



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
UNIDAD DE BIOMEDICINA

**ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE MIF, POR EL COMPUESTO
SINTÉTICO CPSI-156, EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER DE COLÓN
ASOCIADO A COLITIS**

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

P r e s e n t a:

MARIA SANDRA BAUTISTA CUELLAR

Directora de tesis:

DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de Méx.

2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

... Después de todo, cuando estás enamorado, quieres contarle a todo el mundo. Por eso la idea de que los científicos no hablen al público de la ciencia me parece aberrante...

Carl Sagan



No. reg.: BIO/031/16

Los Reyes Iztacala a 25 de agosto de 2016

DRA. PATRICIA D. DAVILA ARANDA
DIRECTORA DE LA FES IZTACALA
Presente

Atención: Lic. Eloy González Fernández
Jefe de la Unidad de Administración Escolar

Los abajo firmantes, miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de: **TESIS DE INVESTIGACION**

Titulado "Estudio de la inhibición de MIF por el compuesto sintético CPSI-156, en el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis"

Que presenta el (la) pasante de Biología **MARIA SANDRA BAUTISTA CUELLAR** número de cuenta: **30908547-6** Para obtener el título de Biólogo.

Informan que después de haber revisado cuidadosamente el trabajo, consideramos que reúne las características de calidad académica que se requieren para aspirar a la obtención del título citado, razón por la cual otorgamos nuestros **votos aprobatorios** para la presentación del examen profesional correspondiente.

GRADO	NOMBRE	FIRMA	CARGO
DR.	IGNACIO TERRAZAS VALDES		Presidente
DRA.	YOLANDA IRASEMA CHIRINO LOPEZ		Vocal
DRA.	MIRIAM RODRIGUEZ SOSA		Secretario
DR.	FELIPE VACA PANIAGUA		Suplente
DR.	LUIS ENRIQUE ARIAS ROMERO		Suplente

Con base en lo anterior solicito su autorización para que los profesores que otorgan los votos aprobatorios funjan como sinodales del examen profesional en el cargo anotado, y a la Administración Escolar otorgue la fecha para la Réplica Oral del trabajo presentado.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

JEFA DE CARRERA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FES IZTACALA

DRA. CLAUDIA TZASNA HERNANDEZ DELGADO



Vo. Bo.

Dra. Patricia D. Dávila Aranda
Directora



DEDICATORIAS

Dedico esta tesis en primer lugar a mi Mami, donde sea que estés, gracias, porque mis recuerdos son de una extraordinaria madre, y el mejor ejemplo de una mujer fuerte y con la mirada siempre para adelante. Aunque ya no podamos compartir este logro en mi vida, te llevo en mi corazón y haz sido siempre mi principal motor para seguir adelante. Esta tesis, mi carrera, y todos mis logros serán siempre en memoria tuya, gracias por regalarme la Familia más maravillosa que alguien pudiera desear y a quienes debo también gran parte de este sueño, me enseñaron las bases de responsabilidad y deseos de superación, han sido el principal cimiento para la construcción de mi vida profesional, siendo la hermanita más bebé, he tenido en todos ustedes el mejor ejemplo de personas exitosas y de gran corazón que me llevan a admirarlos cada día más.

Muy en especial quiero dedicarla a mis sobrinos: Mane, chiquis, Diego, Kevin y Frida. Desde que llegaron, han sido una motivación en mi vida, aunque todavía sean muy pequeños quiero que algún día lean esto y se sientan orgullosos de su tía, y que no sólo me vean cómo la jovencita loca que soy en casa, quiero que tomen mi ejemplo de que cuando se quiere, se puede. Quiero decirles que uno siempre debe luchar por lo que quiere en la vida, que el camino está plagado de piedras, de malas rachas, pero por supuesto también están los buenos momentos y que esos, tú debes crearlos, a base de esfuerzo y constancia, y les prometo que la cosecha final es una maravillosa satisfacción de saber que eres capaz de todo eso y más. Que esta tesis sea motivación para ustedes, los amo con todo mi corazón.

Y, por último, dedico este momento tan inolvidable e importante, a mí misma, por no dejarme vencer, ya que, en ocasiones, el principal obstáculo se encuentra en uno mismo.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, gracias a Dios, por permitirme llegar a este punto de mi vida y por rodearme de maravillosas personas que nunca me dejaron sola en este camino.

