mayor infiltrado inflamatorio, en comparación con su control, la organización celular y la forma de las criptas se conservó moderadamente incluso la semana ocho (Figura 15). Con respecto a las células caliciformes a las semanas cinco y ocho, los grupos WT CAC presentaron zonas con varias células caliciformes, pero en menor cantidad que el grupo control y nuevamente fue posible observar mayor infiltrado celular. Por otro lado, los grupos *Mif*^{-/-} CAC presentaron una mayor cantidad de células caliciformes en comparación con su respectivo control y el grupo WT CAC (Figura 16).

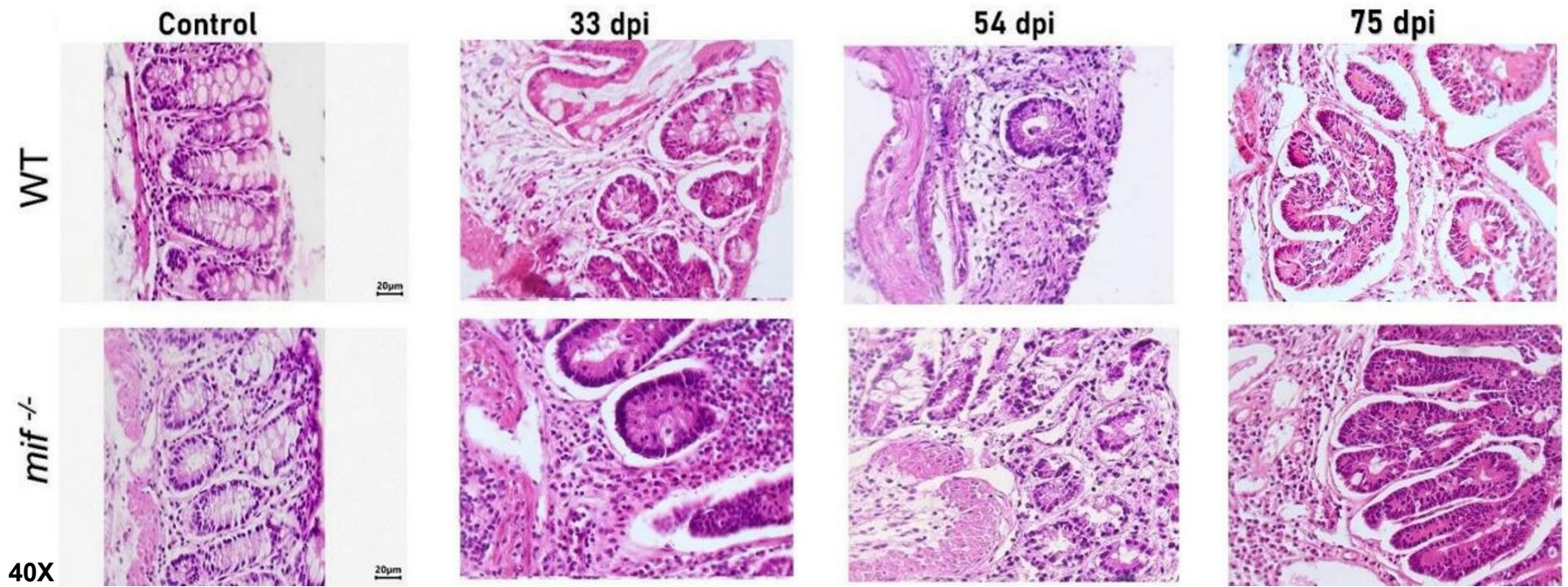


Figura 15. Imágenes representativas del colon en ratones control y CAC (WT y *Mif*^{-/-}). Tinción H&E en colon a la semana cinco (33 d.p.i), ocho (54 d.p.i), y once (75 d.p.i).

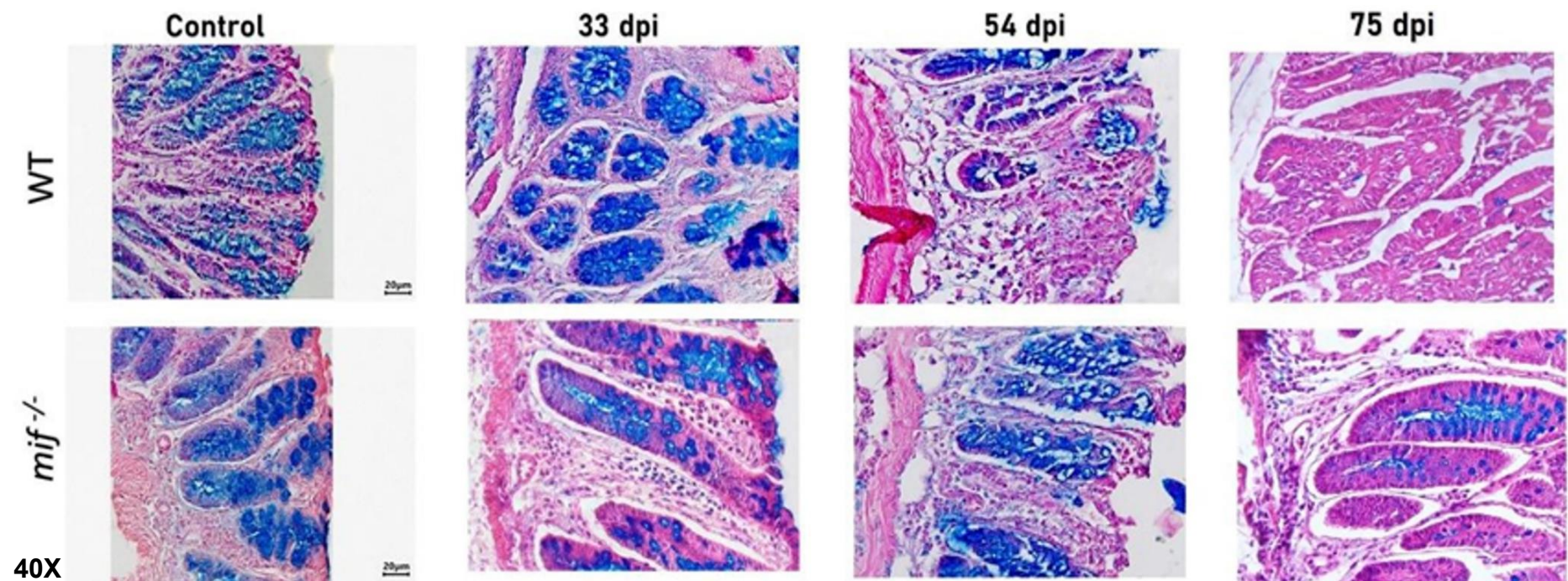


Figura 16. Imágenes representativas del colon en ratones control y CAC (WT y *Mif*^{-/-}). Tinción azul alcian en colon a la semana cinco (33 d.p.i), ocho (54 d.p.i), y once (75 d.p.i).

