



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

EL PAPEL DE MIF EN EL CÁNCER DE COLON ASOCIADO A COLITIS EN UN MODELO MURINO

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO
PRESENTA

Thalia Pacheco Fernández

DIRECTORA DE TESIS
Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Los Reyes Iztacala, Estado de México

2015





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.

DEDICATORIA

A mis hermanas, quienes siempre han sido mi principal motivación de superarme y seguir adelante, y a quienes espero que esta tesis les recuerde que siempre es posible lograr lo que te propones.

AGRADECIMIENTOS

A Dios que me ha dado todas las herramientas para hacer lo que amo.

A mi mamá y a mi papá porque siempre hicieron todo lo que estuvo en sus manos (y también lo que no) para darme la mejor educación, que siempre me han impulsado a seguir mis sueños y me brindaron las herramientas para lograrlo, por apoyarme durante toda la carrera, además de la paciencia que me tuvieron durante el proceso de escribir la tesis. Porque todo lo que sé, los valores, la fuerza y el amor por todo lo que hago lo aprendí de ustedes.

A mi tutora, la Doctora Miriam porque siempre ha buscado lo mejor para mi formación académica, me ha tenido mucha (muchísima) paciencia durante estos tres años en el laboratorio. Porque siempre me ha apoyado en todos los aspectos y eso me ha enseñado mucho, no sólo de ciencia, sino también de la vida.

A mis sinodales por tomarse el tiempo de leer y corregir mi tesis tan minuciosamente.

Al Dr. Marco Rodríguez por su invaluable ayuda en la parte experimental de esta tesis y su paciencia en la realización de la misma.

A mis compañeros Ime, Alice, Tona y Vic, de quienes he aprendido mucho y también he recibido mucho apoyo durante estos tres años.

A Norma, porque gracias a ella la carrera fue increíble y porque tienes la culpa de gran parte de mi crecimiento académico y personal.

A Gina que siempre me ha motivado a seguir adelante, con quien siempre he podido compartir el amor por lo que hago.

A Emilio quien fue una parte fundamental en la escritura de esta tesis, que me apoyó verdaderamente en absolutamente todo y no me dejó caer por el estrés cuando ya no quería nada.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 5, "Inmunidad Innata", en la Unidad de Biomedicina (UBIMED). Y fue parcialmente financiado por: Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos Académicos (DGAPA), No. de proyecto IN212215, y por el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT), No. de proyecto 152224.

La sustentante Thalia Pacheco Fernández fue becaria del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos Académicos (DGAPA), No. IN212412, y por el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT), No. de becario 2046.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	iii
ABREVIATURAS	iv
INTRODUCCIÓN	3
1. CÁNCER	3
1.1 Estroma tumoral	3
2. MARCAS DEL CÁNCER	4
2.1 Señalización de proliferación sostenida	4
2.3 Resistencia a la muerte celular	5
2.4 Habilitación de la inmortalidad replicativa	6
2.5 Inducción de la angiogénesis	6
2.6 Activación de invasión y metástasis	7
2.7 Desregulación energética celular	7
2.8 Inestabilidad genómica y mutaciones	8
2.9 Evasión del sistema inmune	8
2.9.1 Inmunoedición	9
2.10 Inflamación, proceso promotor del cáncer	10
3 Las enfermedades inflamatorias promueven el cáncer	11
3.1 Enfermedad inflamatoria del intestino	11
4 CÁNCER COLORRECTAL ASOCIADO A COLITIS	12
4.1 Etiología	12
4.2 Epidemiología	14
4.3 Células inmunes en el cáncer colorrectal	15
4.4 Citocinas en el cáncer colorrectal	19
5. EL FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS (MIF)	20
5.1 MIF y su papel en la promoción del cáncer	22
5.1.1 MIF y el cáncer colorrectal	23
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27

METODOLOGÍA	28
RESULTADOS	33
RESUMEN DE RESULTADOS	51
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	59
PERSPECTIVAS	59
LITERATURA CITADA.....	60
ANEXO TÉCNICO	65

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. La vía canónica de Wnt	14
Figura 2. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer colorrectal (número de casos por cada 100,000 habitantes)	15
Tabla 1. Células productoras y función de las principales citocinas incrementadas en el modelo de cáncer colorrectal inducido con AOM y DSS.....	20
Figura 3. Mecanismo de acción de MIF.....	23
Tabla 2. MIF en el cáncer colorrectal	25
Figura 4. Esquema del curso experimental para el desarrollo de cáncer colorrectal asociado a inflamación crónica	29
Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la identificación de células inmunes	31
Figura 5. Gel de agarosa donde se observan los productos del PCR para los genes <i>Mif</i> (201 pb) y <i>Neomicina</i> (500 pb)	33
Figura 6. Porcentaje de peso a través del desarrollo de cáncer colorrectal	35
Figura 7. Perfil de citocinas en suero de sangre periférica	36
Figura 8. Tamaño del colon en grupos con CAC con respecto a su control	37
Figura 9. Número de tumores por intestino en los grupos WT CAC y <i>MIF</i> ^{-/-} CAC	37
Figura 10. Tamaño de tumores en ambos grupos WT y <i>MIF</i> ^{-/-} con CAC	38
Figura 11. Cortes histológicos de intestino grueso al día 68	40
Figura 12. Porcentaje de células TCR-β ⁺ , linfocitos T CD4 ⁺ y T CD8 ⁺ en lámina propia del intestino grueso	42
Figura 13. Porcentaje de células B en lámina propia del intestino grueso	44
Figura 14. Porcentaje de células dendríticas en lámina propia del intestino grueso	45
Figura 15. Número de células NK en lámina propia del intestino grueso	46
Figura 16. Porcentaje de macrófagos en lámina propia del intestino grueso	47
Figura 17. Concentraciones de IL-1 b, IL-4 e IL-10 <i>in situ</i> en la región tumoral del colon al final del experimento	48
Figura 18. Expresión de <i>Mif</i> en tejido de la región distal del colon	49
Figura 19. Expresión relativa de moléculas características de Mo tipo M1 o M2	50
Tabla 4. Resumen de resultados	51

ABREVIATURAS

AOM	Azoximetano
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ARG1	Arginasa
ATP	Adenosín trifosfato
Bcl	Linfoma de célula B
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
CAC	Cáncer Asociado a Colitis
CD	Cluster de diferenciación
CEA	Antígeno Carcino-Embrionario
COX	Ciclooxygenasa
CSF	Factor estimulador de colonias
CXCR	Receptor de quimiocina tipo CXC
DAMPs	Patrones Moleculares Asociados a Daño
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos de Trifosfatos
Dsh	Gen <i>Dishevelled</i>
DC	Células dendríticas
DSS	Dextrán Sulfato de Sodio
DTT	Ditiotreitol
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EMMPYRIN	Inductor de Metaloproteinasas de Matriz Extracelular
EMT	Transición de Epitelio a Mesénquima
ERK	Cinasa Regulada por señales Extracelulares
GAPDH	Gliceraldehido-3-Fosfato Deshidrogenasa
GLUT	Transportador de glucosa
GTP	GuanidínTrifosfato
HIA	Apoptosis Inducida por Hipoxia
HIF	Factor Inducible por Hipoxia
HRE	Elementos de Respuesta a Hipoxia
IDO	Indoleamina 2,3-Desoxigenasa
IFN- γ	Interferón gamma
Igf	Factor de crecimiento tipo insulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nitricosintetasa inducible
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MDSC	Células Supresoras Derivadas de Mieloides
MET	Transición de Mesénquima a Epitelio

MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
MMP	Metaloproteinasas de matriz
mRNA	RNA mensajero
mTOR	Blanco de rapamicina en mamíferos
NF-KB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	Células asesinas naturales
NKT	Células T asesinas naturales
NO	Óxido nítrico
Oligo DT	Secuencias cortas de nucleótidos deoxi-timina
PI3-cinasa	Fosfoinositol 3-cinasa
PAI-1	Inhibidor del activador plasminógeno-1
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pVHL	Supresor de tumor Von Hippel–Lindau
RB	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDF- α	Factor derivado de células estromales 1-alfa
Ser	Serina
SSII RT	Super Script II retrotranscriptasa
TAMs	Macrófagos asociados a tumor
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
TNFR1	Receptor de TNF 1
TNF- α	Factor de necrosis tumoral-alfa
T-reg	Linfocito T regulador
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular.

RESUMEN

La inflamación crónica se ha relacionado con el desarrollo del cáncer al desequilibrar la respuesta inmune. El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina pro-inflamatoria que se sobre-expresa en muchos tumores, estimula la angiogénesis y la metástasis, además promueve la proliferación y supervivencia de células malignas de distinto origen. En colitis ulcerativa, MIF se expresa en etapas tempranas y favorece la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , e IL-1 β . La inflamación crónica intestinal puede preceder al desarrollo del cáncer colorrectal, en este trabajo determinamos la participación de MIF en el desarrollo y progresión del cáncer colorrectal. Para dilucidar este punto utilizamos ratones genéticamente deficientes en MIF (MIF^{-/-}) y ratones silvestres (WT), ambos de fondo genético BALB/c, para desarrollar un modelo de cáncer colorrectal mediante dextrán sulfato de sodio y azoximetano. Los ratones MIF^{-/-} mostraron bajos niveles de pro-citocinas inflamatorias en suero TNF- α , IL-1 β e IFN- γ en comparación con ratones WT. Sorprendentemente, se encontraron significativamente más tumores y de etapa avanzada en los ratones MIF^{-/-} (24,4 \pm 2) en comparación con ratones WT (12,6 \pm 2). Esta observación se asoció a que ratones MIF^{-/-} tenían un menor número de macrófagos activados en comparación a los ratones WT. En contraste encontramos un mayor número de células NK activadas en el epitelio de los ratones MIF^{-/-}. Basados en el perfil de citocinas *in situ*, los macrófagos en ratones MIF^{-/-} posiblemente estaban polarizados hacia un perfil M2 (encargados de la remodelación tisular). Por lo tanto, aunque MIF ha sido reconocido como un promotor de la inflamación, lo que podría favorecer el desarrollo de cáncer; nuestros resultados sugieren que MIF tiene un papel relevante en el control en etapas tempranas del desarrollo tumoral del cáncer colorrectal, posiblemente por sus propiedades atrayentes de células (quimiocina) efectoras involucradas en la destrucción de células cancerígenas.

ABSTRACT

Chronic inflammation has been related with cancer development by unbalancing the immune response. The pro-inflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF) is overexpressed in many tumors, stimulates angiogenesis and metastasis by promoting proliferation and survival of malignant cells. In the inflammatory disease ulcerative colitis MIF is early expressed and favors the pro-inflammatory cytokine production such as TNF- α , and IL-1 β . As intestinal chronic inflammation may proceed to colorectal cancer, we are interested in determining the role of MIF on development and pathology on colorectal cancer. To elucidate this point we used MIF^{-/-} and WT mice, both with BALB/c genetic background, to develop a colorectal cancer model of Dextran Sodium Sulfate and Azoxymethane. MIF^{-/-} mice showed low levels of serum pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β and IFN- γ compared to WT mice. Strikingly, we found significantly more tumor and in a higher development stage on MIF^{-/-} mice (24.4 \pm 2) compared to WT mice (12.6 \pm 2). Higher number of activated macrophages was detected in intestinal epithelium on WT mice compared to MIF^{-/-} mice. Based on intestinal cytokine profile, macrophages from MIF^{-/-} mice may have acquired a polarized M2 phenotype (responsible of tissue repair). In contrast, higher number of NK cells were found in MIF^{-/-} 's intestinal epithelium. Therefore, although MIF has been recognized as a promoter of inflammation, which could favor the development of cancer; our results suggest that MIF is involved in controlling the development of colorectal cancer, possibly by its chemokine properties.

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

Se denomina a un conjunto de enfermedades caracterizadas por un proceso de crecimiento descontrolado de células que puede aparecer en cualquier lugar del cuerpo, y es capaz de diseminarse (metástasis) a otros puntos del organismo [1]; sin embargo los estudios en los últimos años han demostrado que más bien son entidades celulares heterogéneas cuyo crecimiento depende de las interacciones entre las células transformada y el microambiente que las rodea [2]. Se han descrito propiedades biológicas adquiridas en células cancerosas que le permiten sobrevivir, proliferar y diseminarse, denominados “marcas del cáncer” (del inglés, *hallmarks of cancer*) [3].

1.1 Estroma tumoral

Es el conjunto de células reclutadas y tejido conectivo que regulan el microambiente del tejido canceroso. Las células del estroma incluyen fibroblastos, células vasculares, células gliales, células de músculo liso, células epiteliales, adipocitos y células del sistema inmune [2].

Los fibroblastos son el principal componente del estroma tumoral. En tejido conectivo sano los fibroblastos son las células predominantes que se encargan de la producción, deposición y remodelación de la matriz extracelular. Cuando hay daño en el tejido, los fibroblastos se activan y secretan factores de crecimiento, factores promotores de la angiogénesis, componentes de la matriz extracelular y quimiocinas que regulan el flujo de células pro-inflamatorias; una vez reparado el tejido regresan a su estado inactivo [4].

En cambio, los fibroblastos del estroma tumoral se mantienen activados de manera permanente. Los fibroblastos del estroma tumoral provienen principalmente de la médula ósea y del proceso de transición de epitelio a mesénquima (EMT, del inglés *Epithelial to Mesenchymal Transition*), que se da cuando el micro-ambiente inflamatorio deteriora las uniones de las células epiteliales con la lámina basal y las células epiteliales adyacentes y le confiere a la célula “liberada” propiedades de mesénquima; es decir, no sólo promueve la proliferación celular, también es capaz de migrar y diseminar el cáncer [5].

El segundo componente del estroma tumoral son las células inmunes (monocitos/macrófagos, neutrófilos y linfocitos) [6]. Los macrófagos y neutrófilos influyen el comportamiento de las células epiteliales y estimulan la angiogénesis al liberar el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) [7]. Además el infiltrado de linfocitos T reguladores y células supresoras de origen mieloide (MDSC, del inglés *Myeloid Derived Supresor Cells*) encargadas de suprimir la respuesta inmune antitumoral [8].

Los vasos sanguíneos son el tercer componente del estroma tumoral; el VEGF secretado por varias células, principalmente fibroblastos, desencadena la formación de nuevos vasos sanguíneos, indispensables para la nutrición del tumor. Sin embargo, estos vasos sanguíneos son frágiles y tienen una distribución inapropiada. Lo que lleva a que se rompan, se exacerbe la hipoxia en el tejido (correlacionada con el comportamiento agresivo de los tumores y la resistencia a terapias), y se estimule la producción adicional de VEGF [4].

2. MARCAS DEL CÁNCER

2.1 Señalización de proliferación sostenida

Las células tumorales tienen desregulada la capacidad de mantener la arquitectura y función de un epitelio histológicamente normal. Los factores de crecimiento (principales señales de activación) se unen a receptores de membrana con dominios tirosin-cinasa intracelulares desencadenando la activación de vías de señalización que llevan a la activación del ciclo celular, especialmente el crecimiento celular; generando influencia sobre la proliferación celular y el metabolismo [3, 9]. Éstos factores de crecimiento no afectan una célula en particular, si no a tejidos enteros mediante señalización parácrina.

La mutación somática es crucial en el desarrollo del cáncer; un ejemplo son las mutaciones que afectan la estructura de la proteína B-Raf de la vía de las MAP-Cinasas o PI3-cinasa que permiten la activación constitutiva de vías que de manera normal son desencadenados únicamente por factores de crecimiento [3].

Los mecanismos de retroalimentación en la señalización, normalmente promueven la homeostasis y por lo tanto atenúan la señalización de la proliferación, sin embargo la desregulación de dichos mecanismos promueve la proliferación sostenida [3, 9].

2.2 Evasión de supresores de crecimiento

Las células cancerosas también presentan diferentes mecanismos mediante los cuales evitan la supresión a factores de crecimiento; tal es el caso de la proteína del retinoblastoma (RB), encargada de integrar señales intracelulares y extracelulares, y determinar si la célula entra a fase de crecimiento y/o proliferación. Las células cancerosas con defectos en la vía RB pierden su propiedad de “custodio” (del inglés *gatekeeper*) permitiendo la proliferación y crecimiento persistente [10].

En éste sentido TGF- β es conocido por sus propiedades antiproliferativas, en etapas tardías en muchos tumores la señal de TGF- β es redirigida para activar el proceso celular EMT que le confiere a la célula tumoral rasgos asociados con alto grado de malignidad [11].

2.3 Resistencia a la muerte celular

Uno de los principales mecanismos de muerte celular es la apoptosis (muerte celular programada), la cual se considera uno de los mecanismos de defensa contra el desarrollo de cáncer. Las señales intracelulares y extracelulares (desencadenadas por Fas ligando-Fas receptor) culminan en la activación de la vía de las caspasas, responsable de llevar a cabo la apoptosis [3].

Las células tumorales tienen la capacidad de evitar la muerte celular por diferentes medios; por ejemplo mediante la pérdida de genes gatekeeper (Ejemplo *P53*) [10] y aumentando la expresión de reguladores antiapoptóticos (Ejemplo *Bcl-2* y *Bcl-x_l*) y de factores de supervivencia (Ejemplo *Igf1/2*) [3].

Un mecanismo adicional de muerte celular es la autofagia, el ambiente tumoral está limitado en nutrientes y muchas veces recurre a la autofagia para obtenerlos, es decir, se destruyen organelos celulares que se almacenan en autofagosomas y se degradan mediante lisosomas para obtener moléculas de bajo peso molecular que permitan la nutrición de las células cancerosas [3].

La autofagia es importante dado que se ha documentado la conexión entre la apoptosis y la autofagia pues algunas moléculas estimuladoras de la supervivencia (AKT, PI3-cinasa y mTOR) que bloquean la apoptosis, también inhiben la autofagia y la deficiencia de esas moléculas pueden activar apoptosis o autofagia [12].

Finalmente, otro mecanismo de muerte celular es la necrosis, cuando una célula muere por necrosis libera su contenido al tejido circundante y como consecuencia las células necróticas son

capaces de reclutar células pro-inflamatorias del sistema inmune para reparar el tejido dañado y destruir las células necróticas aumentando el nivel de citocinas pro-inflamatorias [13].

Sin embargo es bien sabido que la inflamación es capaz de favorecer la angiogénesis, proliferación celular e invasividad, por lo que se considera la necrosis un mecanismo que favorece el desarrollo del cáncer [3, 13].

2.4 Habilitación de la inmortalidad replicativa

Las células poseen la capacidad de dividirse un número limitado de veces, después de eso entran en estado de senescencia¹ o muerte celular. Sin embargo, en raras ocasiones, hay una transición de algunas células en una población en crisis hacia un estado de replicación ilimitada llamado inmortalización [3, 14].

La inmortalización ocurre gracias a la actividad de la telomerasa, la cual es la enzima encargada de agregar nucleótidos a los telómeros, su actividad está prácticamente ausente en células histológica y fisiológicamente normales pero presente en ~90% de células cancerosas; esto permite contrarrestar el desgaste de telómeros y permitirle a la célula tumoral replicarse indeterminadamente [14].

2.5 Inducción de la angiogénesis

Como cualquier tejido, los tumores necesitan un suministro de nutrientes y oxígeno, así como un medio para evacuar desechos metabólicos y dióxido de carbono; estas necesidades se cumplen gracias a la angiogénesis² [4].

Durante la progresión del tumor, la hipoxia y la señalización de oncogenes causa la sobreexpresión crónica de *VEGF*, principal inductor de la angiogénesis, ya sea porque algunos oncogenes pueden regular su producción o es secretado directamente por células inmunes como neutrófilos, macrófagos, mastocitos, y progenitores de células mieloides que llegan al tumor [6].

Sin embargo los vasos sanguíneos dentro de los tumores son aberrantes: la neovasculatura es débil, deforme y extremadamente ramificada, los vasos son distorcionados y engrosados, por lo que hay un flujo errático de sangre, microhemorragias, debilidad y niveles anormales de proliferación y apoptosis [3, 6].

¹**Senescencia:** Proceso de deterioro en una célula alcanza el número de divisiones permitidas por los telómeros; se suspende el ciclo celular, dejan de dividirse pero permanecen vivas.

²**Angiogénesis:** Formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de preexistentes.

2.6 Activación de invasión y metástasis

Las células epiteliales conforman láminas de células unidas lo cual contribuye a limitar su proliferación ordenada. En el caso de tejidos tumorales, las células cancerosas desarrollan alteraciones en su forma y uniones con la matriz extracelular y con otras células. Cuando la transcripción de los genes de moléculas de adhesión falla es más fácil la migración celular, en éste caso de células cancerosas [4].

La “cascada de invasión-metástasis” inicia con la invasión local, después la intravasación de las células cancerosas a los vasos sanguíneos y linfáticos más cercanos, para posteriormente escapar hacia el parénquima (extravasación), donde forman pequeños nodos de células cancerosas (micrometástasis) crecen y forman tumores (colonización) [4].

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es orquestada por los factores de transcripción Snail, Slug, Zeb 1/2 y Twist que están relacionados con la migración celular durante el proceso embrionario. Esto sumado a la pérdida de uniones adherentes, la expresión de enzimas degradadoras de matriz extracelular y la alta resistencia a la apoptosis privan a las células neoplásicas de los factores supresores de la movilidad permitiendo la invasión y metástasis [5].

A pesar de que las células cancerosas son altamente capaces de diseminarse, su potencial invasivo dependerá de la presión de selección ejercida para permitir la adaptación y crecimiento en el tejido invadido, lejos del estroma tumoral que le proveyó nutrientes y el ambiente propicio para su desarrollo. Este cambio se conoce como transición mesénquima-epitelio (MET) [3, 4].

2.7 Desregulación energética celular

En células tumorales el mecanismo aerobio de obtención de energía se encuentra alterado, las condiciones anaerobias del tumor limitan la producción de energía mediante glucólisis, llevándola a un estado denominado “glucólisis anaerobia” [3].

La producción de ATPs es aproximadamente 18 veces menor que la obtenida mediante fosforilación oxidativa dentro de la mitocondria; para compensar esa deficiencia las células cancerosas sobre-regulan la expresión de los transportadores de glucosa GLUT-1 con lo que permiten mayor entrada de glucosa al citoplasma [3].

El aumento en la glucólisis permite la diversificación de los intermediarios de esta vía mediante diferentes vías biosintéticas, como la generación de nucleosidos y aminoácidos, lo que facilita la

síntesis de macromoléculas y organelos celulares que se requieren en la proliferación y replicación celular [3].

2.8 Inestabilidad genómica y mutaciones

La inestabilidad genómica es una de las características principales que permiten el desarrollo de otras marcas del cáncer en la célula al generar mutaciones aleatorias y cambios epigenéticos que se heredan a las células hijas y se acumulan hasta desarrollar el tejido tumoral. Esta inestabilidad no sólo desencadena la tumorigénesis, si no que aumenta la capacidad mutagénica de las células durante el desarrollo del tumor para comprometer los sistemas de vigilancia genómico y evitar la senescencia y apoptosis, además incrementa la sensibilidad a agentes mutagénicos [3].

Los genes *caretakers* o cuidadores son aquellos encargados en detectar daño al DNA y activar la maquinaria de reparación o inactivar moléculas mutagénicas antes que dañen el DNA. Las mutaciones o cambios epigenéticos en los genes caretakers sin lugar a dudas asegura la progresión del cáncer [3].