A mi Papi por ser mi ejemplo más grande de fortaleza, humildad y ganas de superarse. Gracias papi por permitirme elegir mi profesión y apoyarme hasta el final de la carrera, por tus sabios consejos, por tus regaños y porque estuviste en todos y cada uno de los momentos en que te necesite a lo largo de este bonito camino, y porque sé que vas a seguir estándolo. Espero que algún día estés muy orgulloso de tu niña, como yo estoy del maravilloso ser humano que eres.

A la Dra. Miriam, gracias por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y realizar mi proyecto de Tesis, por el gran apoyo que me ha brindado a lo largo de este proceso, también por la enorme paciencia cuando las cosas se pusieron difíciles con los experimentos, por buscar siempre lo mejor para nosotros sus alumnos, porque mucho más que una buena tutora, es usted un excelente ser humano.

A mis sinodales, por la paciencia y el tiempo de revisar mi tesis.

A las mujeres de mi vida, mis hermanas, Ara, Ana, y mi cuñis, Chinis; Gracias porque con ustedes fue menor sentir la falta de mi mami, han sido para mí una figura materna, siempre me han brindado todo su cariño y amor, son mi ejemplo de mujeres valientes, las amo con todo mi corazón.

A mi hermano Mario, "Perris", gracias por ser para mí más que un hermano un mejor amigo, con el que puedo jugar siempre sin aburrirme a ser niños chiquitos y porque además de eso eres para mí un ejemplo de un profesionalista que ama realmente su trabajo, te amo gordo.

A mi hermano Ismael, mi ejemplo de un hombre trabajador, bondadoso y humilde, gracias por todo tu apoyo no solo durante la realización de mi tesis, sino porque durante toda la carrera, siempre estuviste al pie del cañón en lo que necesite, te amo.

A mi hermano Saúl, gracias por enseñarme que a pesar de todos los problemas que puedan surgir y de lo que las demás personas piensen siempre hay que salir adelante, te amo babys.

A mi cuñado, Juan José, gracias por enseñarme a mirar la vida siempre con optimismo, aprendí de ti, que con esfuerzo, los sueños si se pueden hacer realidad, te aprecio mucho Padri.

A mi hermano Luis y a Fabis, porque a pesar de la distancia siempre estuvieron pendiente, los amo.

A mis amigas de la carrera, ("las mantis" jajaja), Rosa, Irma, Fer, Janete, porque gracias a ustedes la carrera no fue tan pesada, por todas esas risas, las fiestas y por supuesto las buenísimas prácticas de campo que compartimos, forman parte de mis mejores recuerdos; y muy en especial a Mafer, en ti encontré una verdadera mejor amiga, eres una excelente persona, gracias por escucharme siempre, por confiar en mí, por compartir nuestro amor por los perritos, por las compritas, por la tragadera (jajaja) y por tu inmenso apoyo mami, haz sido pieza clave, echándome porras y porque no estuviste solo en las fiestas o los buenos momentos, haz estado y sé que vas a estar siempre, juntas desde el primer semestre y hasta el fin de los tiempos, te amo con todo mi corazoncito.

A Thali, porque en ti encontré una excelente amiga y confidente, por esas tardes de comida china, de paletas, de mucho chisme, por quedarte trabajando conmigo hasta las horas de la madrugada (jajaja) y por todos los bonitos momentos que hemos compartido, pero sobre todo gracias por lo que me enseñaste para la práctica en el laboratorio, creo que sin todos tus consejos todo hubiera sido más difícil, siempre voy a estarte agradecida por ser mi maestra y por todo tu apoyo en la realización del proyecto y de mi tesis, te quiero mucho amiga.

A mis compañeros Ime, Alice, Miguel, Salvador, Betsy, Tona, Vic e Ivan, gracias por hacer más amena mi estancia y el trabajo en el laboratorio, y por los consejos y ayuda que en alguna ocasión me brindaron.

Por último gracias a mi amada Facultad, mi segunda casa, que tantas cosas buenas me ha regalado en mi formación, no solo profesional, sino personal, estoy orgullosa de pertenecer a esta Universidad.