MIF modificó la expresión de CD74, CXCR7 y CXCR4 sin alterar CXCR2

El receptor con mayor tendencia a expresarse en el porcentaje de células de los cuatro grupos experimentales fue el CXCR4. En la semana cinco (33 d.p.i.), CXCR4 se expresó en alrededor del 80% de las células de los grupos *Mif*^{-/-} CAC, *Mif*^{-/-} CTL y WT CTL, pero este porcentaje disminuyó al 60% en WT CAC. En la semana ocho (54 d.p.i), el 100% de las células expresaron CXCR4 en los cuatro grupos experimentales. El receptor CD74 se expresó en poco más del 60% de las células WT CTL mientras que en el resto de los grupos un 20% de las células expresaron este receptor en la semana cinco. Sin embargo, el porcentaje de células con expresión de CD74 disminuyó en todos los grupos experimentales a la semana ocho (Figura 17). El receptor CXCR7 fue expresado alrededor del 30% de las células WT CTL y el 20% de WT CAC, mientras que, el 5% de *Mif*^{-/-} CTL y 15% de *Mif*^{-/-} CAC a la semana cinco. El porcentaje de células que expresaron CXCR7 fue variado entre los grupos a la semana ocho, el mayor porcentaje de células que expresaron este receptor fue en *Mif*^{-/-} CAC (50%), seguido en WT CTL (25%), en WT CAC (12%) y en *Mif*^{-/-} CTL (10%). Finalmente, el receptor CXCR2 fue expresado en un porcentaje mínimo de células en todos los grupos durante los dos periodos.

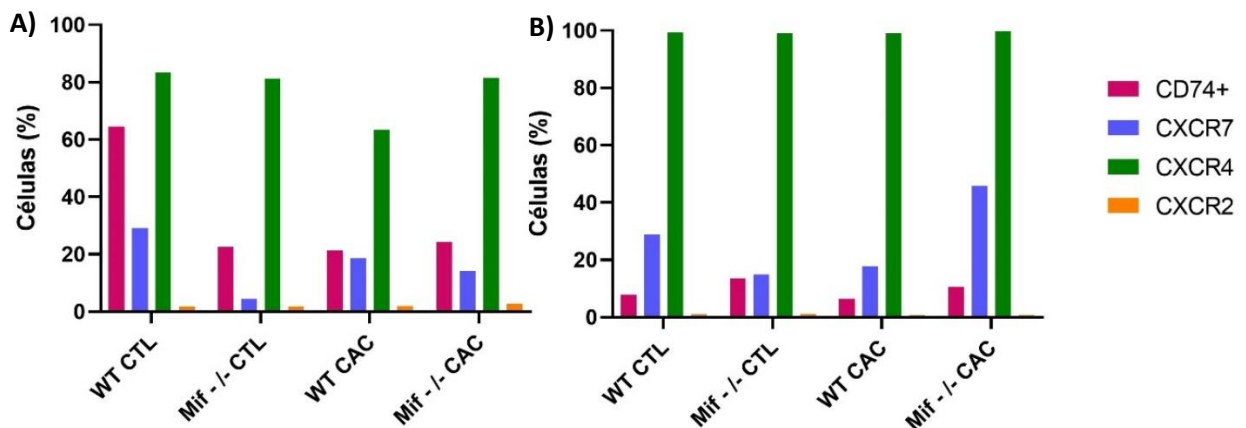


Figura 17. Porcentaje de células epiteliales que expresan los receptores de MIF. A) Semana cinco (33 d.p.i) B) Semana ocho (54 d.p.i).

Discusión

Las IBD son uno de los factores que aumentan las probabilidades del desarrollo del CAC, dentro del cual, la sobreexpresión de MIF se ha asociado con un mayor progreso de la enfermedad [42] al incrementar la angiogénesis, proliferación y migración celular en estudios *in vitro* [38]. Sin embargo, a pesar de estas evidencias, aún no se ha establecido de manera clara la participación de MIF en la patología del CAC.

Para ello, utilizamos un modelo químico de AOM/DSS donde el AOM (agente mutagénico) en combinación con el DSS (agente inflamatorio), que ha sido ampliamente utilizado por asemejar el desarrollo de la carcinogénesis humana a través de un proceso inflamatorio [76]. El modelo se basó en la administración de una dosis única de AOM vía intraperitoneal, el cual fue metabolizado en el hígado mediante el citocromo P450 (específicamente la isoforma CYP2E1) [77]. Este citocromo hidroxiliza el grupo metil del AOM y lo transforma en metilazoximetanol (MAM), el cual se disocia en paraformaldehído y especies reactivas alquilantes que viajan vía bilis hacia el intestino donde provocan una mutación en la base nitrogenada guanina ocasionado que se convierta en O6-Metilguanina u O4-metilguanina lo cual genera mutaciones de tipo *mismatch* en genes que regulan vías de señalización como K-Ras, β -catenina, APC, PI3/AKT, MAP-K y TGF- β [78, 79].

El DSS es un polisacárido sulfatado que ocasiona daños similares a la colitis ulcerosa en humanos a través de su citotoxicidad en el epitelio del colon [80]. Se propone que la inflamación generada sea debido al daño en la monocapa epitelial que recubre el colon, dando paso a la diseminación de agentes intestinales proinflamatorios [81].

Una vez inducido el CAC debido a la inflamación crónica generada en el colon, las manifestaciones clínicas durante el desarrollo del modelo fueron mayores en los ratones WT CAC que en *Mif*^{-/-} CAC posiblemente debido al daño persistente. Una de las consecuencias de las IBD como la colitis ulcerosa es la pérdida de la consistencia y la forma de las heces, y sangrado rectal debido a la mucosa del colon dañada [82]. Tomando en cuenta estos resultados, se esperaría encontrar los niveles modificados en el consumo de agua, de alimento y el peso corporal al comparar los grupos experimentales, sin embargo, no se observaron cambios [78, 83].

El daño generado por la inflamación crónica del CAC fue evidenciado por la alteración del tejido y la pérdida de las células de goblet, pues se ha reportado en modelos murinos que el uso de DSS altera la capa de moco y permite la entrada de patógenos causando daño a la estructura de las criptas y disminución en la cantidad de células goblet [84]. La inflamación crónica generada por el modelo AOM/DSS provocó más daño en el grupo WT CAC en la semana cinco y ocho, lo cual concuerda con los estudios reportados sobre que MIF promueve la producción de otras citocinas proinflamatorias generando un mayor daño en el tejido [42].