2.9 Evasión del sistema inmune

El sistema inmune realiza tres funciones importantes para prevenir el cáncer: 1) previene los tumores derivados de virus, 2) regula el microambiente tumoral para prevenir el establecimiento de un ambiente inflamatorio que facilite la tumorigénesis y 3) elimina células tumorales que reconoce a través de ligandos (MICA, B en humanos y RAE 1 α - ϵ , MULT-1 y H60 en ratones) que activan receptores en células presentadoras de antígenos del tumor que son reconocidos por los linfocitos [15]. Este último punto se ha reconocido como inmunovigilancia, término que señala en particular cuando el sistema inmune, que no ha sido manipulado, es capaz de reconocer y eliminar tumores primarios [16].

A pesar del mecanismo de inmunovigilancia, un organismo inmunológicamente competente puede desarrollar cáncer, ya que el sistema inmune “edita” o modela la inmunogenicidad del tumor. A lo anterior se le conoce como inmunoedición del cáncer [17].

2.9.1 Inmunoedición

La inmunoedición del cáncer se lleva a lo largo de tres fases: *eliminación*, *equilibrio* y *escape*. En algunos casos, por influencia de factores externos, las fases no siempre ocurren en el mismo orden o bien ausente alguna de ellas [15, 16].

Eliminación. Comienza con el reconocimiento por parte del sistema inmune de las células transformadas. Las señales de peligro ante un tumor pueden ser citocinas como IFN- γ , que activa las células dendríticas y promueve la respuesta inmune anti-tumoral; o los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) liberados directamente tanto por las células tumorales en apoptosis como por los tejidos dañados por el crecimiento invasivo de los tumores [15, 16].

Algunos ligandos de estrés expresados en la membrana de células tumorales, que las hacen altamente inmunogénicas, son reconocidos por células del sistema inmune como NKs, NKTs, linfocitos T CD8+, T CD4+, T $\gamma\delta$, macrófagos y células dendríticas. Estas células se activan y secretan citocinas proinflamatorias e inmunomoduladoras que favorecen el microambiente adecuado para el mantenimiento de la respuesta inmune adaptativa específica en contra del tumor [15, 16].

Si la fase de eliminación tumoral es exitosa el tejido circundante vuelve a ser considerado normal. Si alguna variante de célula tumoral sobrevive, el tumor entra en la fase de equilibrio [15].

Equilibrio. Células del sistema inmune adaptativo, específicamente linfocitos T CD4+ y CD8+, además de la expresión de IL-12 e IFN- γ mantienen a las células transformadas en estado de “dormancia” o latencia para impedir el crecimiento y proliferación del tumor por largos periodos de tiempo. Dichas acciones generan una presión de selección sobre las células tumorales propiciando la edición del tumor, lo que a su vez permite la formación de variantes tumorales con baja inmunogenicidad [15, 16].

Las variantes tumorales generadas pueden ser: a) células que perdieron sus antígenos o que tienen defectos en el procesamiento y presentación de antígenos, por lo tanto no son reconocidas por el sistema inmune adaptativo (pérdida de MHC); b) células que se vuelven insensibles a los mecanismos efectores del sistema inmune o c) células que inducen un estado inmunosupresor en el microambiente tumoral [15, 16].

Escape. Los cambios de las poblaciones celulares dentro del tumor a causa de la inmunoección, o los cambios de la respuesta inmune del hospedero en respuesta a la inmunosupresión y el deterioro del sistema inmune generados por el cáncer dan inicio a la fase de escape.

La inestabilidad genética de células tumorales causa fallas en la presentación de antígeno, y la pérdida de inmunogenicidad le permite a las células tumorales volverse “invisibles” para el sistema inmune y por tanto, formar nuevos tumores [15, 16].

Además las células tumorales promueven el desarrollo del estado inmunosupresor al producir moléculas como TGF- β , VEGF, galectina,IDO y reclutar linfocitos T reguladores y células supresoras de origen mieloide (MDSC), que inhiben la función efectora del sistema inmune [15].

En etapas tempranas del cáncer colorrectal, la inmunovigilancia media la detección y eliminación de células transformadas y focos de criptas aberrantes, incluso es capaz de mantener pequeños tumores en estado latente, pero si las células tumorales logran evadir al sistema inmune pueden crecer, proliferar y migrar sin ser destruidas [18].

2.10 Inflamación, proceso promotor del cáncer

La inflamación es otra condición que permite el desarrollo tumoral. A pesar que se conoce que existe una respuesta inmune de ataque al tumor, las células inmunes contribuyen a suplementar el microambiente tumoral de factores de crecimiento, factores de supervivencia, de factores pro-angiogénicos, modificadores de la matriz extracelular, señales que llevan al proceso de la EMT y de especies reactivas de oxígeno (ROS); favoreciendo el desarrollo de diferentes marcadores del cáncer [3].

En algunos tipos de cáncer se ha observado que las condiciones inflamatorias preceden al desarrollo de malignidad y en otros el cambio oncogénico deriva en un tumor que promueve la inflamación; en ambos casos la inflamación ayuda a la proliferación y supervivencia de células malignas, estimula la angiogénesis y metástasis, daña la respuesta inmune adaptativa y altera la respuesta a hormonas y quimioterapia. Comúnmente en células neoplásicas existe sobreexpresión de mediadores de citocinas pro-inflamatorias incluyendo proteasas, eicosanoides, citocinas y quimiocinas. También se han ligado ciertas citocinas a dicho proceso como el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), TNF- α , IL-6, IL-17, IL-12, IL-23, IL-10, y TGF- β . La activación de oncogenes como *myc*, *ras* y *ret*, o la inactivación de genes supresores de tumor como *pVHL* llevan

a la producción constitutiva de citocinas inflamatorias en la célula. El ambiente de citocinas afecta tanto a la célula tumoral como a diferentes células del huésped [19].

En el microambiente del tumor se produce TNF- α , cuya señalización promueve la supervivencia celular, la invasión y angiogénesis; contribuyendo a la iniciación del tumor estimulando la generación de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y de oxígeno (ROS) [20]. Incluso, en modelos murinos de cáncer colorrectal inducido con AOM y DSS en ratones deficientes del receptor 1 de TNF (TNFR1^{-/-}) se redujo la carga tumoral [19].

IL-10 es una citocina antiinflamatoria e inmunosupresora; la deficiencia de ella causa desarrollo espontáneo de colitis asociada con la activación de células inmunes y posteriormente desencadena CAC. MIF es una citocina muy importante en este proceso pues es un inductor de la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β además que se han observado niveles altos de expresión de MIF en diferentes cánceres [21].

3 Las enfermedades inflamatorias promueven el cáncer

Se ha observado una estrecha relación entre enfermedades de inflamación crónica en ciertos tejidos y el desarrollo de cáncer en ellos: por ejemplo la gastritis causada por *Helicobacter pylori* y el cáncer gástrico; esófago de Barrett o reflujo esofágico y cáncer de esófago; pancreatitis crónica y cáncer de páncreas; cirrosis y cáncer hepático; bronquitis con cáncer de pulmón; cistitis e inflamación de la vejiga con cáncer de vejiga; gingivitis y cáncer de células escamosas orales; líquen escleroso y cáncer en células escamosas vulvares; inflamación en la piel causada por luz ultravioleta y cáncer de piel; y finalmente enfermedad inflamatoria del intestino con cáncer colorrectal [22, 23].

3.1 Enfermedad inflamatoria del intestino

La enfermedad inflamatoria del intestino (IBD por sus siglas en inglés) comprende dos enfermedades diferentes: la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn. Ambas enfermedades se caracterizan por ser causadas por un proceso inflamatorio exacerbado y descontrolado del intestino. Los síntomas que las relacionan son diarrea, sangrado gastrointestinal, hematoquecia, dolor abdominal y pérdida de peso [24].

Enfermedad de Crohn: afecta cualquier parte del tracto gastrointestinal; desde la boca hasta el ano, aunque principalmente la parte distal del intestino delgado (ileum) y el colon. Se diferencia de la colitis ulcerativa por la formación de fístulas que son rupturas transmurales en la pared del intestino causadas por el proceso inflamatorio [24].

Colitis ulcerativa: afecta principalmente al recto y avanza hacia el intestino grueso, el sangrado rectal es mucho más común que en la enfermedad de Crohn y se caracteriza por la formación de úlceras que son defectos en la pared del tracto gastrointestinal que afectan tanto a la mucosa como a la lámina propia sin romper la pared intestinal [24].

Pese a que no existen datos certeros sobre la recurrencia a nivel mundial se estima que la morbilidad de la colitis ulcerativa es mayor que la de la enfermedad de Crohn en América del Norte y Europa [25]. El padecimiento de ambas enfermedades aumenta el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal a partir de los 8-10 años del diagnóstico [26], sin embargo el riesgo es mayor con la colitis ulcerativa. Después de 30 años del diagnóstico el 8.3% de pacientes con enfermedad de Crohn desarrollan cáncer colorrectal asociado a colitis (CAC) mientras que en pacientes con colitis ulcerativa es del 18% [24].

4 CÁNCER COLORRECTAL ASOCIADO A COLITIS

4.1 Etiología

El desarrollo del cáncer colorrectal incluye la exposición a factores ambientales y generación de aberraciones genéticas, sin embargo se ha considerado a la inflamación crónica intestinal el factor clave en la predisposición a cáncer colorrectal asociado a colitis (CAC) [27]. Además, la obesidad, inactividad física, exceso de alcohol, tabaquismo y una dieta alta en grasas y/o baja en frutas, vegetales o fibra se asocian al incremento en el riesgo de adenomas y cáncer colorrectal [28].

La inflamación del epitelio intestinal (colitis) se desencadena comúnmente por infecciones virales y bacterianas o por toxinas (en modelos animales). Las células inmunes que favorecen el ambiente inflamatorio también generan especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y NO), las cuales generan alteraciones en el material genético (mutación o activación de *p53*), daño en el sistema de reparación de mismatch del DNA, acortamiento de telómeros y metilación de genes regulatorios como *Adenomatous polyposis coli (APC)* [27].

La mutación del gen *APC* es el primer paso para el desarrollo de cáncer colorrectal. *APC* pertenece a la vía Wnt/ β -catenina (vía canónica de Wnt); en un organismo sano puede activarse de dos maneras: la primera en ausencia de Wnt (Figura 1 izquierda), donde β -catenina se une a E-caderina en la membrana celular, luego *APC* es el encargado de formar el complejo de degradación de β -catenina conformado por *APC/GSK-3/Axina* que permite la fosforilación y ubiquitinación de β -catenina para ser degradada por el proteosoma [27].

La segunda (Figura 1 derecha), cuando Wnt se une al receptor membranal Frizzle se fosforila Dsh, el cual disocia el complejo *APC/GSK-3/Axina*, por lo tanto no se lleva a cabo la degradación de β -catenina, la cual se acumula en el citoplasma de la célula. Posteriormente β -catenina se transloca al núcleo donde recluta proteínas remodeladoras de la cromatina (*p300* y *Brg-1*), lo que activa la transcripción de los proto-oncogenes *c-Myc*, *MMP-7*, *gastrina*, *ciclina-D1* e *ITF-2*. Finalmente esta activación genera la liberación de proteínas relacionadas con Frizzle que son antagonistas de Wnt, lo cual detiene la vía [27].

Entre el 70 y 80% de los casos de cáncer colorrectal presentan defectos en la vía Wnt, el 90% de ellos en la pérdida de la expresión de *APC* o su expresión incompleta, lo que causa la acumulación de β -catenina y consecuentemente la activación de la transcripción de los proto-oncogenes ya mencionados [28].

La inflamación crónica causada por la colitis ulcerativa influye también en la desregulación de β -catenina de diversas maneras: $\text{TNF-}\alpha$ induce la activación y acumulación de β -catenina sin necesidad de mutaciones en *APC* pues activa las vías $\text{NF-}\kappa\text{B}$ y *AKT*, además la activación del receptor EP2 por *PGE2* que se produce durante la inflamación incrementa la acumulación de β -catenina en el núcleo y por lo tanto su actividad transcripcional [27].

La inactivación de *APC* se lleva a cabo con el propósito de detener la migración y diferenciación de células pre malignas por lo que no son orilladas al borde de la cripta [27]. Las mutaciones en *APC* tienen lugar en las células madre del intestino, no en las células epiteliales, por lo tanto no son enviadas al lumen intestinal y tienen suficiente tiempo para adquirir más mutaciones necesarias para la conversión a células malignas [27].

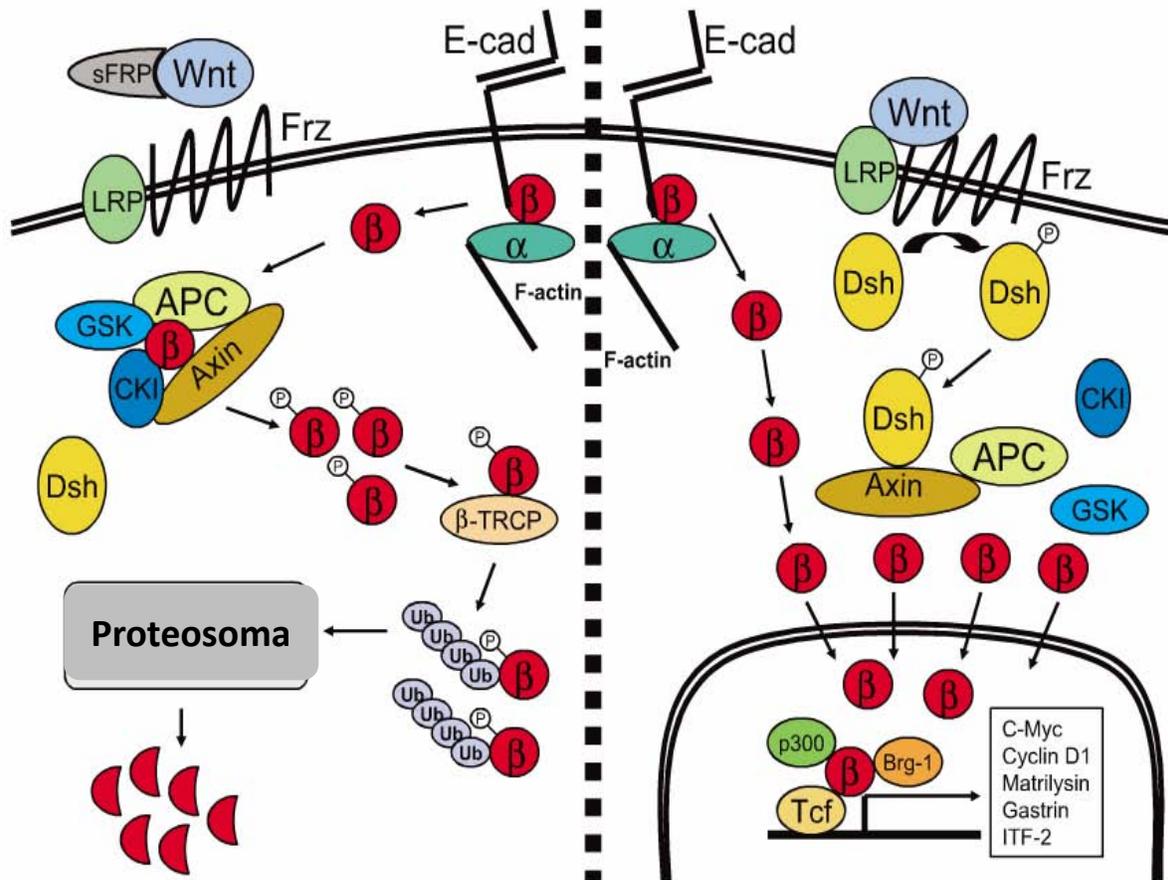


Figura 1. La vía canónica de Wnt. Del lado izquierdo se muestra la cascada que se desencadena en ausencia de Wnt donde β -catenina (β) es degradada por el proteosoma. Del lado derecho se muestra la cascada que desencadena la unión de Wnt al receptor Frizzled (Frz) donde β -catenina es internalizada al núcleo. Esquema tomado de [27].

4.2 Epidemiología

En el año 2012 las neoplasias malignas fueron la principal causa de muerte a nivel mundial (8.2 millones de muertes); específicamente el cáncer colorrectal es la segunda neoplasia más común en mujeres (614,000 casos) y el tercero en hombres (746,000 casos). La distribución de esta enfermedad está muy definida (Figura 2): el 55% de los casos nuevos ocurren en países desarrollados; sin embargo el porcentaje de mortalidad es mucho mayor en países en vías de desarrollo (52% del total de casos) por la mala calidad de los servicios de salud [29].

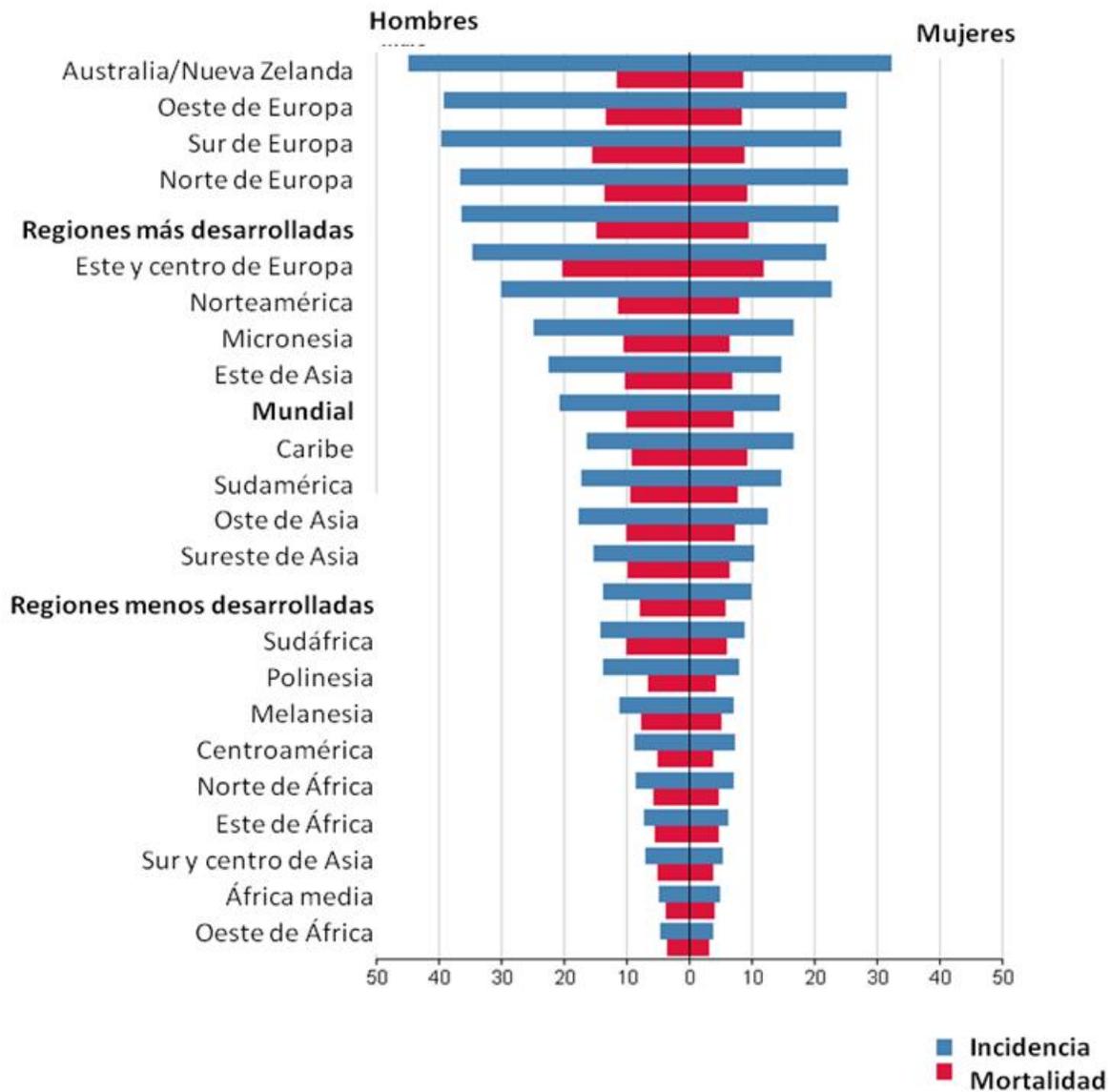


Figura 2. Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer colorrectal (número de casos por cada 100,000 habitantes). En los países desarrollados la incidencia es mayor que en los países menos desarrollados; a pesar de esto, la tasa de mortalidad es mayor en las regiones menos desarrolladas. Gráfica tomada de [29].

4.3 Células inmunes en el cáncer colorrectal

Ante cada tipo de cáncer se presenta una respuesta inmune diferente; incluso dentro del cáncer colorrectal, en cada caso clínico se presenta un perfil molecular y celular diferente moldeado por

el sistema inmune. Las principales poblaciones celulares encargadas de la inmunovigilancia en cáncer colorrectal son los linfocitos, células NK y macrófagos [30].

Linfocitos T CD8⁺: son células citotóxicas que reconocen antígenos específicos de tumor presentados por las células tumorales mediante el complejo principal de histocompatibilidad tipo I (MHC-I), se expanden clonalmente y se diferencian. Al diferenciarse forman lisosomas cargados con perforinas y granzimas. Cuando los linfocitos T CD8⁺ entran en contacto directo con la célula tumoral pueden destruirla, pues se liberan las perforinas que rompen la membrana de la célula tumoral para permitir la entrada de proteasas (principalmente granzima B) que se unen a precursores de la vía de las caspasas promoviendo la apoptosis [30].

Además, durante la diferenciación de los linfocitos T CD8⁺ se expresa el ligando de Fas (Fas-L), que se une a su receptor en la célula tumoral, Fas. La unión Fas-L-Fas es una de las señales de la apoptosis, contribuyendo de esta manera a la eliminación de las células tumorales. La mayoría de los linfocitos T CD8⁺ mueren mediante apoptosis después de destruir las células tumorales y algunos de ellos se convierten en células de memoria [30].

Linfocitos T CD4⁺: reconocen el antígeno cuando es presentado por las células presentadoras de antígeno mediante el complejo principal de histocompatibilidad tipo II (MHC-II), las células tumorales expresan únicamente MHC-I, por lo cual los linfocitos T CD4⁺ no se consideran suficientes para destruir las células tumorales; sin embargo cuando los linfocitos T CD4⁺ son activados hacia un perfil proinflamatorio (Th1) promueven la proliferación de los linfocitos T CD8⁺, por lo que para la destrucción del tumor son necesarios tanto los linfocitos T CD4⁺ como los T CD8⁺ [30].

Células NK: son el componente más importante de la inmunovigilancia, a diferencia de los linfocitos, las células NK reconocen cambios en las moléculas propias del organismo [30].

Las células NK tienen tres mecanismos de acción: el principal es la citotoxicidad mediante perforinas y granzimas, además son capaces de producir IFN- γ (son la principal fuente de IFN- γ *in vivo*) con lo que pueden destruir directamente la célula tumoral o desencadenar la respuesta pro-

inflamatoria por los linfocitos T. Además las NK presentan ligandos para receptores de la super familia TNF, cuya interacción aumenta la capacidad citotóxica de la célula [31].