Este trabajo fue 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. La sustentante Maria Sandra Bautista Cuellar fue becaria de este programa.

INDICE

Apartado	Página
Índice de tablas y figuras	vii
Abreviaturas	viii
Resumen	x
Introducción	1
1. Concepto de cáncer	1
2. Marcadores de cáncer	2
3. Inflamación	4
3.1 Inflamación crónica	4
3.2 Enfermedades crónico - inflamatorias relacionadas a cáncer	5
3.2.1 Enfermedad Inflamatoria Intestinal	6
4. Cáncer colorectal asociado a colitis	7
4.1 Epidemiología	7
4.2 Etiología	8
5. Respuesta del sistema inmune ante el cáncer	10
5.1 Inmunovigilancia	10
5.1.1 Inmunoección	11
6. Ambiente inflamatorio en el cáncer colorectal	12
6.1 Linfocitos TCD4+	13
6.2 Linfocitos TCD8+	14
7. Las citocinas en la inflamación y el cáncer	14
7.1 Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)	16
8. Papel de MIF en el cáncer colorectal asociado a colitis	16
8.1 Inhibición de MIF	19
8.1.1 CPSI-156	21
Justificación	23
Hipótesis	24
Objetivos	25
Material y métodos	26
Resultados	30
Discusión	45
Conclusiones	53
Perspectivas	54
Bibliografía	55
Anexo técnico	59

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Tabla/Figura	Página
Tabla 1. Marcadores de cáncer	2
Figura 1. Anatomía del colon	6
Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer colorectal	7
Figura 3. Esquema de la vía Wnt- β catenina	10
Tabla 2. Citocinas, sus dianas celulares y efectos biológicos	15
Figura 4. Mecanismo de acción de MIF	18
Tabla 3. Antecedentes	19
Figura 5. Estructura química del inhibidor sintético de MIF, CPSI-156	22
Figura 6. Modelo de cáncer colorectal inducido con azoximetano	26
Tabla 4. Anticuerpos para análisis por citometría de flujo	28
Figura 7. Comparación del porcentaje de peso	30
Figura 8. Sangrado rectal	31
Figura 9. Longitud de los intestinos	32
Figura 10. Carga tumoral	33
Figura 11. Porcentaje del tamaño de tumores	35
Figura 12. Cortes histológicos de 5 μ m, vistos a 10x y 20x	37
Figura 13. Macrófagos y células dendríticas infiltradas	39
Figura 14. Linfocitos TCD4+ y TCD8+ infiltrados	41
Figura 15. Transcritos de genes de citocinas	42
Figura 16. Expresión del RNAm de citocinas, en relación a GAPDH	44

Abreviaturas

AOM	Azoximetano
APC	Adenomatous polyposis coli
ATP	Adenosin trifosfato
CAC	Cáncer colorectal asociado a colitis
CD	Células Dendríticas
CEA	Antígeno Carcino Embrionario
C-JUN	Nombre de un protooncogen
CKI	caseína quinasa
c-MYC	Protooncogen c-MYC
COX	Ciclooxigenasa
CPAS	Células presentadoras de antígeno
CPSI	Cytokine pharma science
CT26	Línea celular de cáncer de colon
CU	Colitis ulcerativa
CXCR	Receptor de quimiocinas tipo CXCR
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos de trifosfatos
Dsh	Gen desheveled
DSS	Dextrán sulfato de sodio
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
Fzd	Fryzled
GAPDH	Glicer aldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GLUT-1	Transportador de glucosa
GSK3B	glucógeno sintasa 3-beta
H. pylori	Helicobacter pylori
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
MAM	Metilazoximetanol
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MC	Metilcelulosa
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
MP	Metaloproteinasa
NF-KB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NIDDM	Diabetes mellitus dependiente de insulina

NK	Células asesinas naturales
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
r MIF	MIF recombinante
RB	Retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensajero
SNC	Sistema nervioso central
TCF	T-Cell-Factors
TCR	Receptor de células T
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
TP53	Proteína tumoral p53
T-reg	Linfocito T regulador.
VEGF	Factor de crecimiento endotelial – vascular