Además de la producción de citocinas, MIF se asocia con proliferación de células cancerígenas, pérdida de diferenciación celular, inhibición de la actividad apoptótica de p53, la hipoxia y la angiogénesis [85]. El grupo WT CAC presentó mayor número de tumores en ambos sacrificios. Estudios recientes documentaron que MIF puede desempeñar un rol en la carcinogénesis y metástasis colorrectal [38, 85].

El reclutamiento de células inmunes a la mucosa intestinal en condiciones inflamatorias es dirigido por quimiocinas en donde la expresión de sus receptores en las células del epitelio las convierte en participantes activos en la red de señalización de quimiocinas [86]. Entre estos receptores de quimiocinas se encuentran CXCR4, CXCR7 y CXCR2 que a su vez son receptores de MIF [87-89].

CD74 es un receptor poco detectable en el epitelio intestinal de ratón y humano cuando no se presenta inflamación [49]. Durante la semana cinco (33 d.p.i.) no se observó alteración en la estructura de las criptas a través de las histologías, sin embargo, podríamos decir que debido a la inflamación crónica que se generó por el consumo de DSS se presentaron altos porcentajes de células que expresan CD74 ya que se ha reportado que los niveles de CD74 aumentan en las células epiteliales neoplásicas gástricas en comparación a tejido sano. [90]. Un estudio reciente en cáncer de piel propuso que IFN- γ sirve como ligando de CD74, mejora su expresión, promueve la supervivencia y crecimiento del tumor al inhibir la apoptosis [53, 91].

Por otro lado, durante la semana ocho (54 d.p.i), la inflamación crónica ya está asentada tras los dos ciclos de DSS y podemos verlo reflejado en los valores otorgados por la escala de Cooper al presentar mayor sangrado y diarrea en comparación a la semana cinco. Concuerda con lo reportado recientemente sobre el rol de CD74 en forma soluble actúa como un receptor internándose en los compartimientos proteolíticos de MIF ocasionando una regulación en las acciones proinflamatorias [92]. Es decir, la regulación positiva de CD74 podría influir en la señalización mejorada de MIF a través de un aumento en la transcripción del factor de crecimiento endotelial vascular D (VEGF-D) [93]. Sin embargo, el porcentaje de CD74 es menor en WT que en *Mif*^{-/-}, posiblemente por la ocupación del receptor por el ligando MIF en la citometría de flujo.

Otro escenario puede ser que durante la semana de descanso entre el primer ciclo y el segundo ciclo de DSS, la estimulación de MIF/CD74 se activó fuertemente durante la respuesta inflamatoria a la lesión de la mucosa en las células epiteliales intestinales, aumentó la proliferación celular y el cierre de lesiones al activar las vías PI3K/Akt y ERK, que son vías que median la proliferación celular [51]. Debido a que CD74 puede activar diversos mecanismos para la restauración del revestimiento intestinal, el mantenimiento de la mucosa durante la inflamación, y protección al individuo [49].

Se ha propuesto en años recientes una terapia basada en MIF/CD74, sin embargo, no ha sido viable por el potencial de MIF para inducir a una inflamación crónica (excesiva), al unirse con sus receptores de quimiocinas CXCR2/4/7 [41].

Diversos estudios proponen que los niveles de CXCR2 incrementan debido al aumento en la migración celular y su relación con la inflamación crónica que puede derivar en cáncer [94]. Basándonos en este antecedente podemos afirmar que CXCR2 a través de sus ligandos suministran nutrientes, contribuyen a la angiogénesis e incrementan la capacidad de invasión [95].

Recientemente se han propuesto tratamientos antiinflamatorios o antitumorales a partir de la inhibición del eje CXCLs/CXCR2, sin embargo, esto no es viable porque es necesaria su activación para la cicatrización de heridas, tratar con infecciones y sepsis [96]. Los principales ligandos de CXCR2 son CXCL1 y CXCL8 y se han visto sobre expresados en el CCR [94].

Se han observado altos niveles de CXCL1 en pacientes con CCR con regulación a la baja de la proteína de matriz fibulina-1, promoviendo la proliferación de células tumorales y la angiogénesis [97]. Por otro lado, altos niveles de CXCL8 promueven la proliferación de células cancerígenas de colon y MET a través de la vía de señalización PI3K/Akt/NF- κ B [98].

Se ha documentado que CXCR2 recluta neutrófilos durante la inflamación crónica en el microambiente tumoral y se expresa en las células tumorales [96]. CXCR2 tiene una participación importante en la progresión tumoral en el cáncer de pulmón, próstata y gástrico [87]. Además, se ha reportado que la sobre expresión de CXCR2 señala un mal pronóstico, infiltración celular y metástasis [88]. Por otro lado, se ha documentado que CXCR2 es vital para el desarrollo de IBD, a través de la mediación de la migración de neutrófilos al sitio de inflamación [87].

La unión de CXCR2 con su ligando IL-8 (inducida por citocinas proinflamatorias), activa la vía Akt y MAPK quienes conducen a la expresión del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1 α) la cual promueve el crecimiento tumoral y la metástasis [87]. Además, se ha encontrado que IL-8 se eleva en la mucosa de pacientes con IBD [88]. Mediante la unión MIF/CXCR2 se activan las vías de señalización como PI3K, p38/ERK y JAK, que exacerban la supervivencia y migración celular promoviendo la metástasis [7].

Por otro lado, el porcentaje de CXCR4 se encuentra disminuido en los ratones WT durante la semana cinco (33 d.p.i), a diferencia de los otros tres grupos, quienes obtuvieron un porcentaje más alto, posiblemente porque el receptor está ocupado por MIF. Por otro lado, durante la semana ocho (54 d.p.i), el porcentaje de células que presentaban CXCR4 excedió el 98% lo cual concuerda con lo que se ha reportado de que CXCR4 está involucrado en la progresión tumoral, angiogénesis, metástasis y la supervivencia tumoral [99]. Se ha observado que CXCR4 aumenta su capacidad de migración *in vitro* y metástasis en órganos parenquimatosos *in vivo* [100, 101].

Estudios documentan que SDF-1 α (también conocido como CXCL12), se expresa en cánceres metastásicos y tumores primarios [58]. Además, está presente en la hematopoyesis, la inflamación y la angiogénesis por su participación en la migración

de células inmunes [102]. La unión CXCR4/SDF-1 α favorece la metástasis. La expresión de CXCR4 por células metastásicas atraen a una célula diana que secreta SDF-1 α , al recibir esta señal, las células metastásicas migran para diseminarse en otro órgano [100, 103].

Un estudio reciente reportó que los niveles de MIF y CXCR4 son elevados en líneas celulares de CCR [50]. MIF/CXCR4 *in vitro* puede promover el crecimiento tumoral, grado de malignidad, angiogénesis y metástasis [104].