Las NK son capaces de reconocer las células tumorales que dejan de expresar MHC-I o células tumorales que expresan ligandos para el receptor NKG2D o células infectadas por un virus o células bajo estrés como las moléculas relacionadas con MHC-I A y B (MICA y MICB). Cuando NKG2D se une a alguno de sus ligandos se desencadena la actividad citotóxica mediada por perforinas y granzimas, similar a la de los linfocitos T CD8⁺ [31].

Los macrófagos: juegan un papel importante en la inmunovigilancia; sin embargo, este papel no está bien definido y al parecer depende del microambiente tumoral. Mientras que en algunos tipos de cáncer, como de mama y próstata, la presencia de macrófagos se relaciona con un mal pronóstico, en otros, como el cáncer colorrectal, es indicador de un pronóstico favorable [32]. Los macrófagos son capaces de fagocitar algunas células tumorales, además colaboran con células T y B en la liberación de citocinas, quimiocinas, enzimas, ácido araquidónico y radicales libres [33]. Los macrófagos asociados a tumor (TAMs) tienen funciones diferentes a los macrófagos sanos que influyen el desarrollo de cáncer en distintos puntos.

- *Invasión.* En cáncer de mama se ha encontrado mayor cantidad de macrófagos en sitios donde se había roto o dañado la membrana basal, esto sumado a que los TAMs producen enzimas proteolíticas como la catepsina B, soporta la idea que los macrófagos promueven la invasión de las células tumorales hacia el tejido sano circundante [34].

Estudios *in vitro* también apoyan dicha teoría, se ha observado que cuando se cultivan macrófagos junto con células tumorales, éstas se vuelven más invasivas pues producen metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) y TNF- α que actúa por la estimulación de las vías c-Jun-NH₂ cinasa y NF- κ B que cascada abajo activan genes proinvasivos como EMMPIRIN (inductor de MMP extracelular) y el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) [35]. Además los macrófagos pueden producir el factor de crecimiento endotelial vascular (EGF) en respuesta al factor estimulador de colonias (CSF-1) producido por células tumorales, lo cual lleva a la inducción de genes que promueven la invasión y metástasis [34].

- *Crecimiento tumoral.* En el caso de los tumores que derivan de una lesión se ha observado que los TAMs secretan factores que estimulan la proliferación celular como un mecanismo de

reparación de tejidos; estos factores pueden ser EGF, el factor de crecimiento de derivados de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) que promueven la proliferación tumoral [34].

- *Angiogénesis.* Los tumores requieren de la formación de nuevos vasos sanguíneos para la nutrición del tumor y los macrófagos son los principales involucrados en este proceso. Los macrófagos son atraídos a los tumores por su capacidad fagocítica mediante restos celulares derivados del proceso de necrosis a estos sitios necróticos e hipóxicos y a su vez la hipoxia inhibe la migración reteniendo los macrófagos en esta área. Los macrófagos responden a la hipoxia sobre regulando los factores de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) 1 y 2 lo que activa genes que codifican proteínas que favorecen la angiogénesis como VEGF, además de enzimas moduladoras de la angiogénesis como MMP-2, MMP-7, MMP-9, MMP-12 y COX-2 [34].

Los vasos sanguíneos formados en el estroma tumoral son débiles y con malformaciones; promueven la inadecuada perfusión vascular con lo que favorecen la hipoxia, además de niveles elevados de lactato que favorecen la expresión de genes proangiogénicos en los macrófagos. La presencia de macrófagos en el estroma tumoral y la angiogénesis se han relacionado con mayor diseminación de las células tumorales [18].

Células supresoras derivadas de mieloides (MDSC): Se encuentran principalmente en tumores avanzados. Proviene de células mieloides inmaduras que en un individuo sano maduran para convertirse en granulocitos, macrófagos o células dendríticas; pero en condiciones patológicas, como en cáncer de colon, se diferencian en MDSC las cuales producen arginasa (ARG1), óxido nítrico inducible sintasa (iNOS), óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS) con lo que suprimen la respuesta inmune [36].

Linfocitos T reguladores (T-reg): También se encuentran en tumores avanzados donde suprimen la respuesta inmune antitumoral, a través de la secreción de IL-10 y TGF- β [37].

4.4 Citocinas en el cáncer colorrectal

Las células inmunes antes mencionadas secretan citocinas, las cuales van a modelar el microambiente tumoral, y a su vez, va a determinar la capacidad efectora o reguladora de las células inmunes. En el tejido de colon en ratones a los cuales se les indujo cáncer colorrectal con AOM y DSS se encontraron concentraciones elevadas (respecto a los ratones sanos) de las citocinas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , G-CSF y GM-CSF [38] (Tabla 1) así como la expresión relativa de los genes codificantes para dichas citocinas se encontró incrementada.

Citocina	Células productoras [39]	Función
IL-1 α	Células cancerosas, Mo, DC, Linf. B, células NK	Promueve la proliferación tumoral, angiogénesis y metástasis en la célula productora y células vecinas. En pacientes con mal pronóstico se encuentran concentraciones elevadas de IL-1. También permite la diferenciación y activación de linfocitos T [40].
IL-1 β		
IL-6	Células epiteliales y cancerosas, Mo, Linf. T y B, fibroblastos	Promueve la proliferación tumoral, angiogénesis y metástasis en la célula productora y células vecinas; la activación y diferenciación de células T y el reclutamiento de células mieloides. Incrementa la expresión y translocación nuclear de STAT 3 y la activación de ERK y Akt [18].
IFN- γ	NK, NKT, Linf. T y B, Mo y DC.	Es producido por los linfocitos T CD4+ para activar a los linfocitos T citotóxicos (CD8+) [41], favorece la apoptosis, el arresto del ciclo celular, la inflamación y la sobreexpresión de moléculas relacionadas con el MHC-I [42].
G-CSF	Células endoteliales y cancerosas, Mo y fibroblastos	Estimula la producción de granulocitos, moviliza células hematopoyéticas y progenitoras de células epiteliales hacia circulación periférica. Favorece el desarrollo del cáncer pues

		promueve la angiogénesis [43].
GM-CSF	Células endoteliales, Linf. T, NK, NKT, macrófagos, eosinófilos y fibroblastos.	Aumenta la producción de neutrófilos y monocitos; participa en la activación de macrófagos y la diferenciación de DC [44].

Tabla 1. Células productoras y función de las principales citocinas incrementadas en el modelo de cáncer colorrectal inducido con AOM y DSS. Abreviaturas: Mo: macrófagos; DC: células dendríticas; Linf: linfocitos; NK: células natural killers; NKT: células T natural killers.

Además de las citocinas antes mencionadas, la presencia del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) ha sido ampliamente identificada en pacientes con cáncer colorrectal [45, 46], en ratones con colitis ulcerativa [47] y con cáncer colorrectal [46]; por lo cual, actualmente MIF se considera un biomarcador para cáncer colorrectal [48].

5. EL FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS (MIF)

MIF es una molécula de 37.5 kDa con la morfología y actividad catalítica de una tautomerasa [49]. Sin embargo, su función en los organismos es de citocina pro-inflamatoria, capaz de promover la respuesta inmune innata y adaptativa a través de la activación de macrófagos y células T [50].

MIF es liberado rápidamente por células inmunes expuestas a productos bacterianos (como LPS) u otras citocinas pro-inflamatorias y es secretado de manera autócrina y parácrina. Del mismo modo, MIF promueve la producción de más citocinas pro-inflamatorias 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, COX-1 y productos de la vía del ácido araquidónico como PGE2 y metaloproteinasas [51].

MIF puede entrar de dos maneras a las células (Figura 3): la vía clásica es cuando se une al receptor de MIF CD74 para ser internalizado a la célula, la vía no clásica es cuando es introducido por endocitosis; en ambos casos MIF activa la Cinasa de regulación extracelular (ERK) 1 y 2 que desencadena vías de señalización que permiten la sobre expresión de TLR4, lo que activa la familia de factores de transcripción ETS y a su vez promueve la respuesta de tipo TH1 a través de la secreción de citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-1 β . Por lo tanto, su expresión se asocia con diversas

condiciones patológicas, por lo que es considerado un mediador importante de muchas enfermedades inmunoinflamatorias [50].

El establecimiento del ambiente inflamatorio permite la polarización clásica de los macrófagos, relacionada con la eliminación de tumores [52].

MIF es considerada una citocina tipo-quimiocina³ ya que es ligando de CXCR2 y CXCR4: receptores acoplados a proteínas G que permiten la activación de la vía de Rho-GTPasas, de esta manera permite la remodelación del citoesqueleto de actina y consecuentemente la quimiotaxis de los macrófagos (CXCR2) y de linfocitos (CXCR4) [53].

La diferencia entre MIF y el resto de las citocinas es su capacidad enzimática *in vitro* como tautomerasa⁴. A pesar de que no se ha demostrado que tenga una función biológica como enzima se ha observado que la estructura del sitio activo de MIF es indispensable para la especificidad de sus funciones biológicas ya mencionadas [54].

MIF se expresa en una amplia variedad de células inmunes y no inmunes como eosinófilos [55], células epiteliales [56], endoteliales [57], linfocitos [58] y macrófagos [59]. Además, MIF también es considerado una hormona, pues es producida por células corticotrópicas de la glándula pituitaria, su liberación por estas células está directamente relacionada con la de la hormona adrenocorticotrópica porque esta hormona es capaz de anular los efectos inflamatorios de MIF [60].

³**Quimiocinas:** Grupo de proteínas pequeñas que regulan el tráfico de leucocitos a través de interacciones con sus receptores acoplados a proteínas G en los leucocitos.

⁴**Tautomerasa:** Enzima que cataliza la transformación de su sustrato en su respectivo isómero

5.1 MIF y su papel en la promoción del cáncer

La amplia variedad de células secretoras de MIF y sus funciones lo convierten en un factor que actúa a diferentes niveles en el desarrollo de cáncer [61].

MIF promueve la proliferación celular al activar miembros de la vía de las MAPK. La unión de MIF a su receptor CD74 y consecuentemente la activación del co-receptor CD44 promueve la activación sostenida de ERK (Figura 3) lo que causa de un tercio de las mutaciones en el gen *Ras* [62]. La activación sostenida de ERK en un modelo de diferenciación neuronal confirma que **MIF permite la progresión del ciclo celular** [63].

Además, **MIF inhibe la actividad apoptótica de p53** (Figura 3). P53 es un gen supresor de tumor que promueve el arresto del ciclo celular y la apoptosis en respuesta al daño del DNA. La desregulación o ausencia de p53 interfiere con el mantenimiento de la estabilidad genómica y permite la supervivencia y proliferación celular a pesar de la acumulación de mutaciones [64].

La sobre expresión de MIF inhibe la transcripción de p53 mediante la vía del ácido araquidónico. La activación sostenida de ERK induce la actividad de fosfolipasa A2 (PLA2) en el citoplasma, lo que lleva a la producción de ácido araquidónico por la célula. El metabolismo del ácido araquidónico conlleva el aumento de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y prostaglandina E2 (PGE2); esto disminuye la fosforilación de la Ser15 de p53 mediante NO. Por lo tanto no se acumula p53, necesario para desencadenar la apoptosis mediante ésta vía [64].

Modelos *in vitro* demuestran que las células deficientes de MIF son resistentes a la transformación oncogénica por Ras asociada a p53 y la transformación se restituye al deletar p53 [65]. **MIF favorece la hipoxia y la angiogénesis.** La disminución de oxígeno (hipoxia) en el ambiente tumoral es un factor ampliamente reconocido como favorecedor del crecimiento tumoral. En condiciones de hipoxia se produce el factor inducible por hipoxia (HIF1 α) el cual a su vez se une a elementos de respuesta a hipoxia (HREs) en el promotor de algunos genes blanco, promoviendo su expresión. Entre sus genes blancos se encuentra VEGF indispensable para la formación de nuevos vasos sanguíneos y regula negativamente genes anti-angiogénicos como la trombospondina. Otro de sus genes blancos es MIF que se sobre expresa en condiciones de hipoxia. MIF a su vez permite en mantenimiento del crecimiento de tumor y el microambiente hipóxico pues la activación de la vía de las MAPK induce la sobre-expresión de genes pro-angiogénicos como IL-8 y VEGF [54].

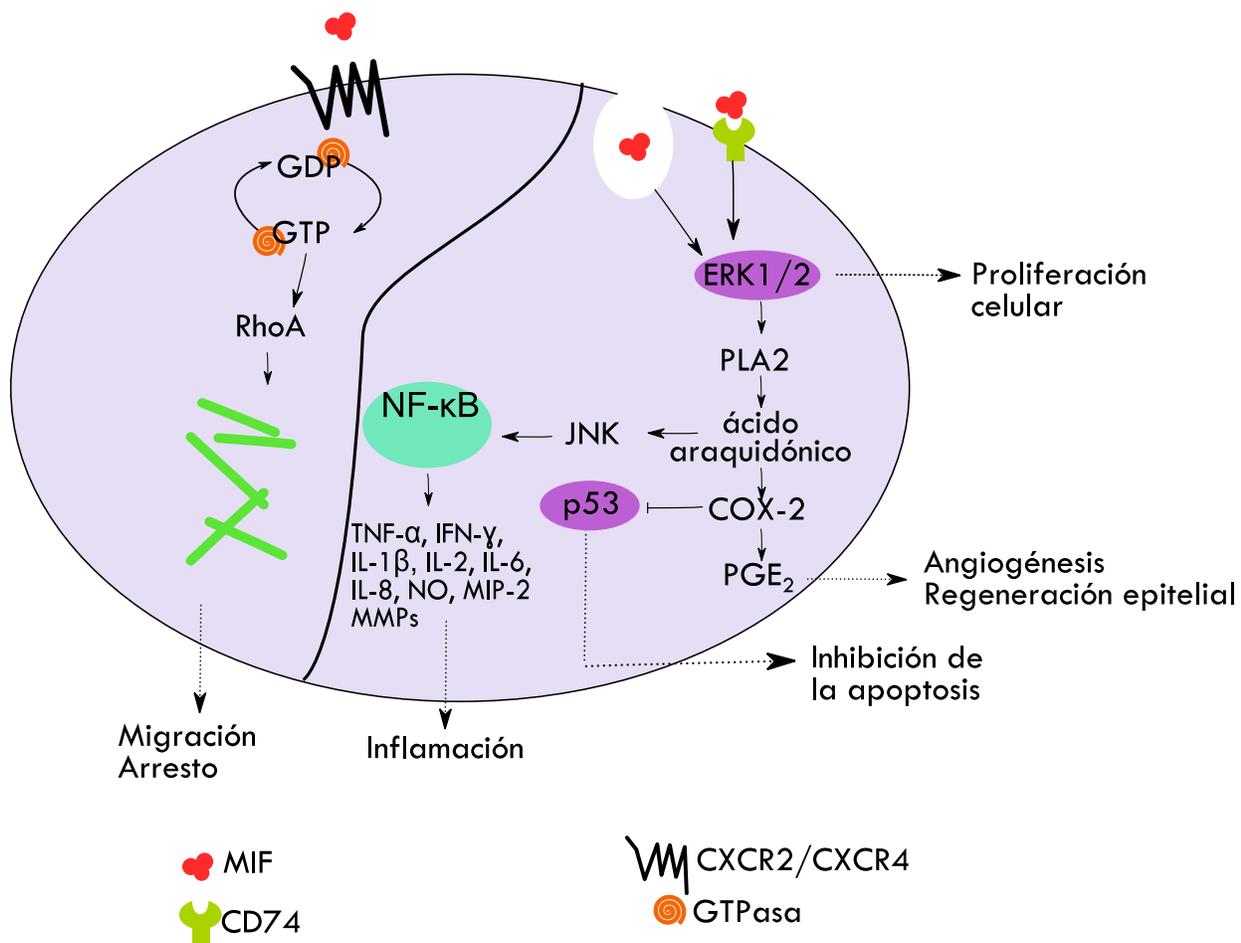


Figura 3. Mecanismo de acción de MIF. MIF puede mediar diversas funciones biológicas a través de la vía clásica (unión de MIF a su receptor CD74) o la vía no clásica (endocitosis). Tales funciones incluyen la expresión de ERK1/2, la inhibición de la apoptosis mediada por p53 y la producción de citocinas.

5.1.1 MIF y el cáncer colorrectal

MIF está directamente relacionado con la regulación de características celulares involucradas en el desarrollo de cáncer, por lo cual se ha propuesto como un blanco terapéutico en el control y tratamiento del cáncer colorrectal. Por lo tanto se han realizado diversos estudios para evaluar el papel de MIF en diferentes modelos de cáncer colorrectal. A continuación se muestran las aportaciones más relevantes para ésta investigación acerca del papel de MIF en cáncer colorrectal (ver tabla 2).

Referencia	Aportaciones
Morris, <i>et.al.</i> , 2014[66]	Los fibroblastos humanos (HS738) asociados al estroma tumoral producen MIF. Cuando los fibroblastos sanos fueron expuestos a MIF durante 16 semanas se redujo del número de fibroblastos y se observó un aumento en células epiteliales. MIF contribuye a la transformación de mesénquima a epitelio.
Hogan, <i>et. al.</i> ,2013 [67]	Las células mesenquimales son la principal fuente de PAI-1, mientras que las de cáncer de colon son la principal fuente de MIF; ambos ligandos de CXCR4 y por lo tanto responsables de la migración celular.
Shin, <i>et. al.</i> , 2012 [68]	Tanto MIF como SDF-1 α , ambos ligandos de CXCR4, incrementan la proliferación en línea celular de cáncer de colon (SW480), la adhesión a la fibronectina y la migración. SDF-1α y MIF favorecen la metástasis en cáncer de colon.
Choi, <i>et. al.</i> , 2012 [69]	Los ratones MIF ^{-/-} tenían reducido el número y tamaño de los tumores, un mayor número de células T CD3+,pero menor número de células Treg que en los WT en un modelo de implantación de línea celular de cáncer de colon (CT-26). MIF regula el tráfico de linfocitos T.
Dessein, <i>et. al.</i> , 2010[70]	La inhibición de MIF o CXCR4 disminuye los niveles de colagenasa I, y por lo tanto la invasividad en línea celular de cáncer de colon resistente a medicamentos (HT-29); además de que dichas células vuelven a ser susceptibles a tratamientos farmacológicos. MIF favorecen la metástasis en cáncer de colon.
Lee, <i>et. al.</i> ,2008[71]	MIF es un posible como marcador de diagnóstico de cáncer colorrectal al ser más sensible (47.3%) que el CEA (29.5%) utilizado comúnmente en la detección de la patología. A pesar de que no existen reportes sobre su uso clínico como biomarcador para cáncer colorrectal se sabe que MIF si es utilizado para la detección de cáncer de ovario [72].
He, <i>et. al.</i> ,2008 [46]	Concentraciones altas de MIF en suero se correlacionan con el riesgo de metástasis en pacientes humanos con cáncer colorrectal. En tejido colorrectal de pacientes con cáncer, MIF se expresa de 20-40 veces más que en tejido sano; estos niveles de MIF son similares a los de zonas del hígado invadidas. En experimentos <i>in vitro</i> se utilizó MIFr en células de colon, lo que aumentó su invasividad y la expresión de MMP-9 y EGF. Ratones trasplantados con células CT-26 de cáncer colorrectal se les administraron inhibidores de MIF; éstos tuvieron una reducción de la carga tumoral ⁴ . Relacionaron la expresión de MIF con la presencia y desarrollo de cáncer colorrectal.
Yao, <i>et. al.</i> , 2005[73]	La adición de MIFr a células de adenocarcinoma de colon resistentes a la hipoxia (HT29) restituye la apoptosis inducida por hipoxia(HIA); mientras que células susceptibles a la HIA (HCT116) en las que se inhibió MIF mediante el uso de siRNA se volvieron resistentes a la HIA. MIF favorece la apoptosis inducida por hipoxia en líneas celulares de cáncer de colon.
Legendre, <i>et. al.</i> , 2003[74]	Concentraciones altas de galectina-3 en tejido epitelial de tumores de baja agresividad son predictivas de periodos de supervivencia más cortos en pacientes con cáncer colorrectal ya que la galectina favorece la proliferación celular y metástasis. Mientras en tumores de alta agresividad o metastásicos altas concentraciones de MIF en tejido conectivo se relacionan con un buen pronóstico en cuanto al tiempo de supervivencia. Propusieron galectina-3 y MIF como marcadores biológicos de

	agresividad de cáncer colorrectal.
Sun, <i>et. al.</i> ,2005 [75]	La inhibición MIF utilizando siRNA (de manera <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>) redujo la invasión y la transducción de ácido lipofosfatídico el cual induce la vía de Rho y la fosforilación de la cinasa de adhesión y la expresión de integrina B-1. MIF promueve la invasión y metástasis a través de la vía Rho.
Ogawa, <i>et. al.</i> , 2000[76]	La terapia anti-MIF inhibió el crecimiento tumoral en el modelo de cáncer de colon con línea celular colon 26, mientras que la inhibición de MIF en tejido conectivo redujo la angiogénesis. MIF favorece la tumorigénesis al promover la angiogénesis.

Tabla 2. MIF en el cáncer colorrectal. Abreviaturas: MIFr (MIF recombinante), PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno-1), SDF-1 α (factor derivado de células estromales), CEA (antígeno carcinoembrionario), siRNA (RNA de silenciamiento).

⁴**Carga tumoral:** Se le denomina así al número y tamaño de los tumores en cada individuo.

JUSTIFICACIÓN

Los antecedentes mencionados demuestran que MIF juega un papel crítico en la inflamación del colon, el desarrollo de la IBD, y clara participación en el desarrollo y propagación de diversas patologías cancerígenas. Sin embargo, la participación de MIF en la promoción de la IBD al cáncer colorrectal no ha sido explorada. En consecuencia la base molecular de su mecanismo de acción tampoco. Para profundizar la investigación en esta materia, nosotros proponemos examinar las características patológicas del CCR asociado a la colitis (CAC) experimental inducida con azoximetano (AOM) y dextrán sulfato de sodio (DSS) en ratones deficientes en el gen de MIF (ratones MIF^{-/-}).

HIPÓTESIS

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) favorece de manera importante en el proceso inflamatorio inicial y sus propiedades de quimioatrayente celular obstruyen el desarrollo del cáncer colorrectal asociado a colitis; entonces observaremos un incremento en la carga tumoral en ratones MIF^{-/-} y el porcentaje de células infiltradas respecto a sus controles silvestres en un modelo murino.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las bases del mecanismo de acción de MIF en la modulación del desarrollo del cáncer colorrectal asociado a colitis en un modelo *in vivo* inducido con AOM y DSS.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Verificar la presencia o ausencia del gen MIF en los ratones WT y MIF^{-/-} mediante genotipificación por PCR.
2. Establecer un modelo de cáncer de colon asociado a colitis en ratones MIF^{-/-} y WT con AOM y DSS.
3. Monitorear el desarrollo de la patología en los ratones MIF^{-/-} y WT mediante el monitoreo de síntomas clínicos.
4. Monitorear la mortalidad en ratones MIF^{-/-} y WT durante los 68 días del desarrollo del modelo.
5. Medir niveles de citocinas en suero de sangre periférica mediante técnica de ELISA.
6. Valorar la carga tumoral en el colon al final del modelo mediante el conteo y medición de los tumores.
7. Realizar un análisis y comparación histológica en el colon de ratones MIF^{-/-} y WT al final del modelo mediante la tinción con hematoxilina y eosina.
8. Analizar mediante citometría de flujo de las poblaciones de células inmunes presentes en lámina propia de colon al final del modelo.
9. Medir niveles de citocinas en suero mediante técnica de ELISA en el colon de los ratones al final del modelo.
10. Determinar la polarización de los macrófagos presentes en el tejido tumoral mediante técnica de RT-PCR.