RESUMEN

La inflamación crónica del intestino grueso ha sido relacionada con el desarrollo de cáncer de colón, de ahí su nombre; cáncer de colon asociado a colitis (CAC). El Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) es una citocina pro-inflamatoria del sistema inmune innato; se le han atribuidos propiedades de promotor de la angiogénesis, la proliferación, la supervivencia de células malignas y la metástasis. Muchos autores han relacionado niveles incrementados de esta citocina en pacientes con distintos tipos de cáncer, e incluso se ha propuesto como un marcador y un blanco terapéutico para el CAC. En este trabajo se evaluó el efecto del inhibidor sintético de MIF, CPSI-156, en la patología y desarrollo del CAC en un modelo murino. Se indujo CAC en ratones hembras BALB/c con una inyección única, vía intraperitoneal de azoximetano, seguido de 3 ciclos de Dextran Sulfato de Sodio al 2% disuelto en agua para beber. Se formaron cuatro grupos: Sano, CAC, CAC+DMSO-MC (DMSO-MC fue el vehículo) y CAC+CPSI-156 (administración vía oral del inhibidor, en el día 40 p.i). Durante los 68 días se monitoreo a los ratones, evaluando los síntomas clínicos cómo cambio de peso, presencia de diarrea y sangrado. Al final del modelo se extrajeron los intestinos y se comparó la longitud, el número y tamaño de tumores que presentaron. También se analizó la morfología tumoral por histología, el reclutamiento celular por citometría de flujo y la transcripción de genes de citocinas reguladoras y pro-inflamatorias mediante RT-PCR. Los resultados mostraron mayor recurrencia de síntomas clínicos en el grupo de CAC+CPSI-156, asociados a un mayor número y tamaño de tumores, así como a un peor pronóstico según la evaluación histológica comparados con los grupos CAC y CAC+DMSO-MC. A nivel celular se observó una disminución en el infiltrado de células dendríticas (CD) y linfocitos TCD4+ en el grupo de CAC+CPSI-156 asociado a una disminución del transcrito TNF- α en comparación con el grupo CAC. En conjunto, los resultados sugieren que inhibir MIF no es favorable en las primeras etapas del desarrollo del CAC, ya que participa favoreciendo el reclutamiento de células inmunes inflamatorias que participan en la contención de las células tumorales, participando de esta manera en el control del desarrollo del CAC.

1. INTRODUCCIÓN.

CÁNCER

Cáncer es un nombre que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, es el resultado de la interacción de factores genéticos y externos (físicos, químicos y biológicos), que producen la degeneración de las células (1).

En un estado normal éstas crecen y se dividen para formar nuevas células, cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren, y nuevas las remplazan. Sin embargo, en el cáncer a medida que las células se hacen más y más anormales, las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir, y células nuevas se forman cuando no son necesarias (1).

Las células se transforman en cancerosas debido a una alteración en el DNA. El DNA se encuentra en cada célula y dirige todas sus actividades. En una célula normal, cuando se altera el DNA, la célula repara la alteración o muere. Por el contrario, en las células cancerosas el DNA alterado no se repara, y la célula no muere como debería. En lugar de esto, esta célula persiste en producir más células que el cuerpo no necesita. Todas estas células nuevas tendrán el mismo DNA alterado que tuvo la primera célula anormal (2).

Además, las células cancerosas pueden ignorar las señales que normalmente dirigen a las células para que dejen de dividirse o que empiecen un proceso que se conoce como muerte celular programada, o apoptosis. Este mecanismo lo usa el cuerpo para deshacerse de las células que no son necesarias. Las células que no entran en apoptosis pueden dividirse sin interrupción y pueden formar masas denominadas tumores que suelen estar localizados, pero eventualmente pueden diseminarse e invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis (2).