Durante las semanas cinco y ocho, el porcentaje de células que expresaron CXCR7 fue menor en los grupos controles. Sin embargo, en la semana ocho (54 d.p.i) el grupo *Mif*^{-/-} CAC obtuvo el porcentaje más alto. Esto puede ser probablemente por su función como regulador y receptor Stavanger debido a que puede mediar la internalización de moléculas. Tras la unión con alguno de sus ligandos (CXCL11 o CXCL12), CXCR7 se internaliza, degrada el ligando y después el receptor regresa a la membrana celular [105].

Otro de los ligandos principales de CXCR7 es el interferón-inducible de células T alfa quimioatrayente (I-TAC/CXCL11), es expresado en páncreas, hígado, bazo y próstata. Se ha propuesto que CXCR7/CXCL11 está involucrado en el desarrollo de carcinomas [106]. Por otro lado, CXCL12 se induce por isquemia, hipoxia, inflamación, cáncer y enfermedades autoinmunes [89]. Al unirse con CXCR7 se activan las vías PI3K/Akt, JNK/p38 y MAPK promoviendo la quimiotaxis, proliferación y supervivencia celular [65].

Mientras que, el complejo MIF/CXCR7 promueve el crecimiento tumoral y metástasis [107]. Estudios recientes documentaron que CXCR7 es sobre expresado en el carcinoma del colon, asociándolo con el crecimiento tumoral [65]. Inhibir la unión de MIF a CXCR2/4/7 resulta en una disminución del comportamiento metastásico de células cancerosas [50].

Otra manera en la que MIF contribuye a la invasión de células neoplásicas y metástasis en el CCR es a través de la inducción a la metaloproteinasa 9 de la matriz (MMP-9), la cual se ha visto sobre expresada en el inicio, desarrollo y progresión de tumores en diversos cánceres [108].

Se ha reportado que MMP-9 y VEGF inducen a HIF-1 α a participar en el crecimiento, la invasión de tumores colorrectales y angiogénesis [39]. Estudios recientes proponen que la expresión de MIF favorece a la hipoxia [109]. Además, está directamente relacionada con los receptores de MIF descritos anteriormente. Se ha reportado que la expresión de CXCR2 se eleva en presencia de hipoxia, sin embargo, el efecto de la hipoxia en la expresión de CXCR2 puede depender del cáncer [87]. Por otro lado, se ha observado que la expresión de CXCR4 aumentó en ambiente hipóxico a diferencia de CXCR7 que se reportó en niveles independientes a la hipoxia [65].

Conclusión

Durante el desarrollo de CAC en un modelo murino, la presencia de MIF:

- Incrementó las manifestaciones clínicas de CAC.
- Impactó negativamente el crecimiento del colon y aumento el número de tumores.

Durante el desarrollo de CAC en un modelo murino, la ausencia de MIF:

- Provocó un menor daño en la estructura de las criptas, infiltrado celular y pérdida de células goblet.
- Disminuyó el porcentaje de células que expresan la expresión de CXCR7 y CXCR4; disminuyó CD74 y no se alteraron los niveles de CXCR2.

Perspectivas

- Observamos diferentes niveles de los receptores de quimiocinas en diferentes tiempos del modelo, por lo cual, sugerimos evaluar la capacidad de unión de MIF a más de uno de sus receptores a la vez por medio de inmunofluorescencia.
- El daño a las estructuras del colon y pérdida de células goblet fue evidente durante el desarrollo del modelo, sin embargo, la presencia de citocinas no fue evaluado, por lo cual, proponemos la cuantificación de la producción de citocinas proinflamatorias (MIF, TNF- α) y antiinflamatorias (IL-10) en suero y en tejido tumoral por medio de ELISAS en el inicio, desarrollo y cronicidad del CAC.
- Sugerimos evaluar la capacidad de invasión de las células epiteliales en el inicio, desarrollo y cronicidad del CAC por medio de invadopodios.

Referencias

1. Institute, N.C., *Cáncer*. 2021.
2. Tanaka, T., *Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies*. J Carcinog, 2009. **8**: p. 5.
3. Benedetti, I., Reyes, Niradiz.,, *Transición epitelial-mesenquimal en la progresión del adenocarcinoma*. IATREIA, 2015. **28**: p. 420-433.
4. Institute, N.C., *Metástasis*. 2020.
5. Sung, H., et al., *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(3): p. 209-249.
6. Society, A.C., *Colorectal cancer*. 2018.
7. Salla, M., et al., *Novel Biomarkers for Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer: An Interplay between Metabolic Dysregulation and Excessive Inflammation*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(6).
8. Kolligs, F.T., G. Bommer, and B. Goke, *Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis*. Digestion, 2002. **66**(3): p. 131-44.
9. Rubin, D.C., A. Shaker, and M.S. Levin, *Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 107.
10. Morgan Villela, G.S.U., A. M.; Sat Muñoz, D.,, *Factores de riesgo para cáncer colorrectal*. Gaceta Mexicana de Oncología, 2008. **7**(4): p. 79.
11. Valdés, J., Fuentes, A.,, *Enteritis regional*. Gaceta Médica Espirituana, 2001. **3**(2).
12. Salvo-Romero, E., et al., *Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas*. Rev Esp Enferm Dig, 2015. **107**(11): p. 686-696.
13. Ordas, I., et al., *Ulcerative colitis*. Lancet, 2012. **380**(9853): p. 1606-19.
14. Feuerstein, J.D. and A.S. Cheifetz, *Ulcerative colitis: epidemiology, diagnosis, and management*. Mayo Clin Proc, 2014. **89**(11): p. 1553-63.
15. Escudero, T., *Enfermedad Inflamatoria Intestinal y Cáncer Colorrectal*. 2018.
16. Tirado-Gómez, L.L.a.M.-B., A., *Epidemiología del cáncer de colon y recto*. Gaceta Mexicana de Oncología, 2008. **7**(4): p. 3-11.
17. Martin-de-Carpi, J., et al., *Increasing incidence of pediatric inflammatory bowel disease in Spain (1996-2009): the SPIRIT Registry*. Inflamm Bowel Dis, 2013. **19**(1): p. 73-80.
18. Grivennikov, S.I., *Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(2): p. 229-44.
19. O. Brostrom, R.L., B. Nordenvall, A. Ost, G. Hellers.,, *The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis*. Journal of Gastroenterology, 1987. **22**.
20. Rogler, G., *Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer*. Cancer Lett, 2014. **345**(2): p. 235-41.
21. Terzic, J., et al., *Inflammation and colon cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2101-2114 e5.
22. Choi, E.K. and H.D. Appelman, *Chronic Colitis in Biopsy Samples: Is It Inflammatory Bowel Disease or Something Else? Surg Pathol Clin*, 2017. **10**(4): p. 841-861.
23. Kim, K.J., et al., *Oligonol prevented the relapse of dextran sulfate sodium-ulcerative colitis through enhancing NRF2-mediated antioxidative defense mechanism*. J Physiol Pharmacol, 2018. **69**(3).
24. Guarner, F., *Microbiota intestinal y enfermedades inflamatorias del intestino*. Gastroenterol Hepatol, 2010. **34**: p. 147-154.

25. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
26. Deschoolmeester, V., et al., *Immune Cells in Colorectal Cancer: Prognostic Relevance and Role of MSI*. Cancer Microenviron, 2011. **4**(3): p. 377-92.
27. Erreni, M., A. Mantovani, and P. Allavena, *Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer*. Cancer Microenviron, 2011. **4**(2): p. 141-54.
28. Wen-Tao, M., et al., *El papel de los monocitos y macrófagos en las enfermedades autoinmunes: una revisión completa*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 1140.
29. Sica, A., et al., *Macrophage polarization in tumour progression*. Semin Cancer Biol, 2008. **18**(5): p. 349-55.
30. Sanchez-Zamora, Y.I., et al., *Altered Macrophage and Dendritic Cell Response in Mif^{-/-} Mice Reveals a Role of Mif for Inflammatory-Th1 Response in Type 1 Diabetes*. J Diabetes Res, 2016. **2016**: p. 7053963.
31. Gabrilovich, D.I., et al., *Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells*. J Immunol, 2001. **166**(9): p. 5398-406.
32. Ilarregui, J.M., et al., *INTEGRANDO EL UNIVERSO DE CELULAS REGULATORIAS EN EL CANCER*. Medicina, 2007. **67**(2): p. 25-31.
33. Huang, B., et al., *Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host*. Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 1123-31.
34. Roda-Navarro, P., and Fernández-Ruiz, E., *Células natural killer. Concepto. Mecanismos de activación. Capacidades funcionales. Mecanismos de citotoxicidad*. Medicine, 2005. **9**(33): p. 2174-2180.
35. Tabora, N.A., et al., *Las células natural killer y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1*. Inmunología, 2014. **33**(1): p. 11-20.
36. Guzmán-Flores, J.M.y.P.-P., D.P., *Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg)*. Gaceta Médica de México, 2013. **149**: p. 630-8.
37. L., K., *Cytokines, inflammation and colon cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2011. **11**(4): p. 451-64.
38. He, X.X., et al., *Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer*. Mol Med, 2009. **15**(1-2): p. 1-10.
39. Takahashi N, e.a., *Involvement of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in the Mechanism of Tumor Cell Growth*. Mol Med. , 1998. **4**: p. 707-714.
40. Lue, H., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease*. Microbes and Infection, 2002. **4**: p. 449-460.
41. Bernhagen, J., et al., *MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment*. Nat Med, 2007. **13**(5): p. 587-96.
42. Calandra, T. and T. Roger, *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 791-800.
43. Matías-García, I., et al., *El factor inhibidor de la migración de macrófagos y su relación con la obesidad y la diabetes*. Invest. clín, 2014. **55**: p. 266-277.
44. Commetta, A., et al., *Vancomycin versus placebo for treating persistent fever in patients with neutropenic cancer receiving piperacillin-tazobactam monotherapy*. Clinical Infection Diseases, 2003. **37**: p. 382-9.
45. Hudson JD, S.M., Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH., *A Proinflammatory Cytokine Inhibits p53 Tumor*. Exp. J. Medicina., 1999. **190**.

46. Mitchell RA, L.H., Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53 Regulatory role in the innate immune response*. *proc. nacional Academia ciencia EE.UU.*, 2002. **99**: p. 345–350.
47. Roa S, J.C., et al., *Mutación del gen p53 en el cáncer de colon y recto*. *Revista médica de Chile*, 2000. **128**(9).
48. Tapia-Jurado, J., et al., *Bases moleculares de la sepsis*. *Rev Med Hosp Gen Méx*, 2013. **76**(2).
49. Farr, L., S. Ghosh, and S. Moonah, *Role of MIF Cytokine/CD74 Receptor Pathway in Protecting Against Injury and Promoting Repair*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 1273.
50. Shin, H.N., H.H. Moon, and J.L. Ku, *Stromal cell-derived factor-1alpha and macrophage migration-inhibitory factor induce metastatic behavior in CXCR4-expressing colon cancer cells*. *Int J Mol Med*, 2012. **30**(6): p. 1537-43.
51. Starlets, D., et al., *Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival*. *Blood*, 2006. **107**(12): p. 4807-16.
52. Leng, L., et al., *MIF signal transduction initiated by binding to CD74*. *J Exp Med*, 2003. **197**(11): p. 1467-76.
53. Tanese, K., et al., *Cell Surface CD74-MIF Interactions Drive Melanoma Survival in Response to Interferon-gamma*. *J Invest Dermatol*, 2015. **135**(11): p. 2775-2784.
54. Benedek, G., et al., *Partial MHC class II constructs inhibit MIF/CD74 binding and downstream effects*. *Eur J Immunol*, 2013. **43**(5): p. 1309-21.
55. Shi, X., et al., *CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex*. *Immunity*, 2006. **25**(4): p. 595-606.
56. Gore, Y., et al., *Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(5): p. 2784-92.
57. Schwartz, V., et al., *A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(17): p. 2749-57.
58. Wang, J., R. Loberg, and R.S. Taichman, *The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis*. *Cancer Metastasis Rev*, 2006. **25**(4): p. 573-87.
59. Mollica Poeta, V., et al., *Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy*. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 379.
60. Y. Le , Y.Z., P. Iribarren , J. Wang, *Chemokines and Chemokine Receptors Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease Cellular & Molecular Immunology*, 2004. **1**(2): p. 95-104.
61. Ahuja, S.K. and P.M. Murphy, *The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRObeta, GROgamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(34): p. 20545-50.
62. O'Hayre, M., et al., *Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment*. *Biochem J*, 2008. **409**(3): p. 635-49.
63. Busillo, J.M. and J.L. Benovic, *Regulation of CXCR4 signaling*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(4): p. 952-63.
64. Kim, J., et al., *Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(12): p. 2744-53.
65. Kollmar, O., et al., *CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1*. *Int J Cancer*, 2010. **126**(6): p. 1302-15.
66. Monteagudo, C., et al., *[Role of chemokines in melanoma progression]*. *Actas Dermosifiliogr*, 2011. **102**(7): p. 498-504.