METODOLOGÍA

Animales

Se eligieron ratones hembras BALB/c de 6 semanas de edad, WT y deficientes de MIF (MIF^{-/-}) por la susceptibilidad de la cepa a desarrollar cáncer colorrectal [77]. Los ratones se obtuvieron del bioterio de la FES-Iztacala (México). Se almacenaron y 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. Los ratones fueron almacenados en cajas de policarbonato con encamado de viruta de madera en grupos de cinco o seis 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.

Genotipificación

La pureza de la colonia se verificó mediante la genotipificación de los ratones de todos los grupos. Se obtuvo y purificó DNA de la parte distal de la cola siguiendo el método de Laird reportado previamente[78]. Se amplificaron los genes *Mif* y *Neomicina* para comprobar su presencia o ausencia en las colonias de ratones WT y MIF^{-/-} mediante PCR en el termociclador (BIOEXP CYCLE) con el kit Ampliqon III Taq DNA Polymerase a una temperatura de alineación de 56°C. Posteriormente se revelaron los productos de la amplificación de dichos genes con bromuro de Etidio mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5% (Anexo 1).

Se utilizaron los desoxioligonucleotidos específicos para el reconocimiento del gen *Mif*

MIF-F 5'- AGA CCA CGT GCT TAG CTG AG-3'

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

Y para el gen *Neomicina* (NEO)

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

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

Desarrollo de cáncer colorrectal

Se utilizó una variante del modelo desarrollado por Neufert (2007) para cáncer colorrectal asociado a inflamación crónica, el cual consiste en una inyección única de azoximetano (12mg/kg peso del ratón) vía intraperitoneal y 3 ciclos de dextrán sulfato de sodio al 2% disuelto en agua para beber durante 7 días. Cada ciclo de DSS 2% es seguido por 15 días de descanso donde el agua para beber está libre de DSS [79] (Figura 4).

Se formaron cuatro grupos: Ratones WT control (WT CTL), WT con AOM y DSS (WT CAC), MIF^{-/-} control (MIF^{-/-} CTL) y MIF^{-/-} con AOM y DSS (MIF^{-/-} CAC).

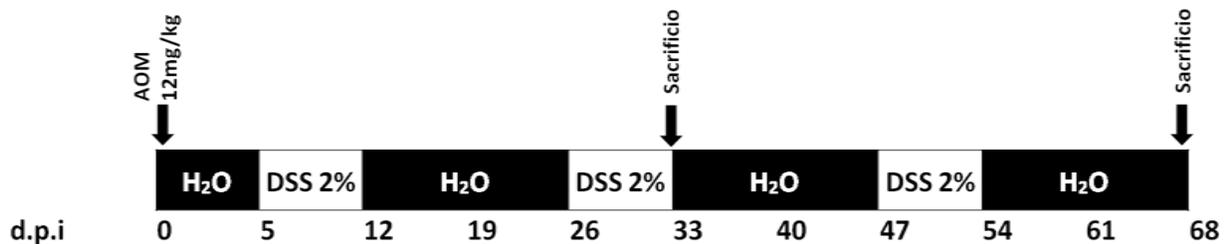


Figura 4. Esquema del curso experimental para el desarrollo de cáncer colorrectal asociado a inflamación crónica. El modelo inicia con una inyección de azoximetano (AOM) 12 mg/kg de peso del ratón seguido de tres ciclos de dextrán sulfato de sodio (DSS) 2% disuelto en agua para beber durante 7 días a los 5, 26 y 47 días post inducción (d.p.i.).

Monitoreo del desarrollo de cáncer colorrectal

Durante los 68 días que dura el desarrollo del cáncer colorrectal en el modelo murino, se monitorearon los síntomas clínicos cada semana (cada siete días), estos incluyeron: la determinación del peso con ayuda de una balanza granataria con canastilla (OHAUS); se determinó visualmente presencia de sangrado rectal, y/o diarrea y se registró la mortalidad.

Medición de citocinas en suero de sangre periférica

Se obtuvo suero de sangre periférica antes de la inyección con AOM considerando este como el día 0 post inducción (0 p.i.), después de la inyección con AOM se obtuvo suero en el día 5 p.i, y después de cada ciclo de DSS 2% (12, 33, 54 días p.i) y al final del modelo (68 días p.i.). Para ello se dilató la vena caudal de los ratones sometiéndolos por 45 segundos a 35°C para proceder hacer un pequeño corte en la cola distal y por goteo recaudar alrededor de 500 µl de sangre periférica.

Posteriormente se centrifugó la sangre a 3000 rpm durante 10 min y se obtuvo el sobrenadante. Los sueros obtenidos se centrifugaron dos veces para la eliminación total de posibles residuos de eritrocitos. El suero se almacenó a -70°C hasta su uso en la determinación de citocinas.

Para determinar el perfil Th1/Th2 a nivel sistémico se midieron los niveles de las citocinas TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, IL-10 e IL-5 mediante un ensayo multiplex basado en el principio de ELISA Sandwich, con Bio-plex Magpix (BIORAD) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Longitud del colon y conteo de tumores

68 días después de la inyección con AOM se sacrificaron los ratones y se obtuvo el colon, se midió la longitud desde el ciego hasta la parte distal del ano.

Se abrió el colon longitudinalmente y se lavó con solución salina fría. Se contó el número y se determinó tamaño de los tumores por medio de un vernier digital.

Análisis histológico

Especímenes de la parte distal del colon de 0.5 cm de longitud fueron evaluados mediante microscopía de luz por un histopatólogo que desconocía el tratamiento administrado a cada ratón. El tejido se fijó con paraformaldehído amortiguado al 4% (Anexo 2), posteriormente se deshidrató, se embebió en parafina y se cortó cada 5 μ m.

Las laminillas se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para determinar el grado de displasia, tipo de pólipo, criptas y morfología de las células caliciformes (Anexo 2).

La identificación de las características histopatológicas se realizó siguiendo la guía de [80]. Además, se les asignó un grado de avance con base en la clasificación de Dukes [81, 82].

Obtención de células de lámina propia de colon

El colon comprende desde la parte distal del ciego y hasta la parte distal del recto. Se obtuvo el colon de cada ratón experimentales, los cuales fueron tratados individualmente; como se describe en la parte superior, fueron lavados en solución salina fría (4°C) y abiertos longitudinalmente. Se obtuvieron células del colon mediante incubaciones consecutivas con RPMI 1X (SIGMA)+ 0.056% EDTA libre de SFB 10 mM a 37°C durante 30 min para despegar las células epiteliales, posteriormente se volvieron a incubaren 5 ml de RPMI 1X + 0.013% de Colagenasa tipo IV

(SIGMA), a 37°C durante 30 min para obtener las células de la lámina propia. La suspensión celular se filtró con tela de organza y se obtuvo un botón celular mediante centrifugación (1500 rpm durante 10 min a 4°C). Finalmente las células fueron aisladas mediante un gradiente de Percoll al 40% y 75% (Anexo 3). Las células de la lámina propia se colectaron y lavaron para ser usadas para citometría de flujo.

Anticuerpos y citometría de flujo

Para determinar las poblaciones de células inmunes presentes en la lámina propia del colon se utilizaron los siguientes anticuerpos de BioLegend enlistados en la tabla 2.

Tinción	Marcador	Fluorocromo acoplado
Linfocitos T	TCR- β chain	APC
	Anti-CD4	PE
	Anti-CD8	FITC
Linfocitos B	Anti-CD40	FITC
	Anti-CD19	PE
Células Natural Killers	Anti-CD49b Pan NK	FITC
	Anti-CD69	PercP
Células dendríticas	Anti-CD11c	APC
	Anti-MHC II	FITC
Macrófagos	Anti-F4/80	APC
	Anti- MHC II	FITC

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la identificación de células inmunes

Las células de la lámina propia recién aisladas se tiñeron con $1\mu\text{g}/1 \times 10^6$ células de cada anticuerpo siguiendo las instrucciones del fabricante y se fijaron en paraformaldehído amortiguado 4%. Al día siguiente se realizó la citometría de flujo con un citómetro FACScallibur. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa Flowing Software 2.

Medición de citocinas *in situ*

Al final del tratamiento se obtuvieron 0.5 cm de colon por ratón y se almacenaron en búfer de RIPA hasta su uso (Anexo 4).

Para obtener las proteínas se disgregó el tejido utilizando el homogenizador Bulletblender (NEXT ADVANCE) 4 min en nivel 8, se centrifugó el macerado a 13,000 rpm durante 15 min a 4°C para obtener el sobrenadante que debe mantenerse en hielo o en congelación (-70°C) si no se usa inmediatamente.

Las proteínas obtenidas se cuantificaron mediante la técnica de Lowry (Anexo 5). Se colocaron 800 µg/ml de proteína y se midieron las citocinas IL-4 e IL-10 para determinar el perfil Th1/Th2 mediante un ensayo multiplex con Bio-plex Magpix (BIORAD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Determinación de la polarización de los macrófagos infiltrados en el tumor

Después del sacrificio se cortaron los tumores (aproximadamente 0.5 cm de colon), se congeló el tejido en nitrógeno líquido y se maceró hasta obtener polvo. El tejido macerado fue resuspendido en 500 µl de Trizol reagent (SIGMA). Se extrajo el RNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Anexo 6). Se sintetizó cDNA con el kit Super script II (SIGMA) (Anexo 7) y se realizó la reacción de RT-PCR usando la enzima Ampliqoon Polymerase II (SIGMA) (Anexo 8).

Se utilizó como gen constitutivo GAPDH para normalizar la expresión relativa de los genes MIF, Arginasa, Ym-1, TGF-β e iNOS. Posteriormente se revelaron los productos de la amplificación de dichos genes mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5% con bromuro de etidio.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con la prueba *t* de student, se compararon los grupos con CAC entre ellos y su respectivo control, se utilizó el Software GraphPadPrism 6. Se consideró una significancia de $p < 0.05$. Los datos analizados corresponden a 3 experimentos independientes con $n \geq 3$ para cada caso.

RESULTADOS

Verificación de la pureza de la colonia de ratones $MIF^{-/-}$

Para verificar la pureza genética de las colonias de ratones se amplificaron los genes *Mif* y de *Neomicina* (que se expresa únicamente en ratones *knockout* ($MIF^{-/-}$) mediante PCR. Los productos del PCR se revelaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 5) donde se pudo observar la presencia de *Mif* en los ratones wild-type (WT) y su ausencia en ratones $MIF^{-/-}$. Como prueba confirmatoria se amplificó el gen de *Neomicina* el cual se expresó únicamente en los ratones $MIF^{-/-}$. Se descartó la presencia de heterocigotos ($MIF^{+/+}$). Todos los ratones utilizados fueron homocigotos WT ($MIF^{+/+}$) u homocigotos $MIF^{-/-}$.

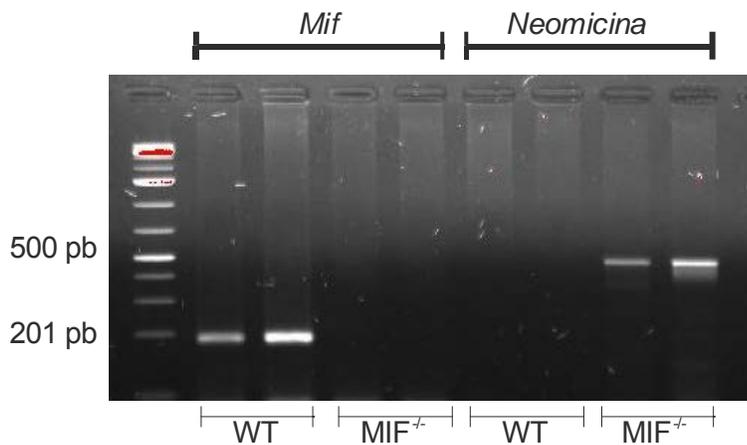


Figura 5. Gel de agarosa donde se observan los productos del PCR para los genes *Mif* (201 pb) y *Neomicina* (500 pb). Se verificó la presencia de *Mif* en los ratones WT y su ausencia en los ratones $MIF^{-/-}$. La ausencia de *Neomicina* en los ratones WT y su presencia en los ratones $MIF^{-/-}$ confirma el genotipo de las colonias.

Desarrollo de la patología

El monitoreo semanal del modelo de carcinogénesis demostró que asemeja ciertos síntomas clínicos del cáncer colorrectal en humanos. El cambio en el peso de cada ratón se observó en relación al peso inicial (100%) (Figura 6). A pesar de que no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los puntos donde se evaluó el peso de los ratones, sí observamos que el patrón de ganancia de peso a través del tiempo fue diferente entre los grupos control (CTL, líneas punteadas) y los grupos con cáncer (CAC, líneas sólidas); incluso entre los grupos WT y $MIF^{-/-}$ con cáncer.

Los ratones MIF^{-/-} mostraron una tendencia a bajar de peso después del primer y tercer ciclo de DSS de manera evidente (aunque no hubo significancia estadística). Estos ratones fueron capaces de recuperar su peso tras 14 días, en los que consumieron agua libre de DSS, pero la mayor parte del tiempo se mantuvieron por debajo del peso del grupo MIF^{-/-} CTL.

Los ratones WT fueron capaces de resistir el primer ciclo de DSS sin bajar de peso, después del segundo ciclo la disminución de peso fue poco evidente, a diferencia tercer ciclo de DSS que causó un pico en la disminución de peso (no significativo). Al igual que los ratones MIF^{-/-}, los ratones WT lograron recuperar su peso tras el periodo de administración de agua.

Observamos diferencias estadísticamente significativas únicamente entre el grupo MIF^{-/-}CAC comparado con el grupo WT CAC en dos puntos: después del primer ciclo de DSS (12 d.p.i.) y al inicio del tercer ciclo de DSS (47 d.p.i.). En el caso del primer ciclo, los ratones MIF^{-/-} CAC (97.32±1.069%) mostraron un decremento de peso con respecto a su peso inicial y en comparación al grupo WT CAC (101.92±1.04%). Para el tercer ciclo los ratones MIF^{-/-} CAC (110.00±0.06%) mostraron decremento de peso con respecto a su peso inicial y en comparación al grupo WT CAC (115.48±0.06%).

La mortalidad y el sangrado rectal (no se muestran los datos) se monitorearon durante todo el desarrollo del modelo. Todos los ratones en todas las repeticiones del experimento sobrevivieron los 69 días, una vez iniciado el modelo.

Observamos diarrea y sangrado rectal en los ratones del grupo MIF^{-/-} CAC a partir del segundo ciclo de DSS, en cambio los ratones WT CAC presentaron únicamente diarrea a partir del segundo ciclo de DSS pero sangrado rectal se evidenció hasta el tercer ciclo de DSS.

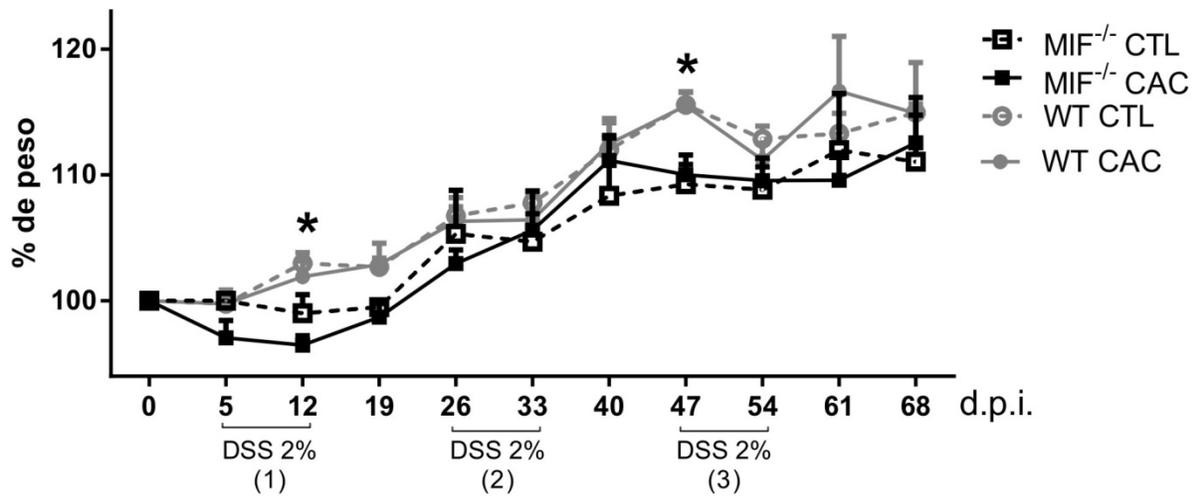


Figura 6. Porcentaje de peso a través del desarrollo de cáncer colorrectal. Ratones control (líneas punteadas) y los ratones con cáncer (líneas sólidas). Gráfico representativo de tres experimentos independientes, n= 15, $p \leq 0.05$, *t* de student. (*= diferencia estadística respecto a los grupos WT)

Citocinas en suero de sangre periférica

Para determinar el tipo de respuesta a nivel sistémico (pro-inflamatoria o anti-inflamatoria) medimos la concentración de citocinas en suero de sangre periférica, al inicio (T0) y durante desarrollo del modelo experimental de CAC (ciclo 1, 2 y 3 de la administración de DSS: DSS1, DSS2 y DSS3 respectivamente) y al final del modelo experimental. A pesar que se observaron algunas variaciones en la concentración de citocinas sistémicas en diferentes puntos de cada una de ellas, éstos no fueron estadísticamente significativos.

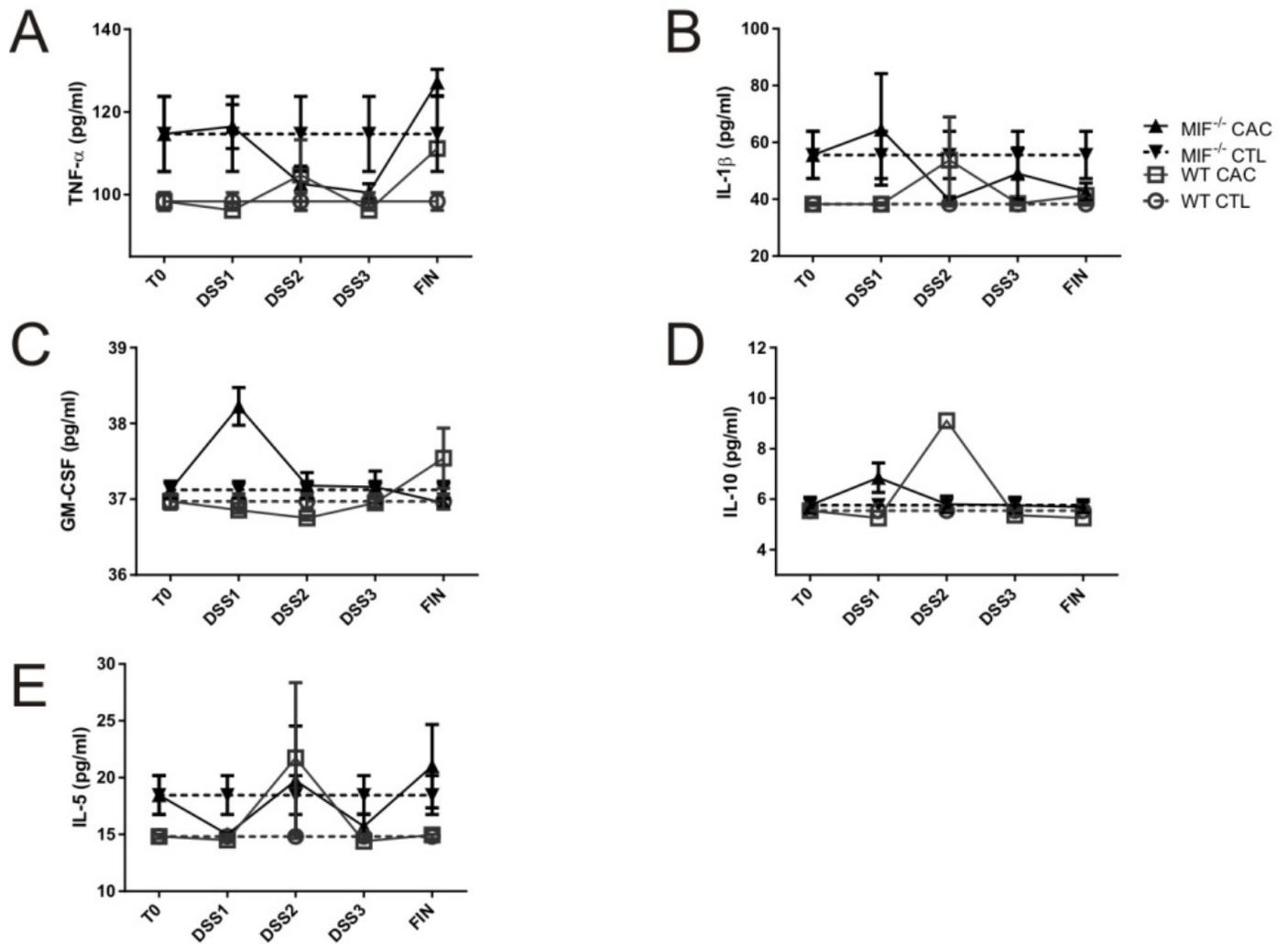


Figura 7. Perfil de citocinas en suero de sangre periférica. En cada gráfica se muestran las concentraciones de citocinas en pg/ml en los ratones con cáncer (líneas sólidas) en comparación con los ratones control (líneas punteadas). Promedio de dos experimentos independientes, n= 5. $P \leq 0.05$, t de student.

Análisis macroscópico del intestino grueso

La disminución del tamaño de los intestinos en los grupos con cáncer (Figura 8A) fue significativa en comparación a los ratones sanos. El largo total del intestino grueso del grupo WT CAC (6.11 ± 0.005 cm) fue significativamente menor que el largo en el grupo WT CTL (6.90 ± 0.008 cm) (Figura 8B, WT). Del mismo modo el grupo MIF^{-/-} CAC (7.17 ± 0.238 cm) mostró reducción del largo del colon con respecto a su control, el grupo MIF^{-/-} CTL (8.50 ± 0.346 cm) (Figura 8 B, MIF^{-/-}).

La diferencia entre medias fue menor entre los grupos WT CTL y WT CAC (0.79 cm) que entre los grupos MIF^{-/-} CTL y MIF^{-/-} CAC (1.33 cm). También las medias del largo de los intestinos entre WT CAC y MIF^{-/-} CAC fueron estadísticamente diferentes (1.06 cm).