2. MARCADORES DE CÁNCER

Capacidad biológica	Características
Señalización proliferativa sostenida	<p>La característica fundamental de las células cancerosas involucra su capacidad para mantener la proliferación crónica (3) (4).</p> <p>Los tejidos normales controlan la generación y liberación de señales promotoras del crecimiento a través del ciclo de división, asegurando, una homeostasis celular y así el mantenimiento de la arquitectura del tejido normal.</p> <p>Las células de cáncer desregulan estas señales, produciendo factores de crecimiento (EGF) que se unen a receptores de membrana con dominios intracelulares tirosina - cinasa, desencadenando vías de señalización que terminan en la activación del ciclo celular. Estos Factores de crecimiento no afectan una célula en particular, sino a tejidos enteros mediante señalización parácrina (6-10).</p>
Evasión de supresores de crecimiento	<p>Las células cancerosas también evaden supresores de factores de crecimiento; por ejemplo pueden ignorar las señales de la proteína P53 que es la encargada de regular la división celular, vigilando que las células crezcan y se dividan, se activa dependiendo del contexto, es decir, la gravedad y la persistencia de las condiciones de estrés celular y daño genómico, y puede desencadenar apoptosis (11).</p> <p>Otra evasión sucede en la proteína del retinoblastoma (RB), que integra señales intracelulares y extracelulares, y determina si la célula entra a fase de crecimiento o proliferación. En las células cancerosas los defectos en esta vía son persistentes, por tanto hay crecimiento y proliferación de células descontrolado (11, 12).</p>
Resistencia a la muerte celular	<p>En defensa al desarrollo del cáncer existen distintos mecanismos de muerte celular. El más importante es la apoptosis. En este proceso las señales son desencadenadas por Fas ligando – Fas receptor y culminan en la activación de la vía de las caspasas.</p> <p>Otro mecanismo es la autofagia, debido a que el ambiente en torno al tumor es limitado en nutrientes, se destruyen orgánulos celulares que se almacenan en</p>

	<p>autofagosomas y se degradan mediante lisosomas para obtener moléculas de bajo peso molecular que permitan a las células tumorales nutrirse.</p> <p>La necrosis es otro proceso en donde la célula muerta libera su contenido al tejido que la rodea, por tanto las células necróticas pueden reclutar y aumentar el nivel de células y citocinas pro-inflamatorias, así tendríamos que, como la inflamación puede favorecer la proliferación celular, la invasividad y la angiogénesis, entonces la necrosis puede considerarse favorecedora del desarrollo de cáncer (13-17).</p>
Inducción de la angiogénesis	<p>En el desarrollo y crecimiento del tumor la hipoxia y la señalización de oncogenes causan la sobreexpresión crónica de VEGF (Factor de crecimiento Endotelio Vascular), que es el principal inductor de angiogénesis. Sin embargo los vasos sanguíneos dentro de los tumores son distorsionados y engrosados, pero al mismo tiempo muy débiles; la neovasculatura es deforme, débil y muy ramificada, por lo tanto el flujo de sangre es muy errático (18-21).</p>
Activación de invasión y metástasis	<p>En los tejidos tumorales las células cancerosas sufren deformidades y alteraciones en la unión con la matriz extracelular y otras células. Cuando la transcripción de los genes de moléculas de adhesión falla es más fácil la migración celular (metástasis).</p> <p>La cascada de “invasión metastásica” inicia con la invasión local, le sigue la intravasación de las células cancerosas a los vasos sanguíneos y linfáticos más cercanos, para después escapar hacia el parénquima (extravasación), donde forman pequeños nódulos de células cancerosas que crecen y forman tumores (22, 23).</p>
Desregulación energética celular	<p>El mecanismo aerobio de obtención de energía en células tumorales se encuentra alterado, la producción de energía mediante glucólisis es limitada, la producción de ATP's es mucho menor a la que se obtiene mediante fosforilación oxidativa, entonces para balancear esta desigualdad las células cancerosas regulan la expresión de transportadores de glucosa GLUT-1. Este aumento de glucólisis da lugar a la diversificación de</p>

	intermediarios y a la generación de nucleosidos y aminoácidos, que facilitan la síntesis de macromoléculas y organelos celulares necesarios para la proliferación y replicación celular, favoreciendo así el cáncer (24-26).
Inestabilidad genómica y mutaciones	La inestabilidad genómica permite el desarrollo de otros marcadores de cáncer al generar mutaciones aleatorias y cambios epigénéticos que se heredan a las células hijas, acumulándose hasta formar el tejido tumoral, comprometiendo así, los sistemas de vigilancia genómico y evitando la senescencia y apoptosis (27, 28).