67. Doring, Y., et al., *The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 212.
68. Fraga, F., Ribeiro, R., y Medeiros, R, *Hipoxia tumoral. Papel del factor inducible por hipoxia*. Actas Urol Esp, 2009. **33(9)**: p. 941-951.
69. Sanz, J.M., A.M.G. Lahoz, and A. Silva, *El sistema inmune y el microambiente tumoral: componentes y función*. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, 2021. **13(33)**: p. 1932-1941.
70. Semenza, G.L., *HIF-1 and human disease: one highly involved factor*. Genes & Development, 2000. **14(16)**: p. 1983-1991.
71. Arvelo, F.y.C., C., *Hipoxia en la malignidad del cáncer*. Investigación Clínica, 2009. **50(4)**: p. 529-546.
72. Sánchez-Socarrás, V., *Papel de la angiogénesis en el crecimiento tumoral*. Rev Cubana Invest Biomed, 2001. **20(3)**: p. 223-30.
73. González, R., et al., *Factor de crecimiento de endotelio vascular y su relación clínica en carcinomas papilares de tiroides con invasión extracapsular*. 42(4), 2009: p. 279-285.
74. Chesney, J., et al., *An Essential Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Angiogenesis and the Growth of a Murine Lymphoma*. Molecular Medicine, 1999. **5**: p. 181-191.
75. Cooper, H.S.M., S.; Kido, K.; Yoshitake, H.; Flanigan, A., *Dysplasia and cancer in the dextran sulfate sodium mouse colitis model. Relevance to colitis-associated neoplasia in the human: a study of histopathology, B-catenin and p53 expression and the role of inflammation*. Carcinogenesis, 2000. **21(4)**: p. 757-768.
76. Meira, L.B., et al., *DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice*. J Clin Invest, 2008. **118(7)**: p. 2516-25.
77. Huang, J., et al., *APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **256(5057)**: p. 9049-9054.
78. Fazio, V.R., MariangelaDe; Massi, Emanuela; Poeta, MariaLuana; Carotti, Simone; Morini, Sergio; Cecchetelli, Loredana; Signori, Emanuela *The AOMDSS murine model for the study of colon carcinogenesis From pathways to diagnosis and therapy studies*. Journal of Carcinogenesis, 2011. **10(9)**: p. 1:22.
79. Su, L.-K., et al, *Multiple Intestinal Neoplasia Caused by a Mutation in the Murine Homolog of the APC Gene*. Science, 1992. **256(5057)**: p. 668-670.
80. Okayasu, I., et al., *A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice*. Gastroenterology, 1990. **98(3)**: p. 694-702.
81. Chassaing, B., et al., *Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice*. Curr Protoc Immunol, 2014. **104**: p. 15 25 1-15 25 14.
82. Bermejo, F., I. Guerra, and A. López-Sanromán, *Colitis ulcerosa*. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, 2012. **11(5)**: p. 266-274.
83. Fuentes, M., Mendoza, R., Rosales, A., y Cisneros, R., *GUÍA DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO: RATÓN*. MINISTERIO DE SALUD INSTITUTO NACIONAL DE SALUD, 2008.
84. Ridel, E., Ascolani, J., Viale, S., Romero, N., Favant, J. L., & Martinez Marignac, V. L. , *Ensayo terapéutico preclínico de Cloroquina y 5-FU en el tratamiento de cáncer colorrectal*. Ciencia, Docencia Y Tecnología Suplemento, 2019. **9(9)**: p. 399-413.
85. Shun Chia-Tung, J.-T.L., Shih-Pei Huang, Min-Tsan Lin, Ming-Shiang Wu, *Expression of macrophage migration inhibitory factor is associated*

with enhanced angiogenesis and advanced stage in gastric carcinomas. World Journal of Gastroenterology, 2005. **11(24)**: p. 3767-3771.

86. Chatterjee, M., D. Rath, and M. Gawaz, *Role of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 for platelet function*. *Biochem Soc Trans*, 2015. **43**(4): p. 720-6.
87. Saintigny, P., et al., *CXCR2 Expression in Tumor Cells Is a Poor Prognostic Factor and Promotes Invasion and Metastasis in Lung Adenocarcinoma*. *Cancer Research*, 2013. **73**(2): p. 571-582.
88. Acosta, J.C., et al., *Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence*. *Cell*, 2008. **133**(6): p. 1006-18.
89. Tarnowski, M., et al., *CXCR7: a new SDF-1-binding receptor in contrast to normal CD34(+) progenitors is functional and is expressed at higher level in human malignant hematopoietic cells*. *Eur J Haematol*, 2010. **85**(6): p. 472-83.
90. Cuthbert, R.J., et al., *Differential CD74 (major histocompatibility complex Class II invariant chain) expression in mouse and human intestinal adenomas*. *Eur J Cancer*, 2009. **45**(9): p. 1654-63.
91. Meyskens, F.L.K., K. J.; Taylor, C. W.; Noyes, R. D.; Tuthill, R. J.; Hersh, E. M.; Feun, L. G.; Doroshow, J. H.; Flaherty, L. E.; Sondak, V. K. , *Randomized Trial of Adjuvant Human Interferon Gamm Versus Observation in High-Risk Cutaneous Melanoma a Southwest Oncology Group Study*. *Journal of the National Cancer Institute* 1995. **87**(22): p. 1710–1713.
92. Heinrichs, D., et al., *Protective role of macrophage migration inhibitory factor in nonalcoholic steatohepatitis*. *FASEB J*, 2014. **28**(12): p. 5136-47.
93. Liu, Y.-H., et al., *Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor-D Expression in Clear Cell Renal Cell Carcinoma by CD74: A Critical Role in Cancer Cell Tumorigenesis*. *The Journal of Immunology*, 2008. **181**(9): p. 6584-6594.
94. Liu, Q., et al., *The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2016. **31**: p. 61-71.
95. Koch AE, P.P., Kunkel SL, et al., *Interleukin-8 as a Macrophage-Derived Mediator of Angiogenesis*. *Science*, 1992. **258**(5089): p. 1-9.
96. Cheng, Y., et al., *Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases*. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019. **1871**(2): p. 289-312.
97. le Rolle, A.F., et al., *The prognostic significance of CXCL1 hypersecretion by human colorectal cancer epithelia and myofibroblasts*. *J Transl Med*, 2015. **13**: p. 199.
98. Wang, G., et al., *Targeting YAP-Dependent MDSC Infiltration Impairs Tumor Progression*. *Cancer Discovery*, 2016. **6**(1): p. 80-95.
99. Balkwill, F., *Cancer and the chemokine network*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(7): p. 540-50.
100. Yoshitake, N., et al., *Expression of SDF-1 alpha and nuclear CXCR4 predicts lymph node metastasis in colorectal cancer*. *Br J Cancer*, 2008. **98**(10): p. 1682-9.
101. Kang, Y., et al., *A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone*. *Cancer Cell*, 2003. **3**(6): p. 537-49.
102. Janssens, R., S. Struyf, and P. Proost, *The unique structural and functional features of CXCL12*. *Cell Mol Immunol*, 2018. **15**(4): p. 299-311.
103. Gout, S. and J. Huot, *Role of cancer microenvironment in metastasis: focus on colon cancer*. *Cancer Microenviron*, 2008. **1**(1): p. 69-83.
104. Dessein, A.F., et al., *Autocrine induction of invasive and metastatic phenotypes by the MIF-CXCR4 axis in drug-resistant human colon cancer cells*. *Cancer Res*, 2010. **70**(11): p. 4644-54.
105. Naumann, U., et al., *CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11*. *PLoS One*, 2010. **5**(2): p. e9175.