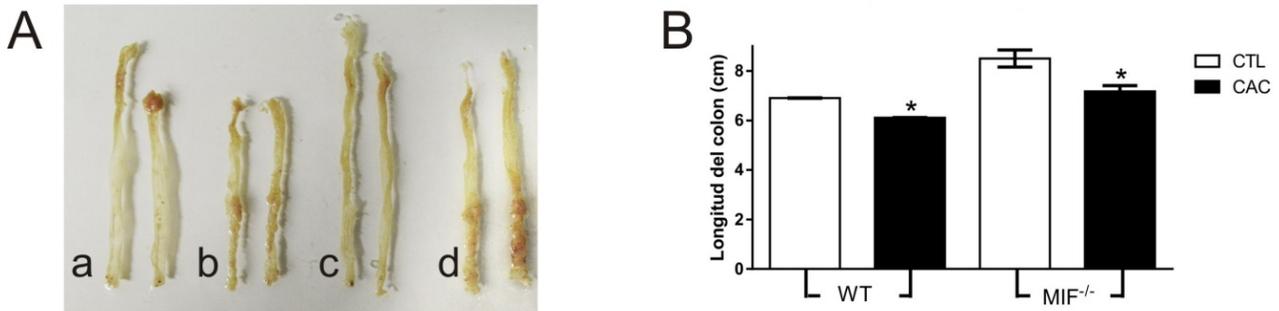


Figura 8. Tamaño del colon en grupos con CAC con respecto a su control. A) Comparación entre el largo de los intestinos gruesos en cada grupo. Intestinos gruesos de ratones WT CTL (a), de ratones WT CAC (b), ratones MIF^{-/-} CTL y ratones MIF^{-/-} CAC (d). B) Longitud del intestino grueso (cm) al final del modelo experimental. Promedio de tres experimentos independientes, n= 5 c/u. * p≤0.05, t de student.

El número de tumores (Figura 9) se hizo visible gracias a la aplicación superficial de azul tripano (Figura 9A). Al final del experimento el grupo de los ratones MIF^{-/-} CAC desarrolló 24±2.1 tumores, mientras que los ratones WT CAC 12±2 tumores (Figura 9B). Las diferencias entre el número de tumores entre ambos grupos fue estadísticamente significativa (p≤0.05).

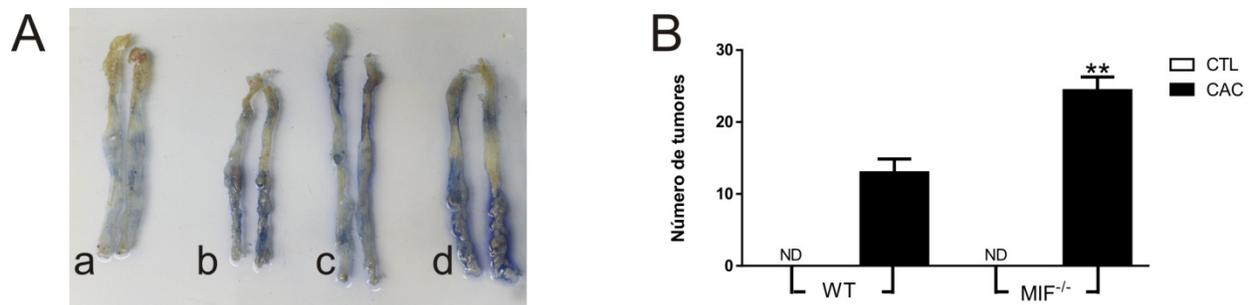


Figura 9. Número de tumores por intestino en los grupos WT CAC y MIF^{-/-} CAC. A) El número de tumores se hizo evidente mediante el uso de azul tripano de manera superficial. A) intestinos de ratones WT sanos (a), intestinos de ratones WT con CAC (b), intestinos de ratones sanos MIF^{-/-} (d), intestinos de ratones MIF^{-/-} con CAC (d). B) Número de tumores contabilizados al final del experimento. ND = No detectados. Promedio de tres experimentos independientes con n= 5 c/u. *p < 0.05, t de student.

Los ratones de ambos grupos, WT y MIF^{-/-}, con CAC desarrollaron pólipos de diferentes tamaños (Figura 10). Los ratones del grupo WT CAC desarrollaron en su mayoría pólipos ≤0.5 mm (47.69%), seguido por pólipos entre 1.1 a 2 mm (16.92%), de 2.1 a 3 mm (12.31%) y de 0.5 a 1 mm (6.15%); en menor porcentaje desarrollaron pólipos grandes considerados entre 4.1 a 5 mm (3.08%) y de 5.1 a 6 mm (1.54%) (Figura 10 A).

Los ratones MIF^{-/-} CAC desarrollaron pólipos de mayor tamaño, principalmente entre 1 y 3 mm (48.28%), seguido por un porcentaje importante de pólipos entre 3.1 y 4 mm (22.41%); cabe destacar que el porcentaje de pólipos grandes entre 4.1 y 5 mm (13.79%) y 5.1 y 6 mm (12.07%) fue mucho mayor en éste grupo que en los ratones WT. En los ratones MIF^{-/-} CAC se presentaron pólipos pequeños de 1.1 a 2 mm en el menor porcentaje (3.45%) y no se registraron pólipos menores a 0.5 mm (Figura 10B).

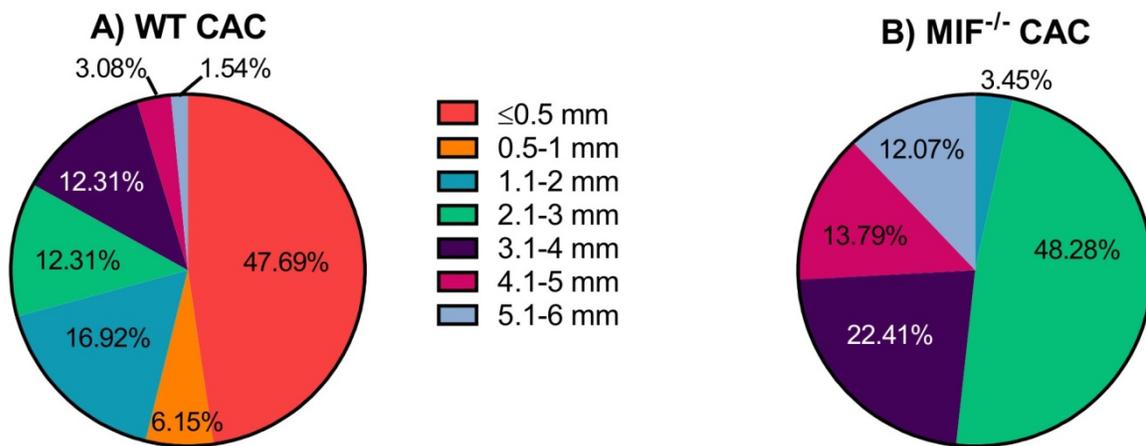


Figura 10. Tamaño de tumores en ambos grupos WT y MIF^{-/-} con CAC. Los ratones del grupo WT CAC (A) desarrollaron mayormente pólipos ≤0.5 mm mientras que los ratones MIF^{-/-} CAC (B) desarrollaron pólipos de mayor tamaño, principalmente entre 2-3 mm.

Análisis histológico

El análisis histológico se llevó a cabo sobre muestras teñidas con Hematoxilina y Eosina (H&E) (Figura 11) reveló que los ratones WT y MIF^{-/-} sanos mantuvieron la morfología histológica normal del intestino grueso, la morfología de las criptas fue uniforme y el grosor normal del tejido muscular (→) (Figura 11A, D de ratones WT; y G, J de ratones MIF^{-/-}). Mientras que los grupos con CAC WT y MIF^{-/-} perdieron la morfología de las criptas intestinales por la formación de pólipos (Figura 11 B,C, E, F en ratones WT y H,I, K, L en ratones MIF^{-/-}).

En el caso de los ratones WT CAC se presentaron pólipos de tipo inflamatorio con adenoma principalmente de tipo tubular (Figura 11B)(┆). La presencia de núcleos alargados pseudoestratificados reveló displasia de bajo grado (Figura 11E) (●). Además de la presencia de focos de criptas aberrantes (Figura 11E) (*), que contienen células inmunes, principalmente células polimorfonucleares con bajo grado de displasia (●), y la formación de abscesos crípticos (▲). Por otro lado el infiltrado inflamatorio fue notoriamente mayor y la invasión se localizó únicamente en el tejido epitelial (Figura 11 C y F) (■), en la clasificación Dukes se encuentra en la etapa A.

En los ratones MIF^{-/-} CAC se observaron pólipos adenoma-vellosos (Figura 11H) (┆). La morfología de los núcleos y la pérdida de polaridad en cuanto a su posición dentro de las criptas indican que se trata de displasia de alto grado. También encontramos presencia de focos de criptas aberrantes (Figura 11 K) (*) con bajo grado de displasia (●), y la formación de abscesos crípticos (▲). En éste caso observamos menor cantidad de infiltrado inflamatorio en el tejido de los MIF^{-/-} CAC que en los ratones WT CAC (Figura 11 I, L) (■). La invasión se extendió hasta el tejido muscular (→); en la clasificación Dukes se encuentra en etapa B.

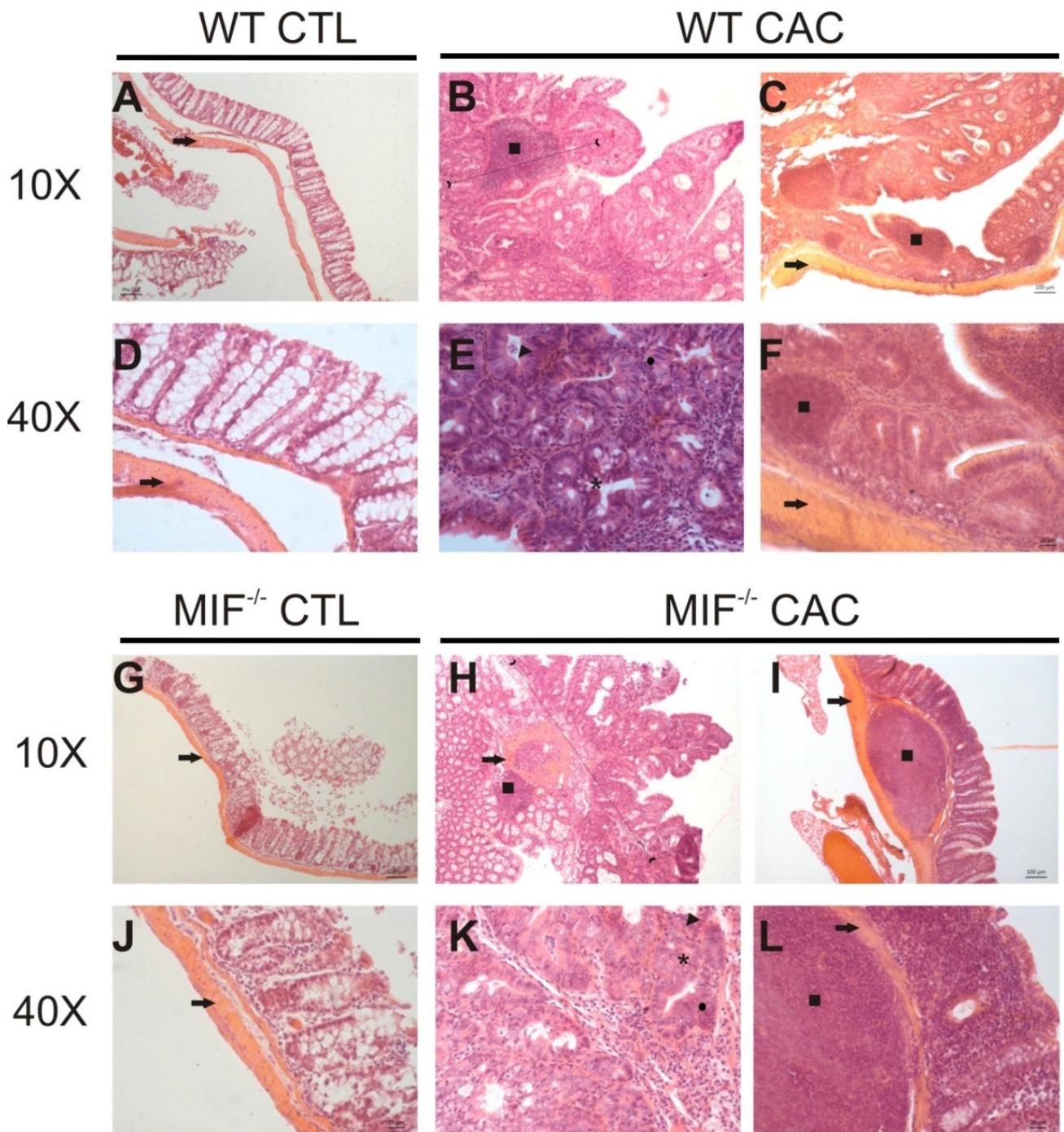


Figura 11. Cortes histológicos de intestino grueso al día 68. Imágenes de intestino grueso teñidas con H&E, representativas de dos experimentos independientes. Los cortes se hicieron de 5 μm de grosor de tejido incluido en parafina. Las imágenes fueron tomadas a 10X y 40X con un microscopio confocal invertido (CARL ZEISS). En A, D, G y J la morfología de las criptas es uniforme y el grosor del tejido muscular (\rightarrow) normal. En B se observan pólipos inflamatorios (H), en C y F alto infiltrado inflamatorio (■), en E presencia de focos de criptas aberrantes (*) con bajo grado de displasia (•), y la formación de abscesos crípticos (\blacktriangle). En H se observan pólipos adenoma-vellosos (H), en I y L alto infiltrado inflamatorio (■) en el tejido muscular (\rightarrow), en K presencia de focos de criptas aberrantes (*) con bajo grado de displasia (•), y la formación de abscesos crípticos (\blacktriangle).

Células inmunes implicadas en la patología de CAC

Para determinar las poblaciones celulares infiltradas en el tejido intestinal se analizaron los datos obtenidos mediante citometría de flujo.

Linfocitos T

Durante el análisis de citometría en Dot Plots, la región que se utilizó para identificar las poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ fue mediante la selección de una región de células pequeñas y poco complejas R-1 (Figura 12A rojo). Enseguida se seleccionó una población positiva para TCR-β (azul), la cual contiene los linfocitos T y células NKts (Figura 12 B). En los grupos WT CAC y MIF^{-/-} CAC se observó el aumento de células TCR-β⁺, pero esto no fue estadísticamente significativo comparados con sus controles respectivos (Figura 12 C).

Con las regiones arriba descritas se compararon las poblaciones positivas para CD4⁺ y CD8⁺. En la figura 12D eje de las Y, se puede apreciar el porcentaje de células T CD4⁺ que fue significativamente mayor en los ratones WT CAC (71.38±2.7%) comparado con ratones WT CTL (62.28±2.28%). En el caso de MIF^{-/-} CAC (67.97±2.06%) también se observó aumento significativo comparado con los ratones MIF^{-/-} CTL (55.48±9.41%). Es decir, el infiltrado de células TCD4⁺ se incrementó significativamente en los ratones WT CAC y MIF^{-/-} CAC comparados con sus controles respectivos. No hubo diferencias significativas entre los grupos WT CAC y MIF^{-/-} CAC.

En la figura 12D eje de las X, se puede apreciar que el porcentaje de células T CD8⁺ fue significativamente menor en ratones WT CAC (13.96±2.99) en comparación con el grupo WT CTL (20.12±0.47%), el mismo patrón se observó en los ratones MIF^{-/-} CAC (14.31±1.63%) comparado con MIF^{-/-} CTL (21.86±0.55%). No se observaron diferencias significativas entre los grupos WT CAC y MIF^{-/-} CAC.

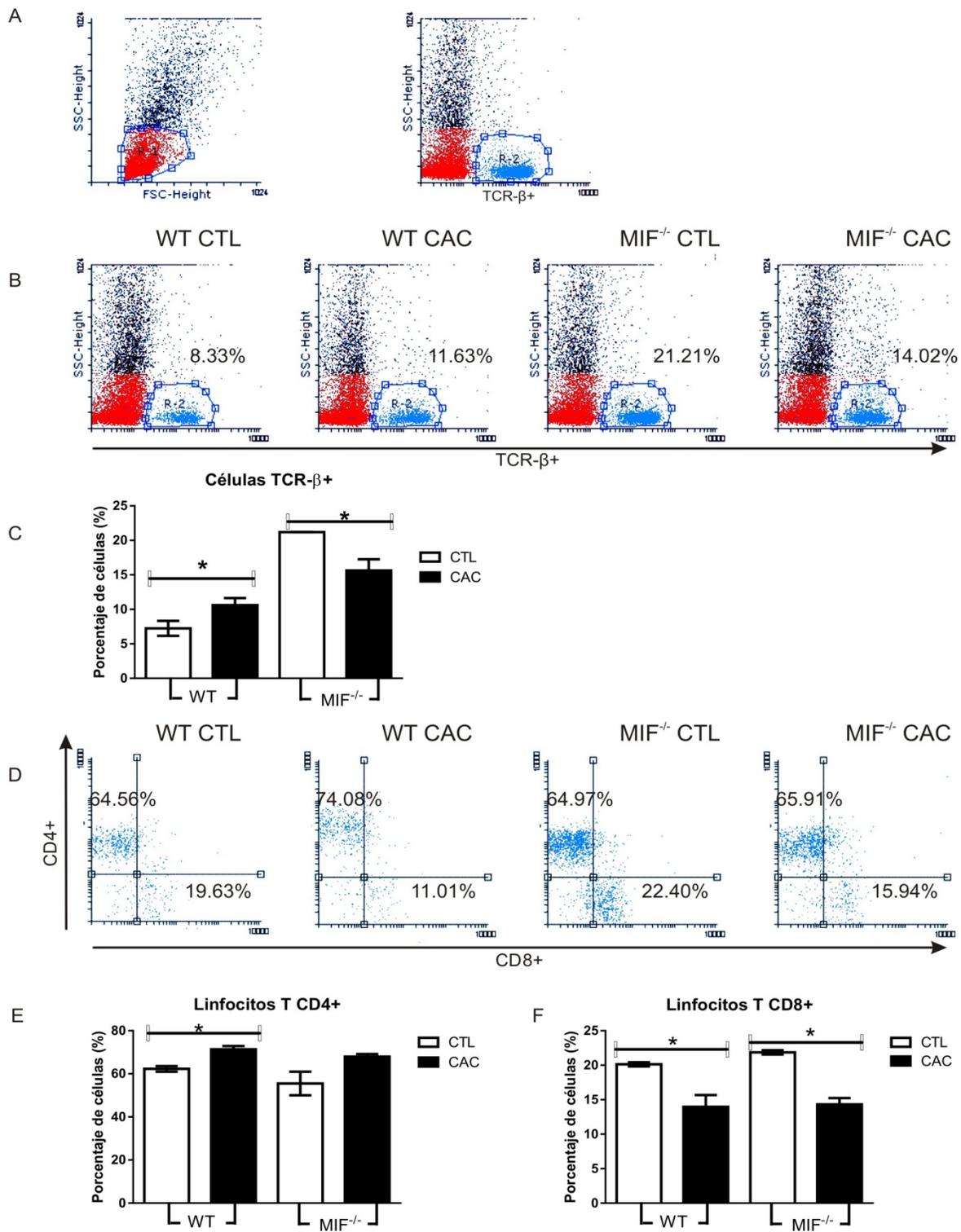


Figura 12. Porcentaje de células TCR-β⁺, linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ en lámina propia del intestino grueso. A) La región R-1 seleccionada para obtener las células TCR-β⁺. B) Panel representativo de los dot plots obtenidos para TCR-β⁺ (R-2) C) Figura representativa del porcentaje de células TCR-β⁺ D) Panel representativo de los dotplots obtenidos para CD4 vs CD8 a partir de R-2. E) Figura representativa del porcentaje de células T CD4⁺ las barras representan la media de los porcentajes ± error estándar (SE). F) Figura representativa del porcentaje de linfocitos T CD8, las barras representan la media de los porcentajes ± error estándar (SE). *p<0.05

Linfocitos B

A partir de la selección de una región de células pequeñas y poco complejas, a la que se denominó región de linfocitos (Figura 13A rojo), se hizo el análisis de las células B (Figura 13A azul), se determinó el porcentaje de eventos positivos para CD19⁺ (presente en células B). Para la determinación de la población positiva para CD19 se utilizó un control negativo con fluorocromo PE (Figura 13A ISOTIPO).

En los grupos WT CAC y MIF^{-/-} CAC se observó una disminución significativa de células CD19⁺, comparados con sus controles respectivos (Figura 13B).

Además, a partir de la región de linfocitos se compararon las poblaciones positivas para CD19 y CD40 (presente en células B maduras). El porcentaje de células B activadas (CD19⁺ CD40⁺) fue significativamente menor en los ratones WT CAC (41.14±5.64%) con comparación a los del grupo WT CTL (68.83±0.35%), el mismo patrón se observó en los ratones MIF^{-/-} CAC (40.48±1.86%) comparado con MIF^{-/-} CTL (47.78±1.22%) (Figura 13 C y D). Mientras que no hubo diferencias significativas entre los grupos WT CAC y MIF^{-/-} CAC.

Es decir, los grupos WT CAC y MIF^{-/-} CAC tuvieron menor infiltrado de células B totales y B activadas no importando la condición de WT o MIF^{-/-}.

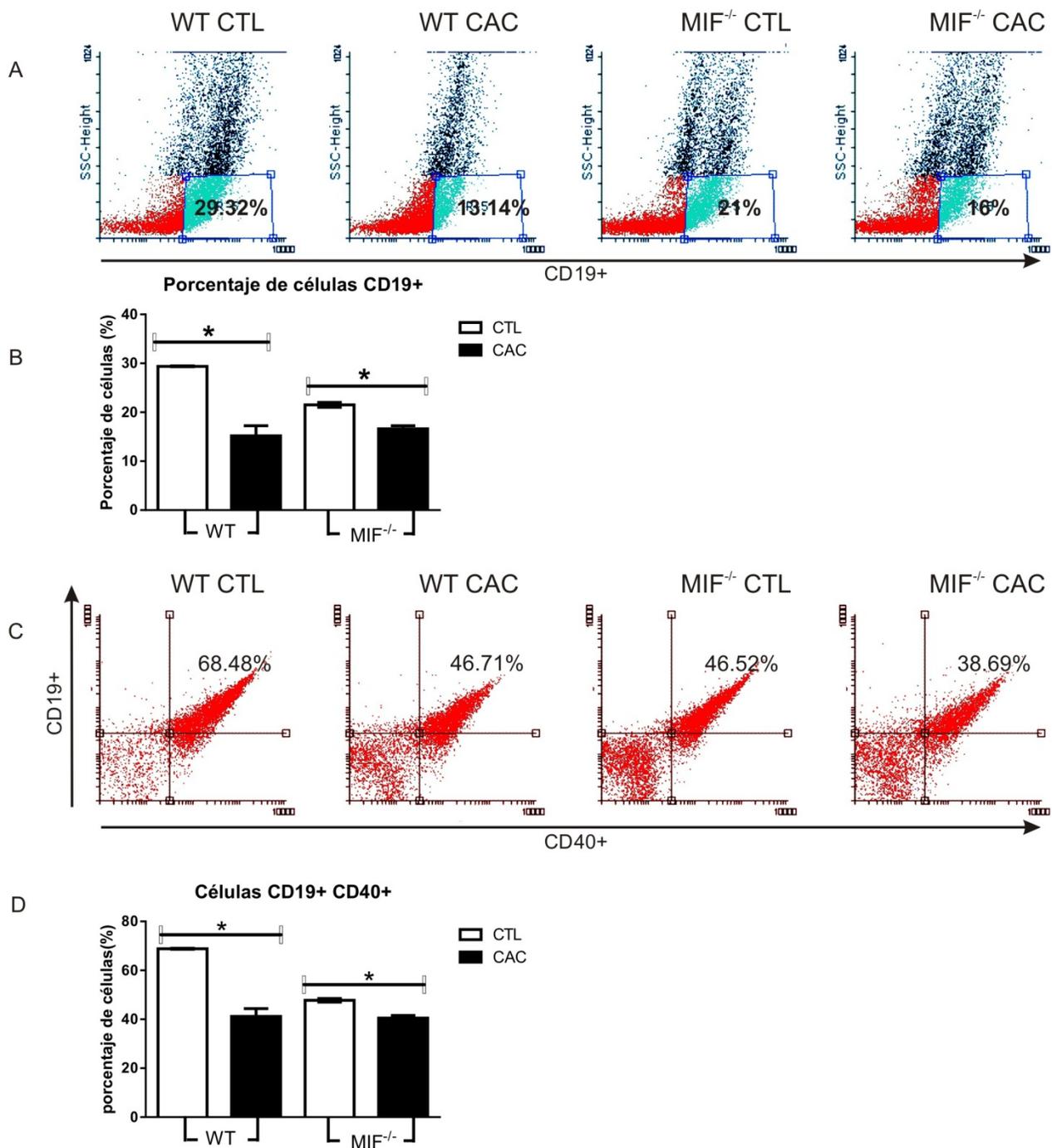


Figura 13. Porcentaje de células B en lámina propia del intestino grueso. A) Panel representativo de dotplots para la identificación de células B. B) Gráfico representativo del porcentaje de células B entre grupos. C) Panel representativo de dot plots para la identificación de células B maduras CD19⁺, CD40⁺. D) Gráfico representativo del infiltrado de células B maduras, las barras representan la media de los porcentajes \pm error estándar (SE). Figuras representativas de dos experimentos independientes, con n= 5 c/u. * p< 0.05, t de student.