Tabla 1. Capacidades biológicas en el desarrollo de la carcinogénesis (3).

3. INFLAMACIÓN

La inflamación es una función crucial del sistema inmune innato. En condiciones normales, el proceso inflamatorio es una poderosa arma de nuestro sistema inmune. Es una respuesta aguda, agresiva, rápida e inespecífica contra microorganismos y cuerpos extraños que penetren en nuestro sistema con el objetivo de aislarlo y destruirlo rápidamente, evitar daños al tejido sano e iniciar el proceso de reparación (29).

3.1. INFLAMACIÓN CRÓNICA

La inflamación puede cursar por un periodo agudo que no siempre se resuelve, cuándo esta inflamación se mantiene durante un período prolongado, se habla de inflamación crónica que es un proceso rápido, en el que mediadores químicos son inducidos en una secuencia, estrictamente regulados, y las células inmunes se mueven dentro y fuera de la zona afectada, destruyendo agentes infecciosos, reparando tejido dañado, e iniciando la respuesta inmune específica y de largo plazo (inmunidad adaptativa) (29).

Muchas de las enfermedades en etapas medias y avanzadas pueden ser promovidas, al menos en parte, por la inflamación latente y a menudo crónica que se presenta, es por eso que se considera que la inflamación tiene un papel importante en la progresión maligna de muchas enfermedades (30).

3.2 ENFERMEDADES CRONICO-INFLAMATORIAS RELACIONADAS A CÁNCER

No se conoce el mecanismo exacto por el que la inflamación crónica provoca cáncer. El pensamiento más extendido actualmente es que las células cancerosas se ayudan de la respuesta inflamatoria para su crecimiento, lo que finalmente conduce al desarrollo de cáncer (30).

La proliferación celular por sí misma no causa cáncer, la proliferación celular sostenida en un ambiente rico en células inflamatorias, factores de crecimiento, estroma activado y agentes que causan daño al DNA, ciertamente potencializan y/o promueve el riesgo de desarrollar una neoplasia (31).

Esquemáticamente se reconocen dos vías; la vía intrínseca, que pertenece a eventos genéticos, es decir, cambios oncogénicos, como pueden ser mutaciones que favorecen la construcción de un ambiente inflamatorio propicio para la aparición de tumores (32).

La otra, es la vía extrínseca, relacionada a las enfermedades inflamatorias que preceden el desarrollo de la malignidad, los responsables son los factores desencadenantes de la inflamación crónica que aumentan el riesgo de padecer cáncer (32). Este enlace se ha confirmado en varios modelos murinos, especialmente en términos de cáncer gástrico (Infección por *H. pylori*) (33), cáncer de hígado (colangitis) (34) **y cáncer de colon** (colitis ulcerosa) (35). En estos y otros modelos de cáncer animal, las células y los mediadores de la inflamación crónica actúan como promotores de la formación de los tumores en distintas fases de la progresión maligna (30).

Cabe mencionar que cualquiera que sea su origen, e incluso si estas dos vías pudieran estar presentes al mismo tiempo, se destaca que la inflamación esta "latente", y puede ayudar en el sostenimiento de una proliferación y supervivencia de las células malignas, así como promover la angiogénesis y la metástasis (32).

3.2.1. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII)

El término Enfermedad Inflamatoria Intestinal (IBD del inglés Inflammatory Bowel Disease) incluye una amplia variedad de manifestaciones clínicas cuya característica principal es la inflamación crónica del tubo digestivo en diferentes localizaciones.

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) incluye tres casos principales: La Enfermedad de Crohn (EC), la Colitis Indeterminada (CI) y la Colitis Ulcerativa (CU): las tres pertenecen a la misma afección, dada la similitud en ciertos aspectos patogénicos, clínicos evolutivos y de respuesta al tratamiento (5).

La CU se caracteriza por la inflamación de la mucosa difusa limitado al colon, este consta de cuatro secciones:

- Colon ascendente. Comienza con el ciego, donde el intestino delgado se une al colon.
- Colon transversal que se extiende a través del cuerpo de lado derecho hacia el lado izquierdo en el abdomen superior.
- Colon descendente, continúa hacia abajo en el lado izquierdo.
- Colon sigmoide debido a su forma en "S", termina en el recto (36).