106. Luker, K.E., et al., *Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands*. *Oncogene*, 2010. **29**(32): p. 4599-610.
107. Zabel, B., et al., *The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells*. *Mol Cancer*, 2011. **10**.
108. Li Z, e.a., *Macrophage migration inhibitory factor enhances neoplastic cell invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinase 9 and interleukin-8 in nasopharyngeal carcinoma cell lines*. *Mentón Med. J.* , 2004. **117**: p. 107-114.
109. Ortiz-García, Y.M., García-Iglesias, T., Hernández-Hernández, A., Morales-Velázquez, G., Cervantes-Cabrera, J.J. y Zamora-Pérez, A.L., *Factor inhibidor de la migración de macrófagos en la enfermedad periodontal*. *Revista Mexicana de Periodontología*, 2017. **1-2**: p. 14-19.

Anexo Técnico

Anexo 1. Genotipo

Aislamiento de DNA Utilizando material estéril y libre de RNAsas y DNAsas:

1. Obtener aproximadamente 0.5 cm de la parte distal de la cola de cada uno de los ratones experimentales.
2. Colocar las colas en tubos eppendorf de 1.5 ml previamente rotulados.
3. Agregar 500 μ l de búfer de lisis y 20 μ l de proteinasa K (INVITROGEN 100 μ g/ μ l) e incubar toda la noche a 56°C para llevar a cabo la digestión del tejido.
4. Centrifugar los tubos a 14000 rpm durante 10 min, recuperar el sobrenadante en tubos eppendorf con 500 μ l de isopropanol frío.
5. Invertir los tubos suavemente hasta hacer evidente la precipitación del DNA (con apariencia de hebras blancas).
6. Centrifugar los tubos a 14000 rpm por 5 min, decantar el sobrenadante y lavar la pastilla de DNA con 500 μ l de etanol frío al 75% en el mismo tubo.
7. Re suspender la pastilla y centrifugar nuevamente a 14000 rpm durante 5 min.
8. Desechar el sobrenadante y dejar evaporar el etanol de los tubos a temperatura ambiente sobre una Servitoalla previamente radiada con luz UV durante 120 min.
9. Re suspender la pastilla en 200 μ l de H₂O DEPC (SIGMA).

Búfer de lisis para obtención de DNA (500 ml)

| Reactivo | Volumen |
|------------------------------|---------|
| Tris HCl 1 M; pH 8.5 (Sigma) | 50 ml |
| EDTA 0.5 M (J. T. Baker) | 5 ml |
| SDS 20 % (J. T. Baker) | 5 ml |
| NaCl 1 M (J. T. Baker) | 100 ml |

Mezclar las soluciones y aforar a 500 ml con agua destilada.

TBE (10 L)

| Reactivo | Volumen |
|--------------|---------|
| Tris Base | 108 g |
| Ácido Bórico | 55 g |
| EDTA* | 40 ml |

EDTA*

| Reactivo | Volumen |
|------------------|---------|
| EDTA | 18.61 g |
| H ₂ O | 100 ml |

Amplificación de los genes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

1. En tubos, libres de DNAsas y RNAsas de 0.2 ml se lleva a cabo la reacción con un volumen final de 25 µl colocando los reactivos del kit AmpliqonIII Taq DNA Polymerase para amplificar los genes MIF y NEO en el siguiente orden:

| Componente por reacción | Por muestra |
|-------------------------|-------------|
| Búfer 10X | 12.5 µl |
| Primer F <i>Mif</i> | 1 µl |
| Primer R <i>Mif</i> | 1 µl |
| Primer F <i>Neo</i> | 1 µl |

| | |
|---------------------|-------------|
| Primer R <i>Neo</i> | 1 μ l |
| Templado de DNA | 2 μ l |
| Agua destilada | 6.5 μ l |

Los primers específicos utilizados para cada gen fueron los siguientes:

mif-F: 5'-AGA CCA CGT TAG CTG AG-3'

mif-R 3'-GCA TCG CTA CCG GTG GAT AA-5'

neo-F 5'-ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC-3'

neo-R 3'-CGT CCA GAT CAT CCT GAT C-5'

Una vez listos los tubos se colocan en el termociclador (BIOEXP CYCLE) y se programa de la siguiente manera:

| Paso del ciclo | Minutos y grados °C por ciclo | No. de ciclos |
|---------------------------|-------------------------------|---------------|
| Desnaturalización inicial | 95°C por 10 min | 1 |
| Desnaturalización | 94° por 34 seg | 39 |
| Alineación | Varía por 35 seg | |
| Extensión | 72° C por 35 seg | |
| Extensión final | 72° C por 4 min | 1 |
| Enfriamiento | 4° por 10 min | 1 |

Anexo 2. Electroforesis

TBE

| Reactivo | Cantidad |
|----------|--------------|
| TBE | 50 ml |
| Agarosa | 0.75 g |
| BrEt | 3.33 μ m |

1. 50 ml de TBE en un vaso de precipitado.
2. Pesar 0.5 g de agarosa.
3. Mezclar con el TBE la agarosa en un matraz.
4. Calentar por 2 rondas de 30 segundos en un horno hasta que la mezcla esté cristalina.
5. Preparar la base donde se verterá la mezcla.
6. Una vez vertida la mezcla se le pondrá un temporizador de 40 minutos hasta que el gel esté solidificado.

Anexo 3. Manifestaciones clínicas - Escala de daño propuesta por Cooper

| Índice de la actividad de la enfermedad (DAI) | | |
|--|--|----------------------|
| Pérdida de peso | Diarrea | Sangrado |
| 0 no hay perdida | 0 Sin diarrea | 0 Sin sangrado |
| 1 Pérdida de peso entre 1-5% | 2 Pérdida de consistencia, pero no de la forma | 2 Sangrado ligero |
| 2 Pérdida de peso entre 6-10% | 4 Pérdida de consistencia y de forma | 4 Sangrado abundante |
| 3 Pérdida de peso entre el 10-15% | | |
| 4 Pérdida de peso mayor al 15% | | |

Anexo 4. Obtención de muestras de colon

PBS

| Reactivo | Cantidad |
|---|----------|
| NaCl (J.T. Baker) | 80 g |
| NaH ₂ PO ₄ (J.T. Baker) | 11.6 g |
| KH ₂ PO ₄ (J.T. Baker) | 2 g |
| KCl (J.T. Baker) | 2 g |

Mezclar los reactivos y aforar a 10 litros con agua destilada.