Células dendríticas (DCs)

A partir de la selección de una región de células grandes MHC+ (FL1) (Figura 14 A) se comparó el porcentaje de eventos positivos para CD11c (presente en DCs) y MHC-II (presente en células presentadoras de antígeno). Es decir, las células CD11c⁺ MHC⁺ son DCs (Figura 14 B).

Como se puede observar en la figura 11 B, hubo un aumento significativo de DCs que infiltraron el intestino en el grupo WT CAC (55.32±0.57) respecto al grupo WT CTL (18.02±0.17). En el caso del grupo MIF^{-/-} CAC también se observó un incremento importante (36.48±13.31) comparado con el grupo MIF^{-/-} CTL (18.30±1.29). Llamó la atención que el infiltrado de DCs en los grupos MIF^{-/-} CAC fue menor que en los grupos WT CAC.

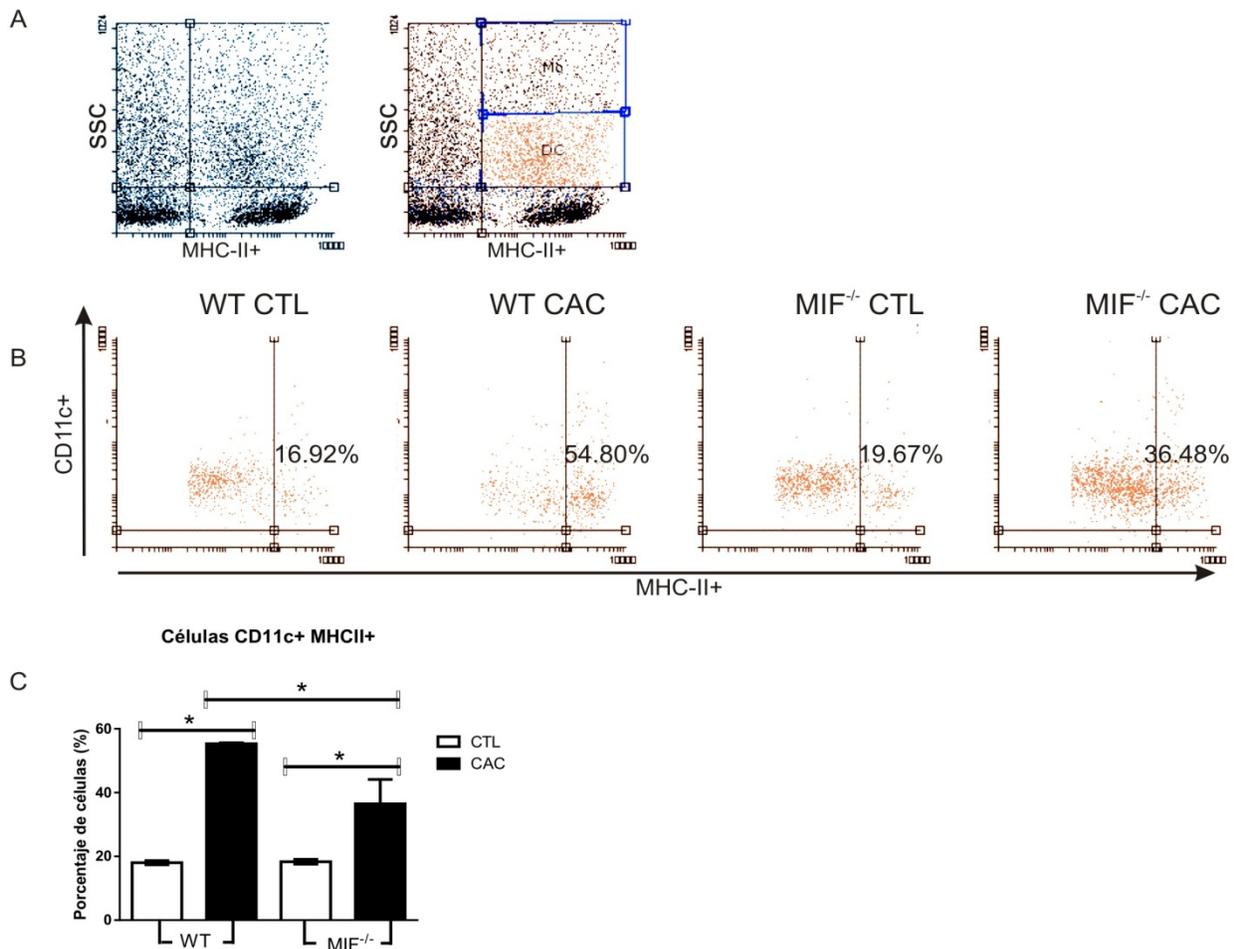


Figura 14. Porcentaje de células dendríticas (DC) en lámina propia del intestino grueso. A) Región que se seleccionó para determinar la población de células complejas y grandes (DC). B) Panel representativo de dot plots para la identificación de DC, CD11c⁺ MHC-II⁺. C) Gráfico representativo de DCs, las barras representan la media de los porcentajes ± error estándar (SE). Figuras representativas de dos experimentos independientes, con n=5 c/u. * p< 0.05, t de student.

Células NK

La región que se utilizó para identificar la población de células NK fue mediante la selección de una región de células pequeñas y poco complejas. De ésta región se seleccionó una región positiva para CD69 (R-4) (Figura 15A verde) (presente en células linfoides activadas). Una vez seleccionada esta región se buscaron las células positivas para CD49b (presente en células NK murinas) (Figura 15B), es decir, células NK activadas.

El número de células NK activadas ($CD69^+ CD49b^+$) fue significativamente mayor en ratones WT CAC (66 ± 6 eventos) con comparación a los del grupo WT CTL (16 ± 3 eventos) (Figura 15 B). El mismo patrón se observó en los ratones $MIF^{-/-}$ CAC (113.8 ± 14.71 eventos) comparado con $MIF^{-/-}$ CTL (20 ± 12 eventos).

El número de NK activadas en los ratones $MIF^{-/-}$ CAC fue significativamente mayor que en los ratones WT CAC ($t=3.006$ $p=0.0429$).

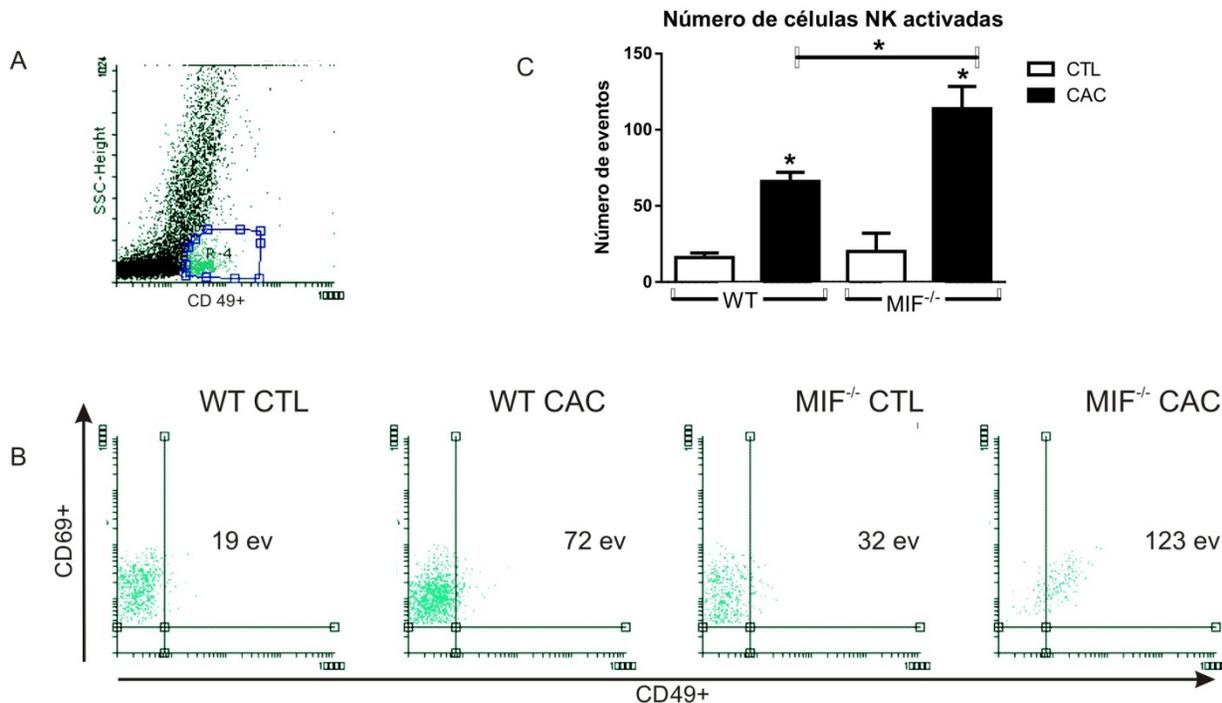


Figura 15. Número de células NK en lámina propia del intestino grueso. A) Región para la selección de las células linfoides activadas. B) Panel representativo de dot plots para la identificación de del número de eventos (ev) de células NK activadas, $CD69^+/CD49^+$. C) Gráfico representativo de células NK activadas infiltradas en la lámina propia del intestino grueso, las barras representan la media del número de eventos \pm error estándar (SE). Figuras representativas de dos experimentos independientes, con $n=5$ c/u. * $p < 0.05$, t de student.

Macrófagos (Mo)

A partir de la selección de una región de células grandes se seleccionaron aquellas positivas para MHC-II (presente en células presentadoras de antígeno) (Figura 16 A). A partir de ésta región se buscaron las células positivas para F4/80 (presente en macrófagos) (Figura 16B).

El número de Mo activados ($F4/80^+ MHC-II^+$) fue significativamente mayor en los ratones WT CAC ($54.21 \pm 0.21\%$) con comparación a los del grupo WT CTL ($12.06 \pm 1.13\%$), el mismo patrón se observó en los ratones $MIF^{-/-}$ CAC ($38.21 \pm 5.73\%$) comparado con $MIF^{-/-}$ CTL ($23.12 \pm 3\%$) (Figura 16 B y C). Sin embargo, el infiltrado de Mo en los grupos $MIF^{-/-}$ CAC fue menor que en los grupos WT CAC (Figura 16 C).

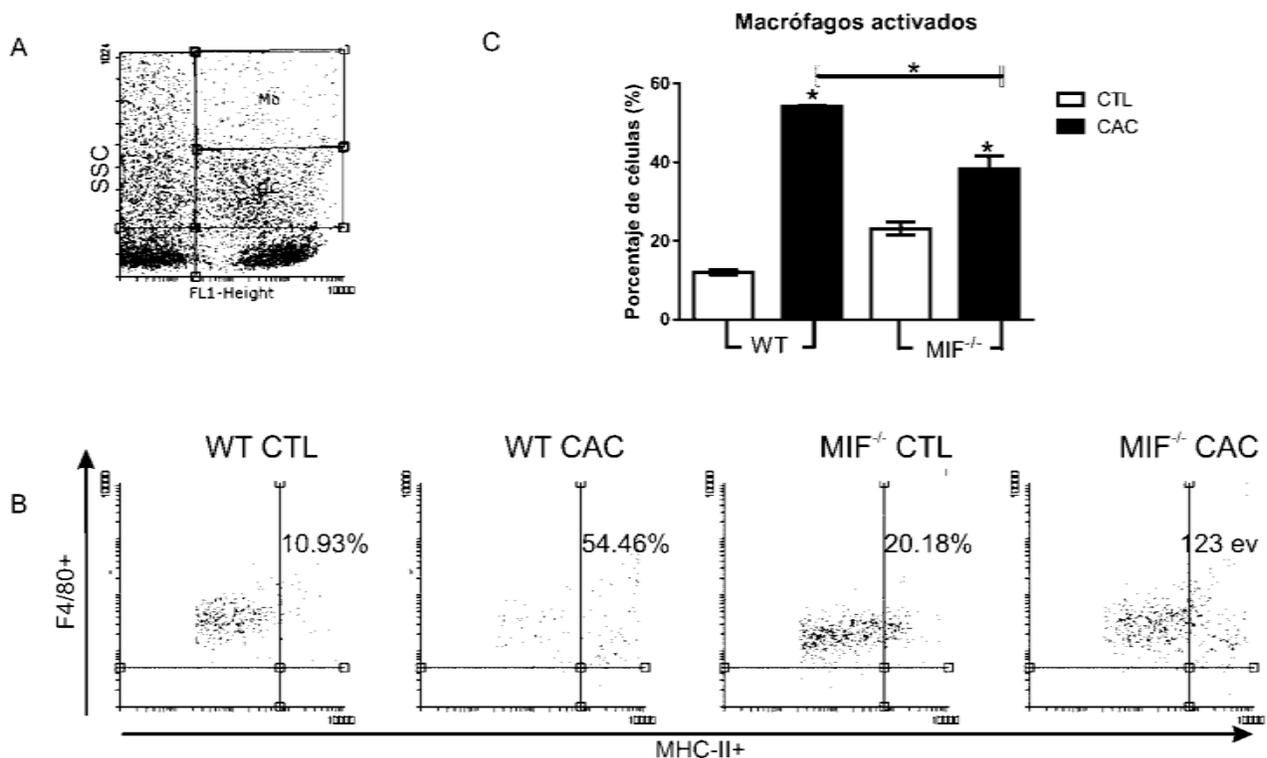


Figura 16. Porcentaje de macrófagos en lámina propia del intestino grueso. A) Región que se utilizó para la selección de macrófagos. B) Panel representativo de dot plots para la identificación de Mo $F4/80^+ MHC-II^+$. C) Gráfico representativo de células Mo infiltrados en la lámina propia del intestino grueso, las barras representan la media de los porcentajes \pm error estándar (SE). Figuras representativas de dos experimentos independientes, con $n=5$ c/u. * $p < 0.05$, t de student.

Perfil de citocinas *in situ* en la región de tumoral del colon

Para determinar el perfil de citocinas en el microambiente tumoral se midieron los niveles de las citocinas IL-1 β , IL-4 e IL-10 (Figura 17).

Los niveles de IL-1 β entre los ratones WT CAC y su control WT CTL no fueron diferentes (Figura 17 A). Mientras que el grupo de ratones MIF^{-/-}CAC tuvo niveles disminuidos de IL-1 β respecto a su control (MIF^{-/-} CTL), WT CAC y WT CTL (Figura 17 A).

Los niveles de IL-4 entre los ratones WT CAC y su control WT CTL no fueron diferentes (Figura 17B). Pero los niveles de IL-4 en los ratones MIF^{-/-} CAC estuvieron incrementados respecto a su control MIF^{-/-} CAC (Figura 17 B).

En el caso de los niveles de IL-10 no se observaron diferencias significativas entre el grupo WT CAC (2.53 \pm 0.69) y WT CTL (2.22 \pm 0.19); pero el grupo MIF^{-/-} CAC (4.487 \pm 0.5333) sí presentó un incremento significativo comparado contra MIF^{-/-} CTL (1.900 \pm 0.0), WT CAC y WT CTL (Figura 17C).

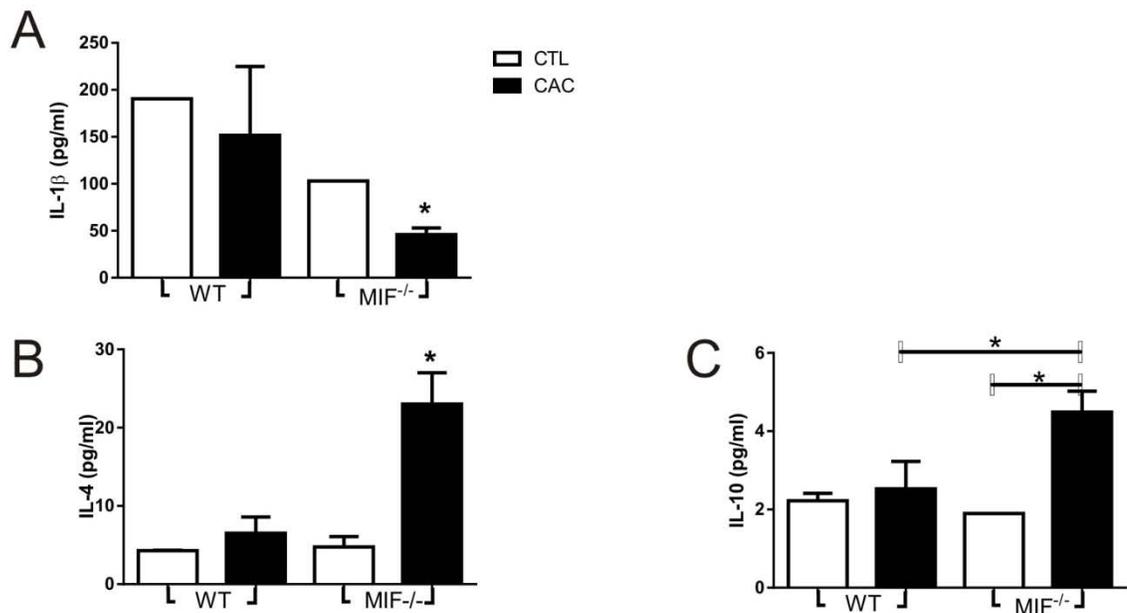


Figura 17. Concentraciones de IL-1 β , IL-4 e IL-10 *in situ* en la región tumoral del colon al final del experimento. Gráficos representativos de 2 experimentos independientes, las barras representan la media \pm error estándar (SE), n=5 c/u. * p < 0.05, t de student.

Expresión del transcrito de *Mif* de la región de tumores del colon.

Se identificó la expresión del gen de *Mif* en tejido de la región tumoral del colon. A partir de RNA obtenido de 0.5 cm de colon distal se comparó por la técnica de RT-PCR la expresión relativa de *Mif* se normalizó con la expresión del mRNA del gen constitutivo *GAPDH*.

Se detectó una expresión relativa de 0.095 en los ratones WT CAC. En los ratones WT CTL, *MIF*^{-/-} CTL y *MIF*^{-/-} CAC no se detectó la expresión de *Mif* (Figura 18). No fue posible comparar estadísticamente ya que la n=1.

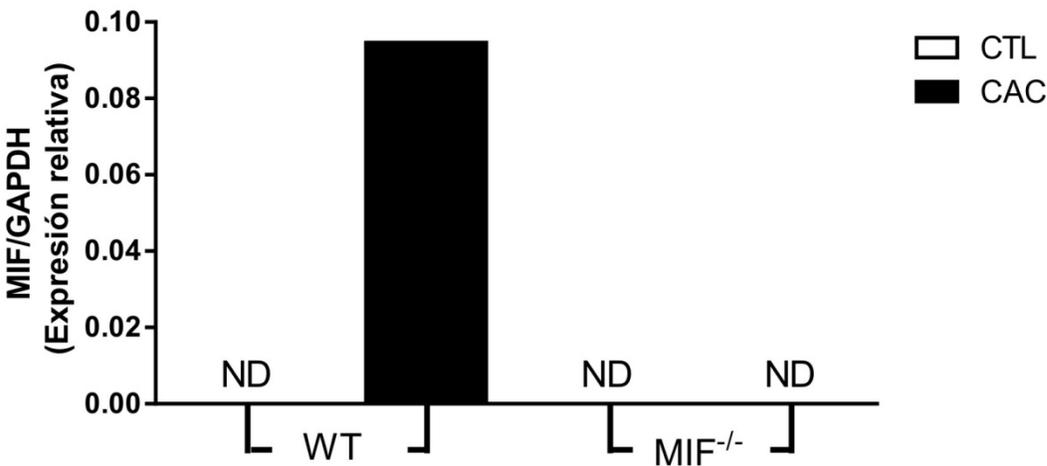


Figura 18. Expresión de *Mif* en tejido de la región distal del colon. Mediante RT-PCR se demostró la transcripción del gen *Mif* y se comparó su expresión con la expresión del gen constitutivo *GAPDH*. Gráfico representativos de un experimento, las barras representan la media, n= 1.

Caracterización de los Mo infiltrados en la zona de los tumores en el colon.

Para determinar el tipo de Mo infiltrados en el modelo de CAC fue necesario determinar la transcripción de genes codificantes de moléculas relacionadas el genotipo de Mo M2, como, TGF- β , Ym-1 y arginasa. Se normalizó su expresión con el gen constitutivo *GAPDH*.

En cuanto a la producción de arginasa (Figura 19 A) no se observó una expresión moderada en los ratones WT CTL respecto a su control. La expresión de arginasa en *MIF*^{-/-} CAC y *MIF*^{-/-} CTL estuvo significativamente expresada y no se distinguieron diferencias entre los ratones *MIF*^{-/-} CAC y *MIF*^{-/-} CTL; sin embargo en ambos grupos hubo una mayor expresión que en los ratones WT.

Tanto en ratones WT CAC como en MIF^{-/-}CAC la expresión del transcrito de TGF-β (Figura 19 B) disminuyó respecto a sus controles WT CTL y MIF^{-/-}, respectivamente. Pero los MIF^{-/-} CAC y MIF^{-/-} CTL tuvieron un expresión disminuida respecto a los WT.

Mientras que el transcrito para Ym-1 (Figura 19 C) se observó incrementado en ratones WT CAC como en MIF^{-/-} CAC en comparación con sus respectivos controles. De manera similar a la arginasa, los MIF^{-/-} CAC estuvieron por arriba de los WT CAC (Figura 19 E).

No fue posible hacer comparaciones estadísticas para Arginasa y TGF-β debido a que la n=1.