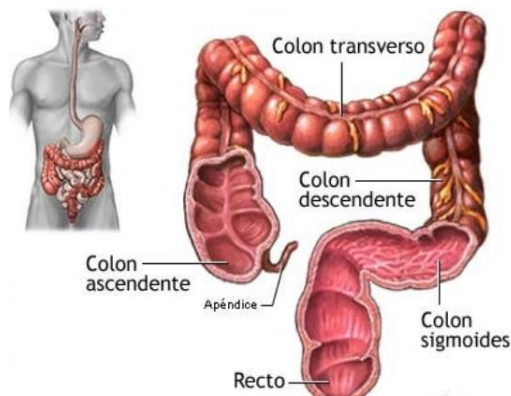


Figura 1. Anatomía del colon (Tomado de (4)).

La colitis ulcerativa (CU) es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta a la mucosa del colon. La lesión se inicia en el recto (sólo excepcionalmente el recto queda exento), pudiendo alcanzar una extensión variable de forma proximal y continua hasta el ciego. El curso de la enfermedad suele ser en forma de brotes de actividad (durante los cuales el grado de inflamación aumenta y se agudiza), siendo imprevisible el número, la periodicidad y la gravedad de éstos. Estos brotes

de actividad se siguen (espontáneamente o inducidos por el tratamiento) de períodos de remisión de duración variable (32).

Los síntomas típicos que se observan en la CU son fundamentalmente los derivados de la afección de la mucosa del colón: Rectorragia y diarrea. La CU puede preceder a la iniciación de un crecimiento anormal de células (tumor), es decir, cáncer de colón, que se correlaciona directamente con la gravedad y longevidad de la enfermedad activa, sobre todo con el grado de inflamación que se presente en el curso de esta (36).

4. CÁNCER COLORECTAL ASOCIADO A COLITIS

4.1. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial. En 2012 se le atribuyeron 8,2 millones de defunciones. Los principales tipos de cáncer fueron:

- Mama
- Próstata
- Cervico uterino
- **Colorrectal (694 000) defunciones.**

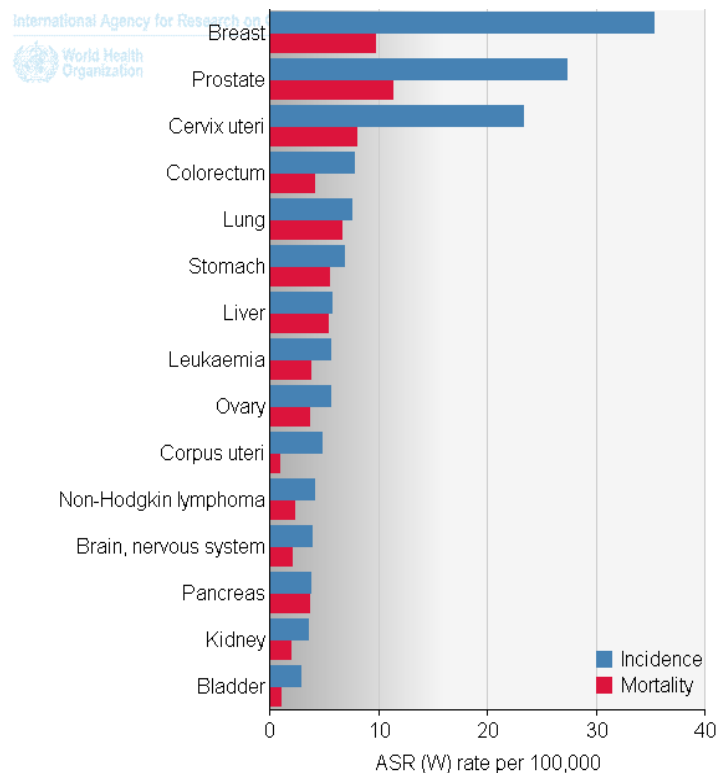


Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer colorrectal. Esta patología ocupa el 4o lugar de casos por cada 100,000 habitantes a nivel mundial (1).