Tren de deshidratación e inclusión de tejido

| Reactivo | Tiempo |
|------------|--------|
| Etanol 50% | 30 min |
| Etanol 60% | 20 min |
| Etanol 70% | 20 min |
| Etanol 80% | 20 min |
| Etanol 85% | 20 min |
| Etanol 90% | 20 min |
| Etanol 96% | 20 min |

| | |
|------------------------|----------|
| Etanol 100% I | 20 min |
| Etanol 100% II | 20 min |
| Alcohol amílico I | 20 min |
| Alcohol amílico II | 20 min |
| Parafina I | 24 horas |
| Parafina II | 24 horas |
| Inclusión en Paraplast | |

Anexo 5. Análisis histológico

Hidratación de tejidos

La hidratación de tejidos se hace a todas las laminillas antes de cada tinción.

| Reactivo | Tiempo |
|------------------|---------------|
| Xilol (I) | 5 min |
| Xilol (II) | 5 min |
| OH Xilol | 10 baños |
| Alcohol absoluto | 10 baños |
| Oh 96% | 10 baños |
| Agua corriente | 1 baño |

Tinción H&E

| Reactivo | Tiempo |
|---------------------|---------------|
| Hematoxilina | 5 min |
| Agua corriente | 5 baños |
| Agua amoniacal 0.2% | 1 baño |
| OH 96% | 1 baño |
| Eosina | 7 baños |
| OH 96% | 10 baños |
| OH 96% | 10 baños |

| | |
|--|----------|
| Alcohol absoluto | 10 baños |
| OH Xilol | 10 baños |
| Xilol (dejar en Xilol hasta montar con entellán) | |

Tinción Azul Alcían

| Reactivo | Tiempo |
|--|---------------|
| Azul Alcían | 15 min |
| Agua destilada | 2 min |
| Neutral fast red | 1 min |
| OH 96% | 5 baños |
| OH Absoluto | 10 baños |
| OH Xilol | 10 baños |
| Xilol (dejar en Xilol hasta montar con entellán) | |

Anexo 6. Disociación del tumor

Kit de disociación de tumores (Miltenyi Biotec)

Preparación de reactivos

1. Preparar la Enzima D mediante la reconstitución del polvo liofilizado en cada vial con 3 mL de RPMI 1640 o DMEM.
2. Preparar alícuotas del volumen adecuado para evitar ciclos repetidos de congelación y descongelación.
3. Preparar la Enzima R mediante la reconstitución del polvo liofilizado en el vial con 2.7 ml de RPMI 1640 o DMEM.
4. Preparar la Enzima A mediante la reconstitución del polvo liofilizado en el vial con 1 ml de búfer A suministrado con el kit.

Preparación de muestras

5. Preparar la mezcla de enzimas agregando 2.35 ml de RPMI 1640 o DMEM, 100 µl de enzima D, 50 µl de enzima R y 12.5 µl de enzima A en un tubo gentleMACS C.
6. Retirar las áreas grasas, fibrosas y necróticas de la muestra del tumor.
7. Cortar el tumor en pequeños trozos de 2–4 mm.
8. Transferir el tejido al tubo gentleMACS C que contiene la mezcla de enzimas.
9. Cerrar bien el tubo C y colóquelo boca abajo en el mecanismo del disociador gentleMACS.

Disociación con el gentleMACS

10. Iniciar el disociador de tumores blandos ejecutando el programa m_impTumor_02.
11. Al finalizar, separar el tubo C del disociador.
12. Incubar la muestra durante 40 minutos a 37°C en rotación continua.
13. Repetir del paso 8 al 10.
14. Re suspender la muestra y aplicar la suspensión celular a un MACS SmartStrainer (30 µm o 70 µm) colocado en un tubo de 15 mL.
15. Lave la celda MACS SmartStrainer (30 µm o 70 µm) con 10 mL de RPMI 1640 o DMEM.
16. Centrifugar la suspensión celular a 300 xg durante 7 minutos.
17. Aspirar el sobrenadante por completo.

Anexo 7. Citometría de flujo

Separación de CD326 mediante microperlas (Miltenyi Biotec)

Preparación de muestras

1. Volver a suspender el sedimento celular en 300 μ L de búfer por 5×10^7 células totales.
2. Agregar 100 μ L de reactivo de bloqueo de FcR por 5×10^7 células totales y mezcle bien.
3. Agregar 100 μ L de CD326 (EpCAM) MicroBeads por 5×10^7 células totales.
4. Mezclar bien e incubar durante 30 minutos en el frigorífico (2–8 °C).
5. Lavar las células agregando 5-10 ml de búfer por cada 5×10^7 células y centrifugue a 300xg durante 10 minutos.
6. Aspirar el sobrenadante por completo.
7. Re suspender hasta 10^8 células en 500 μ L de búfer.

Separación magnética

8. Coloque la columna MS en el campo magnético de un separador MACS adecuado.
9. Preparar la columna enjuagando con 500 μ L de búfer.
10. Aplicar la suspensión celular a la columna.
11. Recoger el flujo continuo que contiene células no etiquetadas.
12. Lavar la columna con la cantidad adecuada de búfer.
13. Recoger las células sin etiquetar que pasan y se combinan con el flujo del paso 3 (MS: 4x500 μ L).
14. Retirar la columna del separador y colocarla en un tubo de recolección etiquetado.
15. Pipetear 1ml de búfer en la columna.
16. Enjuagar inmediatamente las celdas marcadas magnéticamente empujando firmemente el émbolo dentro de la columna.

Preparación del búfer de separación MACs (500 ml)

| Reactivo | Volumen |
|----------|---------|
| EDTA | 0.95 g |
| PBS | 500 ml |
| BSA | 2.5 g |

Mezclar los reactivos por lo menos 30 min.

Preparación de paraformaldehído

| Reactivo | Volumen |
|---------------------------|---------------------------|
| PBS | 40 ml |
| Paraformaldehído en polvo | 2 g |
| NaOH (1 M) | Hasta tornar transparente |

1. Mezclar los 40 ml de PBS + 2 g de Paraformaldehído en polvo
2. Calentar hasta los 60°C en la campana de extracción de vapores.
3. Agregar gotas de NaOH hasta que la mezcla se torne transparente y se disuelva el paraformaldehído restante.
4. Dejar enfriar la mezcla.
5. Ajusta el p.H. a 7.4
6. Aforar a 50mL con PBS.
7. Filtrar con una pirinola de 0.43 nm.