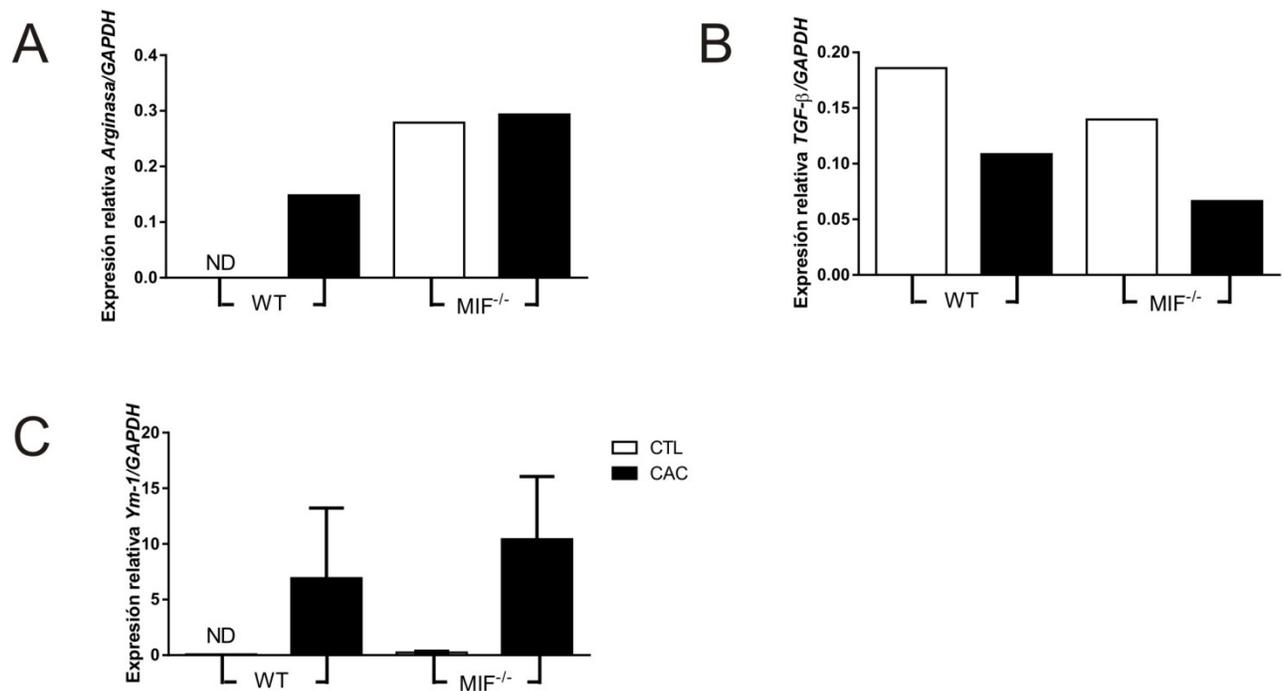


Figura 19. Expresión relativa de moléculas características de Mo tipo M1 o M2. A) La expresión de arginasa fue mayor en ambos grupos MIF^{-/-} n=1 B) TGF-β se vio disminuido en ambos grupos CAC n=1. C) La expresión de Ym-1 incrementó en ambos grupos con CAC n=2. ND= No detectado

RESUMEN DE RESULTADOS

		WT CTL	WT CAC	MIF ^{-/-} CTL	MIF ^{-/-} CAC
Número de tumores		ND	++	ND	++++
Linfocitos T totales		+	++	+++	++
Linfocitos T CD4+		+	++	+	++
Linfocitos T CD8+		+	-	+	-
Células B totales		+	-	+	-
Células B activadas		+	-	+	-
Células dendríticas		+	+++	+	++
Células NK		+	+++	+	+++
Macrófagos		+	++++	+	+++
Citocinas <i>in situ</i>	IL-1 β	++++	+++	++	+
	IL-4	+	++	+	++++
	IL-10	+	++	+	++++
mRNA <i>in situ</i>	IFN- γ	++	+	+	+++
	TGF- β	++++	+++	+++	++
	Arginasa-1	-	++	+++	+++
	YM-1	-	++	-	+++

Tabla 4. Resumen de resultados. Comparación relativa entre grupos de los resultados obtenidos. ND= No detectado. += presencia normal/basal. ++=incremento. +++ ó ++++=mayor incremento. -=disminución.

DISCUSIÓN

Recientemente se ha reportado que pacientes con cáncer colorrectal asociado a colitis crónica (CAC) presentan niveles elevados de la proteína MIF [74]. Además, algunos polimorfismos de *Mif* han sido directamente relacionados con la susceptibilidad a desarrollar cáncer colorrectal o enfermedad inflamatoria del intestino [83-85]. Sin embargo, no ha sido establecido de manera clara la participación de MIF en la génesis y/o patología del CAC.

Si bien existen algunos reportes han tratado de establecer la participación de MIF en ésta patología, la mayoría de éstos son modelos desarrollados *in vitro* o de implantación de líneas celulares [46, 69] que los hacen distantes de lo que ocurre *in vivo*.

Mientras que, el modelo de cáncer colorrectal *in vivo* que desarrollamos en éste trabajo de tesis permitió evidenciar que los ratones WT con CAC presentaron niveles incrementados de MIF, semejante que en el CAC humanos [86].

El modelo está basado en la administración de azoximetano vía intraperitoneal, el cual viaja al hígado, donde es metabolizado por el citocromo P450 (específicamente la isoforma CYP2E1). P450 hidroxiliza el grupo metil del azoximetano para transformarlo en metilazoximetanol (MAM). El MAM se disocia en paraformaldehído y especies reactivas altamente alquilantes (posiblemente metildiazodio); éstas últimas viajan vía bilis hacia el intestino donde la alquilación del DNA probablemente en células madres provoca que la guanina se convierta en O6-Metilguanina u O4-metilguanina que causan mutaciones de tipo *misspair* en genes que regulan vías de señalización como K-Ras, β -catenina, APC, PI3/AKT, MAP-K y TGF- β . Las mutaciones en APC y la desregulación de β -catenina son la principal causa de cáncer colorrectal en humanos [87, 88]. Además la administración de DSS de manera constante vía oral irrita la mucosa intestinal, al igual que sucede en la colitis ulcerativa [89].

Por las razones arriba expuestas pensamos que el modelo estudiado es adecuado para el análisis del CAC, y en nuestro caso para establecer la participación de MIF en esta patología. Para dilucidar con mayor claridad la participación de MIF, no sólo en el mantenimiento de la patología, sino también en la génesis del CAC, utilizamos ratones WT y ratones deficientes MIF (ratones *knockout*, MIF^{-/-}).

Nuestros resultados mostraron que la ausencia de MIF impactó en el desarrollo de mayor número de tumores y la malignidad de los mismos. Los ratones MIF^{-/-} CAC tuvieron el doble de tumores,

una clara pérdida de la morfología de las criptas del intestino por la formación de pólipos más grandes y un mayor acortamiento del colon comparados con los ratones WT CAC.

El análisis histológico, basado en la escala Dukes, establece que el 90 % de los pacientes humanos con cáncer gastrointestinal diagnosticados en la etapa A sobreviven más de 5 años, mientras que el 70% de los diagnosticados en la etapa B no sobreviven más de 5 años. Los pacientes humanos con pólipos inflamatorios generalmente tienen un buen pronóstico, en la mayoría de los casos los pólipos son tratables y en algunas ocasiones reversibles. Caso contrario cuando están presentes pólipos de tipo adenomatoso, generalmente son focos cancerosos [90]. De acuerdo a esta escala, los ratones MIF^{-/-}CAC sugieren un peor pronóstico que los WT CAC. Los ratones MIF^{-/-}CAC se encontraron en la etapa B, presentaron pólipos adenomatosos, mayor pérdida de la morfología de las criptas, mayor disfunción, deformación de las glándulas que se denotan por la formación de focos de criptas aberrantes y el estroma tumoral invadió el tejido muscular. Mientras que los ratones WT se encontraron en la etapa A, es decir presentaron pólipos de tipo inflamatorio y la invasión tumoral estuvo presente únicamente en el tejido epitelial.

En nuestro modelo no pudimos determinar el tiempo de supervivencia de los ratones MIF^{-/-}CAC comparados con los WT CAC debido a que nuestro modelo dura únicamente 68 días y en ese tiempo todos los ratones sobrevivieron; sin embargo el deterioro del tejido intestinal y la progresión del cáncer fue claramente más rápida en los ratones MIF^{-/-}CAC.

Estas primeras observaciones nos sugirieron que MIF podría estar implicado en el control del desarrollo y malignidad del cáncer colorrectal asociado a colitis.

Para tratar de entender cómo la ausencia de MIF impactó para que se desarrollaran estas diferencias macroscópicas observadas, en primera instancia determinamos los niveles de citocinas en suero de sangre periférica. Esto debido a que, el perfil inflamatorio de citocinas se ha relacionado con el desarrollo del CAC ya que es una patología derivada de la inflamación crónica descontrolada.

Sin embargo, no encontramos diferencias significativas entre los niveles de citocinas inflamatorias TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, y tampoco en los niveles de las citocinas anti-inflamatorias IL-10 e IL-5. Posiblemente esto se debe a que nuestro modelo desarrolla inflamación localizada en el tracto gastrointestinal [91] y las alteraciones no se reflejaron a nivel sistémico. Este resultado generado con ratones MIF^{-/-} fue diferente con otros estudios de CAC donde han inhibido MIF de manera

exógena con fármacos o anticuerpos específicos que redujeron la producción de citocinas inflamatorias como TNF- α e IL-1 β [51].

La progresión del cáncer se caracteriza no sólo por el estado en que se encuentra el tumor, sino también por la capacidad de respuesta y el tipo de respuesta inmune que puede generar el hospedero. Si bien, a nivel sistémico no vimos diferencias en los niveles de citocinas, tal vez estas diferencias radiquen a nivel local, posiblemente en las células productoras de citocinas de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias como son linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺ y Mo.

La implicación de MIF como una quimiocina en cáncer de colon ha sido poco estudiada. [69] observó que al implantar una línea celular de CAC (CT-26) en ratones MIF^{-/-} había un mayor número de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, y estuvo reducido el número de linfocitos T-reguladores (T-reg) en bazo en comparación con ratones WT. En nuestro modelo observamos que el porcentaje de células infiltradas T CD4⁺, T CD8⁺, y linfocitos B en la lámina propia, al final del modelo fue similar entre los grupos MIF^{-/-}CAC y WTCAC.

Donde sí se observaron diferencias importantes fue en el infiltrado de DCs, Mos y NKs. Los ratones MIF^{-/-} CAC tuvieron una reducción significativa de DC y Mo infiltrados en la lámina propia comparados con los ratones WTCAC. En el caso del CAC en humanos la presencia de Mo se ha relacionado con un buen pronóstico (sobrevivida mayor a 5 años) [32]. Probablemente la reducción de Mo observada en los ratones MIF^{-/-} CAC se debió a que MIF es justamente es un reclutador de monocitos [92] y su ausencia en ratones MIF^{-/-} impactó en el reclutamiento de éstas células, importantes para la contención del cáncer.

De manera contraria, las células NK se observaron significativamente incrementadas en los ratones MIF^{-/-}CAC, comparados con WT CAC. La presencia de células NK se ha relacionado directamente con la reducción de tumores, debido a que se han reconocido como las principales células efectoras en contra del tumor [93]. Sin embargo, hasta el momento el incremento de células NK en los ratones MIF^{-/-} CAC en comparación con los WT CAC no se puede relacionar con el incremento del número de tumores observados en este grupo.

En otros tejidos se ha demostrado que MIF puede inhibir la degranulación de las células NK pero no de linfocitos T CD8⁺[94]. Posiblemente por lo anterior, es que en ausencia de MIF (MIF^{-/-}) encontramos un aumento de células NK activadas que probablemente no cumplieron su función citotóxica.

Otros reportes recientes sugieren que MIF regula negativamente la expresión del receptor NKG2D, mediante el cual las células NKs se unen a las células tumorales[95]; esto sugiere que la ausencia de MIF (MIF^{-/-}) podrían favorecer la expresión de NKG2D y permitir que las células NKs se unieran a las células tumorales, participando de esta manera en la reducción de los tumores. En nuestro modelo de CAC no encontramos evidencias de este mecanismo, por el contrario los ratones MIF^{-/-} CAC presentaron el doble de tumores y más células NKs que WT CAC, por lo cual creemos será necesario en un futuro determinar nuevamente la presencia de células NKs, la expresión del receptor NKG2D y probar la capacidad citotóxica de las NKs infiltradas en el estroma tumoral.

Ya que no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de células T CD4+, T CD8+, y linfocitos B entre ratones MIF^{-/-} CAC y WT CAC, podemos afirmar que MIF no influye en el reclutamiento de éstas células, pero sí parece tener una participación importante en el reclutamiento de células presentadoras de antígeno, DCs y Mos, así como en NKs activadas en nuestro modelo de CAC.

Por otro lado, de manera independiente al hecho de que no vimos diferencias de TCD4+, T CD8+ y linfocitos B entre ratones MIF^{-/-} CAC y WT CAC, cabe destacar que la sola condición de CAC en ambos grupos de ratones (MIF^{-/-} y WT) incrementó el porcentaje de células de manera diferencial comparados con los ratones sanos. A continuación se discutirá por separado la condición de cada tipo celular en la condición con y sin CAC.

En el caso de las células TCD8+, se observó una disminución de éstas, en los ratones con cáncer WT CAC y MIF^{-/-} CAC comparados con sus controles respectivos (sanos). Este hallazgo fue contrario a lo que se ha reportado previamente en pacientes humanos con CAC, que presentaron un incremento en el número (70%) de linfocitos T CD8⁺ y CD3⁺ en el tejido epitelial a los márgenes del tumor[96]. Esta diferencia puede explicarse porque en la metodología utilizada en este trabajo obtuvimos las células de la lámina propia, para lo cual fue necesario retirar las células epiteliales previamente. La disminución que observamos puede deberse únicamente a que, al no tener tejido epitelial sólo pudimos observar los linfocitos TCD8+ que constituyen la lámina propia y no aquellos del tejido epitelial que representan a los linfocitos T CD8⁺ de migración reciente o que están infiltrando.

En el caso de los linfocitos B también encontramos una disminución del porcentaje de éstas células en ambos grupos con cáncer, MIF^{-/-} CAC y WT CAC, respecto a los grupos control. Está

observación fue similar a lo reportado con pacientes humanos con CAC, donde también observaron una disminución de células B (CD19⁺) [97]. La disminución de ésta población celular en el CAC se ha propuesto como un mecanismo de regulación negativa para favorecer la citotoxicidad de los linfocitos T CD8⁺, en un intento de controlar la progresión y diseminación del CAC, ya que las células B pueden suprimir la respuesta citotóxica de los TCD8⁺ [98].

El porcentaje de células T CD4⁺ fue mayor en los grupos con cáncer WT CAC y MIF^{-/-} CAC comparados con sus respectivos controles, esta observación fue similar a lo ya reportado previamente en humanos con CAC [99]. Cabe destacar que se desconoce la proporción de linfocitos T cooperadores vs Tregs, esto debido a que ambas poblaciones son T CD4⁺. Bien podríamos buscar esta proporción celular debido a que las Treg con fenotipo CD4⁺ FoxP3⁺, y se han encontrado aumentadas en el intestino durante el CAC. También se desconoce si las células CD4⁺, en el caso de ser T helpers de que tipo son, tipo Th1 (pro inflamatorias) o Th2 (anti inflamatorias) [97, 99].

Para tratar de establecer la influencia de MIF en el microambiente del CAC, determinamos los niveles de expresión de las citocinas IFN- γ , IL-2, GM-CSF, IL-5, IL-1 β , IL-10 e IL-4 en el estroma tumoral. Encontramos niveles significativamente más altos de IL-10 e IL-4 en los ratones MIF^{-/-} CAC que en los WT CAC. Este hallazgo confirmó que los ratones MIF^{-/-} CAC tiene reducida su capacidad inflamatoria y en consecuencia incrementada la expresión de dos de las citocinas anti-inflamatorias más importantes.

La respuesta inmune inflamatoria implica el reclutamiento de muchos tipos celulares importantes para la eliminación de patógenos o tejidos dañados, principalmente células fagocíticas como Mo y DCs [100]. En el caso particular del CAC estas células fagocíticas contribuyen en gran medida a contener la diseminación del cáncer [101].

Por otro lado, es ampliamente reconocido que la polarización del Mo hacia el tipo 1 (M1) o el tipo 2 (M2) puede ser determinado por el perfil de citocinas del microambiente con el que interactúe. Citocinas de un perfil inflamatorio como IL-12 e IFN- γ favorecen el perfil M1, mientras que citocinas de un perfil anti-inflamatorio como IL-4 e IL-10 favorecen la polarización hacia el perfil M2. Así, las citocinas del microambiente tumoral pueden ser responsables del perfil que adquieren Mos infiltrados y en consecuencia el Mo diferenciado contribuye con la secreción de citocinas para enriquecer el microambiente tumoral.

IL-10 e IL-4 son citocinas implicadas en la polarización de Mos M2, los cuales son secretores de IL-10. El aumento de IL-10 e IL-4 en el intestino, sumado al incremento en la expresión de los transcritos de *arginasa 1* y *Ym-1* en ratones MIF^{-/-} CAC nos sugieren que los Mos que encontramos en el intestino de los ratones MIF^{-/-} CAC podrían estar diferenciados hacia un perfil M2. Los Mos M2 han sido involucrados en la remodelación de tejido y favorece al crecimiento tumoral mediante la producción de arginasa 1 y arginasa 2 [33]. Ambas formas de arginasa metabolizan la L-arginina en L-ornitina y urea, los cuales son precursores de prolina y poliaminas respectivamente. La prolina promueve la síntesis de colágeno, mientras que las poliaminas favorecen la proliferación celular, contribuyendo de esta manera al crecimiento tumoral [102].

En resumen, en este trabajo experimental encontramos que los ratones MIF^{-/-} CAC desarrollaron significativamente más tumores, tuvieron una reducción significativa de Mos y DCs, niveles incrementados de IL-4 e IL-10, y sobreexpresión de los transcritos de *Ym1* y *Arginasa 1*, comparados con los ratones WT CAC. Esta condición anti-inflamatoria observada en el tejido tumoral de los ratones MIF^{-/-} CAC pudo ser la causa del desarrollo del mayor número tumores observados.

Si bien la respuesta inflamatoria puede contener el desarrollo, diseminación y malignidad de los tumores, cabe destacar que una respuesta inflamatoria exacerbada puede llegar a dañar las células de los tejidos, si se mantiene por periodos prolongados. Y en el caso particular del CAC, la inflamación crónica se ha sugerido como una de las causas de génesis de ésta patología. Por lo cual, no cabe duda que es importante para el control tumoral un balance entre el perfil inmunológico inflamatorio y anti-inflamatorio.

En este mismo contexto, estudios previos han sugerido que niveles incrementados de MIF, por sus propiedades inflamatorias, favorecen el desarrollo del CAC [46]. Esto porque se han encontrado niveles incrementados de MIF en el tejido tumoral, y porque la inhibición de MIF con fármacos o anticuerpos, redujo la patología. Sin embargo, en estos estudios la intervención para inhibir MIF se hizo una vez que la patología estaba claramente establecida, donde probablemente la presencia de MIF y el microambiente inflamatorio exacerbado estaban contribuyendo al desarrollo de la patología.

Esta observación parece contraria a los resultados observados en este trabajo de tesis, sin embargo en el modelo estudiado se involucraron ratones MIF^{-/-}, es decir MIF estuvo ausente de

manera previa al desarrollo del CAC, lo que nos permitió observar la participación de MIF desde el inicio de la patología.

Así podemos afirmar que MIF tiene un papel importante en la contención del desarrollo del CAC. Pero una vez establecido el tumor, probablemente la presencia prolongada de MIF con la consecuente inflamación exacerbada, contribuyen a la patología del CAC.

CONCLUSIONES

- Es posible inducir un modelo de cáncer colorrectal asociado a colitis en ratones MIF^{-/-} mediante azoximetano y dextrán sulfato de sodio.
- Los ratones MIF^{-/-} sobreviven los 68 días del modelo de CAC.
- Los ratones MIF^{-/-} desarrollan el doble de tumores que los ratones WT.
- Los tumores en los ratones MIF^{-/-} muestran mayor grado de malignidad que los desarrollados en ratones WT.
- La inflamación generada por el modelo de AOM+DSS se identificó como un modelo de inflamación localizada.
- MIF no influye de manera directa en la respuesta antitumoral de las células T (CD4⁺ y CD8⁺), células B células dendríticas en el modelo murino de cáncer colorrectal asociado a inflamación crónica.
- MIF podría afectar negativamente la presencia de las células NK activadas en el modelo murino de cáncer colorrectal asociado a inflamación crónica.
- MIF facilita la presencia de macrófagos infiltrados en el tejido canceroso de colon en el modelo murino de cáncer colorrectal asociado a inflamación crónica.
- Las propiedades de MIF como citocina pro-inflamatoria favorecen la polarización de los macrófagos hacia M1 (respuesta antitumoral).

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que MIF tiene una participación importante en los mecanismos iniciales de contención en el desarrollo del cáncer colorrectal asociado a colitis, asociado al reclutamiento de células como macrófagos efectores y células dendríticas.

PERSPECTIVAS

- Identificar la presencia de otras poblaciones celulares importantes en el desarrollo del cáncer de colon asociado a inflamación crónica como las T-reguladoras y las MDSC.
- Analizar la presencia de linfocitos T, B, Macrófagos, células dendríticas, NKs y MDSC tanto en lámina propia y epitelio.
- Analizar la presencia de linfocitos T, B, Macrófagos, células dendríticas, NKs y MDSC en diferentes momentos del desarrollo del CAC.
- Analizar mediante citometría de flujo no sólo la activación, sino también la capacidad de unión a la célula tumoral y la actividad citotóxica de células NK.
- Ubicar el sitio donde se encuentran los macrófagos en la anatomía tumoral pues se ha relacionado con la agresividad del tumor.

LITERATURA CITADA

1. Salud, O.M.d.I. *Cáncer. Nota descriptiva No. 297*. 2014 [cited 2014 28/10/2014]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>.
2. Tlsty, T.D. and L.M. Coussens, *Tumor stroma and regulation of cancer development*. Annu Rev Pathol, 2006. **1**: p. 119-50.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
4. Li, H., X. Fan, and J. Houghton, *Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer*. Journal of cellular biochemistry, 2007. **101**(4): p. 805-815.
5. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
6. Blankenstein, T., *The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(2): p. 180-6.
7. Mantovani, A., *Macrophages, Neutrophils, and Cancer: A Double Edged Sword*. New Journal of Science, 2014. **2014**.
8. Yang, L., et al., *Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺ CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis*. Cancer cell, 2004. **6**(4): p. 409-421.
9. Evan, G.I. and K.H. Vousden, *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 342-348.
10. Sherr, C.J. and F. McCormick, *The RB and p53 pathways in cancer*. Cancer cell, 2002. **2**(2): p. 103-112.
11. Xie, L., et al., *Activation of the Erk Pathway Is Required for TGF- β 1-Induced EMT In Vitro*. Neoplasia, 2004. **6**(5): p. 603-610.
12. Feng, Z., *p53 regulation of the IGF-1/AKT/mTOR pathways and the endosomal compartment*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(2): p. a001057.
13. Galluzzi, L. and G. Kroemer, *Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis*. Cell, 2008. **135**(7): p. 1161-1163.
14. Hahn, W.C. and M. Meyerson, *Telomerase activation, cellular immortalization and cancer*. Annals of medicine, 2001. **33**(2): p. 123-129.
15. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
16. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
17. Zitvogel, L., A. Tesniere, and G. Kroemer, *Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 715-27.
18. Terzic, J., et al., *Inflammation and colon cancer*. Gastroenterology, 2010. **138**(6): p. 2101-2114 e5.
19. Popivanova, B.K., et al., *Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 560-70.
20. Candido, J. and T. Hagemann, *Cancer-related inflammation*. J Clin Immunol, 2013. **33** Suppl 1: p. S79-84.
21. Itzkowitz, S.H. and X. Yio, *Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004. **287**(1): p. G7-17.
22. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
23. Bucala, R. and S.C. Donnelly, *Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer*. Immunity, 2007. **26**(3): p. 281-285.

24. 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.
25. Burisch, J. and P. Munkholm, *Inflammatory bowel disease epidemiology*. *Curr Opin Gastroenterol*, 2013. **29**(4): p. 357-62.
26. Tirado-Gómez, L.L. and A. Mohar-Betancourt, *Epidemiología del cáncer de colon y recto*. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 2008. **7**(4): p. 3-11.
27. 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.
28. Morgan Villela, G.S.U., A. M.; Sat Muñoz, D., *Factores de riesgo para cáncer colorectal*. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 2008. **7**(4): p. 76.
29. Globocan. *Colorectal Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. 2012 [cited 2014 28/10/2014]; Available from: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
30. Deschoolmeester, V., et al., *Immune Cells in Colorectal Cancer: Prognostic Relevance and Role of MSI*. *Cancer Microenviron*, 2011. **4**(3): p. 377-92.
31. Waldhauer, I. and A. Steinle, *NK cells and cancer immunosurveillance*. *Oncogene*, 2008. **27**(45): p. 5932-5943.
32. Erreni, M., A. Mantovani, and P. Allavena, *Tumor-associated Macrophages (TAM) and Inflammation in Colorectal Cancer*. *Cancer Microenviron*, 2011. **4**(2): p. 141-54.
33. Sica, A., et al. *Macrophage polarization in tumour progression*. in *Seminars in cancer biology*. 2008. Elsevier.
34. Lewis, C.E. and J.W. Pollard, *Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments*. *Cancer Res*, 2006. **66**(2): p. 605-12.
35. Hagemann, T., et al., *Macrophages induce invasiveness of epithelial cancer cells via NF-kappa B and JNK*. *J Immunol*, 2005. **175**(2): p. 1197-205.
36. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(3): p. 162-74.
37. Corzo, C.A., et al., *Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells*. *J Immunol*, 2009. **182**(9): p. 5693-701.
38. Yu, C., et al., *American ginseng attenuates azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice*. *Journal of ginseng research*, 2015. **39**(1): p. 14-21.
39. Dranoff, G., *Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy*. *Nature Reviews Cancer*, 2004. **4**(1): p. 11-22.
40. Lewis, A.M., et al., *Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment*. *Journal of translational medicine*, 2006. **4**(1): p. 48.
41. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. *Science*, 2006. **313**(5795): p. 1960-1964.
42. Zaidi, M.R. and G. Merlino, *The two faces of interferon-gamma in cancer*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(19): p. 6118-24.
43. Natori, T., et al., *G-CSF stimulates angiogenesis and promotes tumor growth: potential contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells*. *Biochemical and biophysical research communications*, 2002. **297**(4): p. 1058-1061.
44. Abbas Abul, K., H. Lichtman Andrew, and S. Pober Jordan, *Inmunología celular y molecular*. *Inmunología Celular y Molecular*, 2002.
45. Chen, Z., et al., *Cytokine profile and prognostic significance of high neutrophil-lymphocyte ratio in colorectal cancer*. *British journal of cancer*, 2015.

46. He, X.X., et al., *Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer*. Mol Med, 2009. **15**(1-2): p. 1-10.
47. de Jong, Y.P., et al., *Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF*. Nature immunology, 2001. **2**(11): p. 1061-1066.
48. Vatandoost, N., et al., *Early detection of colorectal cancer: from conventional methods to novel biomarkers*. Journal of cancer research and clinical oncology, 2015: p. 1-11.
49. Lue, H., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease*. Microbes and Infection, 2002. **4**(4): p. 449-460.
50. Calandra, T. and T. Roger, *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 791-800.
51. Cometta, A., et al., *Vancomycin versus placebo for treating persistent fever in patients with neutropenic cancer receiving piperacillin-tazobactam monotherapy*. Clin Infect Dis, 2003. **37**(3): p. 382-9.
52. Mantovani, A., et al., *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. J Pathol, 2013. **229**(2): p. 176-85.
53. Fan, H., et al., *Macrophage migration inhibitory factor and CD74 regulate macrophage chemotactic responses via MAPK and Rho GTPase*. J Immunol, 2011. **186**(8): p. 4915-24.
54. Conroy, H., L. Mawhinney, and S. Donnelly, *Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF)—the potential missing link*. QJM, 2010. **103**(11): p. 831-836.
55. Rossi, A.G., et al., *Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma*. J Clin Invest, 1998. **101**(12): p. 2869-74.
56. Imamura, K., et al., *Identification and immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor in human kidney*. Biochem Mol Biol Int, 1996. **40**(6): p. 1233-42.
57. Nishihira, J., Y. Koyama, and Y. Mizue, *Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human vascular endothelial cells and its induction by lipopolysaccharide*. Cytokine, 1998. **10**(3): p. 199-205.
58. Bacher, M., et al., *An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(15): p. 7849-54.
59. Calandra, T., et al., *The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor*. J Exp Med, 1994. **179**(6): p. 1895-902.
60. Bernhagen, J., et al., *MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia*. Nature, 1993. **365**(6448): p. 756-9.
61. Mitchell, R.A., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(1): p. 345-50.
62. Conroy, H., L. Mawhinney, and S.C. Donnelly, *Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF)—the potential missing link*. QJM, 2010. **103**(11): p. 831-6.
63. Qui, M.S. and S.H. Green, *PC12 cell neuronal differentiation is associated with prolonged p21ras activity and consequent prolonged ERK activity*. Neuron, 1992. **9**(4): p. 705-17.
64. Mitchell, R.A., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(1): p. 345-350.
65. Petrenko, O., et al., *Macrophage migration inhibitory factor deficiency is associated with altered cell growth and reduced susceptibility to Ras-mediated transformation*. J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 11078-85.
66. Morris, K.T., et al., *Chronic macrophage migration inhibitory factor exposure induces mesenchymal epithelial transition and promotes gastric and colon cancers*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e98656.

67. Hogan, N.M., et al., *Impact of mesenchymal stem cell secreted PAI-1 on colon cancer cell migration and proliferation*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. **435**(4): p. 574-9.
68. 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.
69. Choi, S., et al., *Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulatory T cell response of tumor-bearing mice*. J Immunol, 2012. **189**(8): p. 3905-13.
70. 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.
71. Lee, H., et al., *Macrophage migration inhibitory factor may be used as an early diagnostic marker in colorectal carcinomas*. Am J Clin Pathol, 2008. **129**(5): p. 772-9.
72. Yarbro, C.H., D. Wujcik, and B.H. Gobel, *Cancer nursing: Principles and practice*. 2010: Jones & Bartlett Publishers.
73. Yao, K., et al., *Macrophage migration inhibitory factor is a determinant of hypoxia-induced apoptosis in colon cancer cell lines*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(20): p. 7264-72.
74. Legendre, H., et al., *Prognostic values of galectin-3 and the macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human colorectal cancers*. Mod Pathol, 2003. **16**(5): p. 491-504.
75. Sun, B., et al., *Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor invasion and metastasis via the Rho-dependent pathway*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(3): p. 1050-8.
76. Ogawa, H., et al., *An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis*. Cytokine, 2000. **12**(4): p. 309-14.
77. Suzuki, R., et al., *Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice*. Carcinogenesis, 2006. **27**(1): p. 162-9.
78. Laird, P.W., et al., *Simplified mammalian DNA isolation procedure*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(15): p. 4293.
79. Neufert, C., C. Becker, and M.F. Neurath, *An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression*. Nat Protoc, 2007. **2**(8): p. 1998-2004.
80. Arévalo, F., et al., *Pólipos colorectales: actualización en el diagnóstico*. Revista de Gastroenterología del Perú, 2012. **32**(2): p. 123-133.
81. Compton, C.C. and F.L. Greene, *The staging of colorectal cancer: 2004 and beyond*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2004. **54**(6): p. 295-308.
82. Wu, J.S., *Rectal cancer staging*. Clinics in colon and rectal surgery, 2007. **20**(3): p. 148.
83. Ramireddy, L., et al., *Association Between Genetic Polymorphism of the MIF Gene and Colorectal Cancer in Taiwan*. Journal of clinical laboratory analysis, 2014.
84. Nohara, H., et al., *Association of the- 173 G/C polymorphism of the macrophage migration inhibitory factor gene with ulcerative colitis*. Journal of gastroenterology, 2004. **39**(3): p. 242-246.
85. Falvey, J.D., et al., *Macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms in inflammatory bowel disease: An association study in New Zealand Caucasians and meta-analysis*. World journal of gastroenterology: WJG, 2013. **19**(39): p. 6656.
86. Legendre, H., et al., *Prognostic values of galectin-3 and the macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human colorectal cancers*. Modern pathology, 2003. **16**(5): p. 491-504.
87. Huang, J., et al., *APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996. **93**(17): p. 9049-9054.
88. 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.
89. Håkansson, Å., et al., *Immunological alteration and changes of gut microbiota after dextran sulfate sodium (DSS) administration in mice*. Clinical and experimental medicine, 2014: p. 1-14.

90. Shussman, N. and S.D. Wexner, *Colorectal polyps and polyposis syndromes*. Gastroenterology Report, 2014. **2**(1): p. 1-15.
91. Perše, M. and A. Cerar, *Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks*. BioMed Research International, 2012. **2012**.
92. Tillmann, S., J. Bernhagen, and H. Noels, *Arrest functions of the MIF ligand/receptor axes in atherogenesis*. Frontiers in immunology, 2013. **4**.
93. Orange, J.S. and Z.K. Ballas, *Natural killer cells in human health and disease*. Clinical Immunology, 2006. **118**(1): p. 1-10.
94. Apte, R., et al., *Cutting edge: role of macrophage migration inhibitory factor in inhibiting NK cell activity and preserving immune privilege*. The Journal of Immunology, 1998. **160**(12): p. 5693-5696.
95. Krockenberger, M., et al., *Macrophage migration inhibitory factor contributes to the immune escape of ovarian cancer by down-regulating NKG2D*. The Journal of Immunology, 2008. **180**(11): p. 7338-7348.
96. Deschoolmeester, V., et al., *Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients*. BMC immunology, 2010. **11**(1): p. 19.
97. Barbera-Guillem, E., et al., *B lymphocyte pathology in human colorectal cancer. Experimental and clinical therapeutic effects of partial B cell depletion*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2000. **48**(10): p. 541-549.
98. MOACH, P.A., H. Schreiber, and D.A. Rowley, *CD4+ and B lymphocytes in transplantation immunity: II. Augmented rejection of tumor allografts by mice lacking B cells*. Transplantation, 1993. **55**(6): p. 1356-1360.
99. Akeus, P., et al., *Altered chemokine production and accumulation of regulatory T cells in intestinal adenomas of APCMin/+ mice*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2014: p. 1-13.
100. Geissmann, F., et al., *Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells*. Science, 2010. **327**(5966): p. 656-661.
101. Funada, Y., et al., *Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer*. Oncology reports, 2003. **10**(2): p. 309-313.
102. Campbell, L., et al., *Local Arginase 1 Activity Is Required for Cutaneous Wound Healing*. Journal of Investigative Dermatology, 2013. **133**(10): p. 2461-2470.

ANEXO TÉCNICO

Anexo 1. Genotipificación

Aislamiento de DNA

Utilizando material estéril y libre de RNAsasyDNAsas:

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 1.8 ml previamente identificados.
3. Agregar 500 µl de búfer de lisis y 10 µl de proteinasa K (INVITROGEN 100µg/µl) e incubar toda la noche a 55°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 µl 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 2 min, decantar el sobrenadante y lavar la pastilla de DNA con 500 µl de etanol frío al 75% en el mismo tubo.
7. Resuspender 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 durante 30 min.
9. Resuspender la pastilla en 200 µl de H₂O DEPC (SIGMA).

Búfer de lisis

- 1 50 ml TrisHCl 1M pH=8.5
- 2 5 ml EDTA 0.5M
- 3 5 ml SDS 20%
- 4 100 ml NaCl 1M

Aforar a 500 ml con agua destilada

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 AmpliqonIIITaq DNA Polymerase para amplificar los genes MIF y NEO en el siguiente orden:

Componente/Vol. Por reacción	MIF	NEO
Búfer 10X	2.5 µl	2.5 µl
dNTP mix (12.5 mM)	0.4 µl	0.4 µl
MgCl ₂ (15 mM)	1.5 µl	1.5 µl
Primer F	5.6 µl	3.8 µl
Primer R	4.1 µl	3 µl
Taq DNA Polymerase	0.4 µl	0.4 µl
Agua destilada	9.5 µl	9.5 µl
Templado de DNA	1 µl	1 µl

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

Paso del ciclado	Condiciones del paso	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C por 10 min	1
Desnaturalización	94°C por 35 seg	40
Alineación	Variable por 35 seg	
Extensión	72°C por 35 seg	
Extensión final	72°C por 4 min	1
Enfriamiento	4°C por 10 min	1

Anexo 2. Técnicas histológicas

Tren de deshidratación e Inclusión del tejido

1. Agua corriente 30 min
2. Etanol 50% 30 min
3. Etanol 60% 20 min
4. Etanol 70% 20 min
5. Etanol 80% 20 min
6. Etanol 85% 20 min

7. Etanol 90%	20 min
8. Etanol 96%	20 min
9. Etanol 100% (1)	20 min
10. Etanol 100% (2)	20 min
11. Alcohol-amílico (1)	20 min
12. Alcohol-amílico (2)	20 min
13. Parafina (1)	24 hrs
14. Parafina (2)	24 hrs
15. Inclusión en Paraplast	

Tren de tinción Hematoxilina y Eosina

1. Xilol (1)	5 min
2. Xilol (2)	5 min
3. Etanol 100%	5 min
4. Etanol 96%	5 min
5. Etanol 80%	5 min
6. Etanol 70%	5 min
7. Agua corriente	5 min
8. Hematoxilina	5 min
9. Agua corriente	10 seg
10. Alcohol ácido (Etanol 70%+1% HCl)	10 seg
11. Agua destilada	Enjuagar
12. Agua amoniaca (H ₂ O + 1% NH ₄ OH)	30 seg
13. Agua destilada	Enjuagar
14. Eosina	3 min
15. Agua destilada	Enjuagar
16. Etanol 96%	Lavar por chorreo
17. Etanol 100%	1 min
18. Xilol	5 min
19. Montar con resina Entellan	

Paraformaldehido amortiguado 4%

4 g de Paraformaldehido + 80 ml de PBS

Calentar hasta 60°C y agregar unas gotas de NaOH 1M acuoso hasta disolver

Dejar enfriar

Ajustar pH a 7.4

Aforar a 100 ml con PBS

Anexo 3. Obtención de células de lámina propia de colon

1. Obtener el colon, lavarlo y abrirlo longitudinalmente
2. Incubar el intestino en 5 ml de RPMI 1X (SIGMA)+ 0.056% EDTA libre de SFB en baño maría a 37°C durante 30 min vortexeando los tubos cada 5 min.
3. Desechar sobrenadante
4. Incubar el intestino en 5 ml de RPMI 1X + 0.013% de Colagenasa tipo IV (SIGMA) a 37°C durante 30 min vortexeando los tubos cada 5 min.
5. Disgregar el intestino con ayuda de organza y un émbolo
6. Recuperar tanto el sobrenadante como el producto de la disgregación, agregar 1 ml de SFB y aforar a 10 ml con RPMI 1X
7. Centrifugar 10 min a 2500 rpm
8. Desechar sobrenadante y resuspender la pastilla en 10 ml de RPMI 1X
9. Centrifugar 10 min a 2500 rpm
10. Resuspender en 4 ml de Percoll 40%
11. A un tubo nuevo agregar 4 ml de Percoll 75% y después agregar lentamente por las paredes los 4 ml de Percoll 40% con las células de lámina propia sin romper el gradiente
12. Centrifugar 2000 rpm 25 min con Brake 0 a temperatura ambiente
13. Obtener el anillo celular que se forma entre ambas fases y desechar el resto
14. Lavar con 14 ml de RPMI 1X

Gradiente de Percoll

1. Para la preparación del Percoll 75% y Percoll 40% es necesario preparar RPMI 20X: 1.04 de RPMI +5 ml de H₂O
2. Obtener Percoll 90%:
9 ml de Percoll 100% (GE HEALTHCARE)
0.5 ml SFB
0.5 ml RPMI 20X
3. A partir del Percoll 90% preparar Percoll 75% y Percoll 40%, tomar el Percoll 90% como si fuera el 100%
Percoll 75%:
3 ml Percoll 90%
1 ml RPMI 1X
Percoll 40%:
1.6 ml Percoll 90%
2.4 ml RPMI 1X

Anexo 4. Búfer de ensayo de radio-inmunoprecipitación (RIPA)

Tris HCl	50mM
NaCl	150mM
SDS	0.01%
Tritón X-100	1%
Deoxicolato de Na	0.8%

Aforar a 1 lt con agua destilada, antes de usar agregar inhibidores de proteasas y de fosfatasa

Anexo 5. Determinación de proteína total por el método de Lowry

1. Preparar las siguientes soluciones que deben mantenerse alejadas de la luz:
 - a. Sulfato de cobre al 1%
Tartrato de Na y K al 2%
Tomar 100 µl de ambas soluciones para obtener la Solución A.
 - b. Carbonato de Na 2% en NaOH 0.01N (Sol B).

2. Tomar 9.8 ml de la solución B y mezclar con los 200 µl de la solución A para obtener la solución A+B.
3. Preparar una curva patrón de 0 a 1500 µg/ml de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (US Biological).
4. Diluir las muestras problema 1:2, 1:10, 1:50 y 1:100 en agua destilada.
5. Preparar justo antes de usar 5 ml de Folín + 10 ml de H₂O.
6. En una placa de 96 pozos colocar en el siguiente orden: 50 µl de cada una de las diluciones de las muestras problema, 150 µl de la solución A+B y 17.5 µl de Folín.
7. Mezclar, incubar la placa cubierta de la luz durante 10 min a temperatura ambiente.
8. Leer en el EPOCH (BioTeck) a 580 nm.

Anexo 6. Extracción de RNA para tejidos en TrizolReagent

1. Lavar el intestino con PBS frío y obtener ~0.5 cm de tejido.
2. Inmediatamente congelar el tejido en nitrógeno líquido durante 10 segundos.
3. Macerar el tejido congelado hasta obtener polvo.
4. Depositar el macerado en 500 µl de TrizolReagent (SIGMA)
5. Almacenar a -70°C hasta su uso.
6. Para extraer el RNA agregar a cada muestra 100 µl de cloroformo frío (-30°C) por cada 500 µl de Trizol.
7. Agitar en el vortex durante 30 seg.
8. Incubar a temperatura ambiente durante 10 min.
9. Centrifugar 13000 rpm a 4°C durante 15 min.
10. Identificar la formación de 3 fases: la fase inferior de color café que contiene restos de fenol y cloroformo, la fase intermedia de color blanco que contiene DNA y proteínas y la fase superior acuosa que contiene el RNA.
11. Adicionar únicamente la fase acuosa a 500 µl de isopropanol frío (-30°C) y homogenizar suavemente.
12. Incubar a temperatura ambiente durante 10 min.

13. Centrifugar a 13000 rpm a 4°C durante 15 min.
14. Desechar el sobrenadante y resuspender. Lavar con 500 µl de etanol 70%.
15. Centrifugar a 13000 rpm a 4°C durante 5 min.
16. Repetir los pasos 14 y 15 dos veces más dependiendo de la muestra.
17. Secar el botón por evaporación a temperatura ambiente durante 30 min.
18. Resuspender la pastilla en 20 µl de H₂O DEPC.
19. Medir la absorbancia a 260 y 280 nm.
20. Ajustar con H₂O DEPC cada muestra para tener una concentración de 1000 ng/µl.

Anexo 7. Síntesis de cDNA con el kit Super Script (SIGMA)

1. Realizar la mezcla de 1 µl de RNA [1000 ng/µl] + 1 µl de dNTPs [10 mM] +1 µl de OLIGO DT + 7µl de H₂O
2. Resuspender e incubar en el termociclador a 65°C por 5 min
3. Incubar en hielo durante 1 min.
4. Añadir 2 µl de búfer RT + 4 µl de MgCl₂ + 2 µl de DTT + 1 µl de RNAout
5. Incubar en el termociclador a 42 °C por 2 min
6. Añadir 0.5 µl de SSII RT
7. Incubar en el termociclador a 42 °C por 50 min
8. Incubar en el termociclador a 70 °C por 15 min
9. Agregar 0.5 µl de RNAsa
10. Incubar en el termociclador a 36 °C por 15 min
11. Medir la absorbancia a 260 y 280 nm.
12. Ajustar cada muestra para tener una concentración de 1000 ng/µl.

Anexo 8. Amplificación del mRNA (PCR)

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 AmpliqonIIITaq DNA Polymerase para amplificar los genes GAPDH, MIF, Arginasa, Ym-1, TGF-β e iNOS en el siguiente orden:

Componente	Vol. Por reacción
Búfer 10X	2.5 µl
dNTP mix (12.5 mM)	0.4 µl
MgCl ₂ (15 mM)	1.5 µl
Primer F	1 µl
Primer R	1 µl
Taq DNA Polymerase	0.4 µl
Agua destilada	9.5 µl
Templado de DNA	1 µl

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

Paso del ciclado	Condiciones del paso	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C por 10 min	1
Desnaturalización	94°C por 35 seg	40
Alineación	Variable por 35 seg	
Extensión	72°C por 35 seg	
Extensión final	72°C por 4 min	1
Enfriamiento	4°C por 10 min	1

Temperaturas de alineación para cada primer:

Gen transcrito	Amplicón (pb)	Primers (5'-3')	Temp. de alineación
GAPDH	201	F- CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC R- CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC	54 °C
MIF	118	F- GCC AGA GGG GTT TCT GTC G R- GTT CGT GCC GCT AAA AGT CA	58°C
Arginasa	250	F- CAG AAG AAT GGA AGA GTC AG R- CAG CTA TGC AGG GAG TCA CC	54°C
Ym-1	436	F- TCA CAG GTC TGG CAA TTC TTC TG R- TTT GTC CTT AGG AGG TC TCC TC	56°C
iNOS	62	F- CTG GAG GAG CTC CTG CCT CAT G R- GCA GCA TCC CCT CTG ATG GTG	62°C
TGF-β	198	F- GCC TTC CTG CTC CTC AT R- TTG GCA TGG TAG CCC TTG	58.3°C