El cáncer colorrectal es la tercer causa de muerte por cáncer en los hombres (746,000 casos, 10% del total) y la segunda en mujeres (614,000 casos, 9.2% del total), en todo el mundo. Casi el 55% de los casos ocurren en las regiones más desarrolladas. Existe una gran variabilidad geográfica en la incidencia en todo el mundo y los patrones geográficos son muy similares en hombres y mujeres: las tasas de incidencia varían de diez veces en ambos sexos en todo el mundo, y las tasas de mortalidad son mayores en países menos desarrollados lo que refleja una peor supervivencia en estas regiones (1).

4.2. ETIOLOGIA

Los riesgos de desarrollar CAC resultan de una interacción entre hábitos alimenticios, factores ambientales y susceptibilidad genética de cada persona. El consumo de alcohol y tabaco, la dieta malsana; el consumo de una mayor cantidad de carne roja procesada, y la inactividad física; las personas con un estilo de vida sedentario, con sobrepeso u obesidad, son las causas mayormente asociadas a CAC. Algunas infecciones crónicas también constituyen factores de riesgo, y son más importantes en los países de ingresos medios y bajos, pero aún más importantes son las inflamaciones crónicas prolongadas (1).

La inflamación en la CU conduce a una alteración de la barrera epitelial y la formación de ulceración epitelial (37), que permite un fácil acceso para los antígenos de la microbiota luminal y las células residentes de la lámina propia, estimulando así, aún más las respuestas de las células del sistema inmune (38).

Sin embargo, los mecanismos que subyacen a la transformación neoplásica no se entienden completamente. Los estudios en modelos experimentales de CAC sugieren que células inflamatorias y citocinas, ya sea directamente o indirectamente estimulan el crecimiento celular descontrolado (39). Estas células pueden generar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que a su vez van a generar alteraciones en el material genético como mutaciones, o daño en el sistema de reparación mismatch (por mal apareamiento de bases) del DNA y

metilación de genes regulatorios como *Adenomatous polyposis coli (APC)* (40). La mutación de APC causa la activación de la vía Wnt/ β -catenina. La principal consecuencia de la mutación de APC es la ausencia de unión a β -catenina y axina, llevando a la acumulación de β -catenina. Además de esta función, la proteína APC, que también se localiza en el núcleo celular, contribuye a la salida del núcleo de la β -catenina (41).

Los niveles intracelulares de proteína β -catenina están controlados de una manera estricta y compleja. En ausencia de Wnt, en las células epiteliales normales la β -catenina está fundamentalmente unida a E-cadherina. La cantidad de β -catenina libre en el citosol es muy escasa debido a su rápida degradación. La β -catenina no unida a E-cadherina forma complejos con axina y el producto del gen supresor tumoral APC, y es rápidamente fosforilada por las proteínas quinasas caseína quinasa I (CKI) y glucógeno sintasa 3 β (GSK-3 β). Ello provoca su unión a β -TrCP y subsiguiente ubiquitinación y degradación por el proteasoma. La unión de los factores Wnt a su complejo receptor (Frizzled-LRP5/6) de la membrana plasmática impide este proceso mediante un mecanismo en el que participan poblaciones de las quinasas CKI y GSK-3 β localizadas en la membrana, que actúan sobre LRP5/6 y atraen así a Axina, lo que impide la formación del complejo que lleva a la fosforilación de β -catenina.

De modo aún no bien conocido Dishevelled (Dsh) interviene en la desintegración del complejo APC-Axin-GSK3 β - β -catenina, y con ello se impide la fosforilación y degradación posterior de ésta. Ello conduce a la acumulación de β -catenina libre en el citoplasma, que puede entonces translocarse al núcleo y regular actuando como un co-activador transcripcional de la expresión génica uniéndose a una familia de proteínas denominadas T-Cell Factors o TCF (TCF-1, TCF-2 o LEF-1, TCF-3 y TCF-4). Estos se hallan unidos al DNA generalmente reprimiendo la expresión génica; efecto que es revertido por la unión de β -catenina, que causa la activación de los genes que estaban reprimidos por TCF como los proto-oncogenes (c-MYC, c-JUN, FRA-1) y reguladores del ciclo celular (ciclina D1). El resultado es el aumento de la proliferación celular, la pérdida del fenotipo normal y el aumento de la migración e invasividad (figura 3) (42, 43).

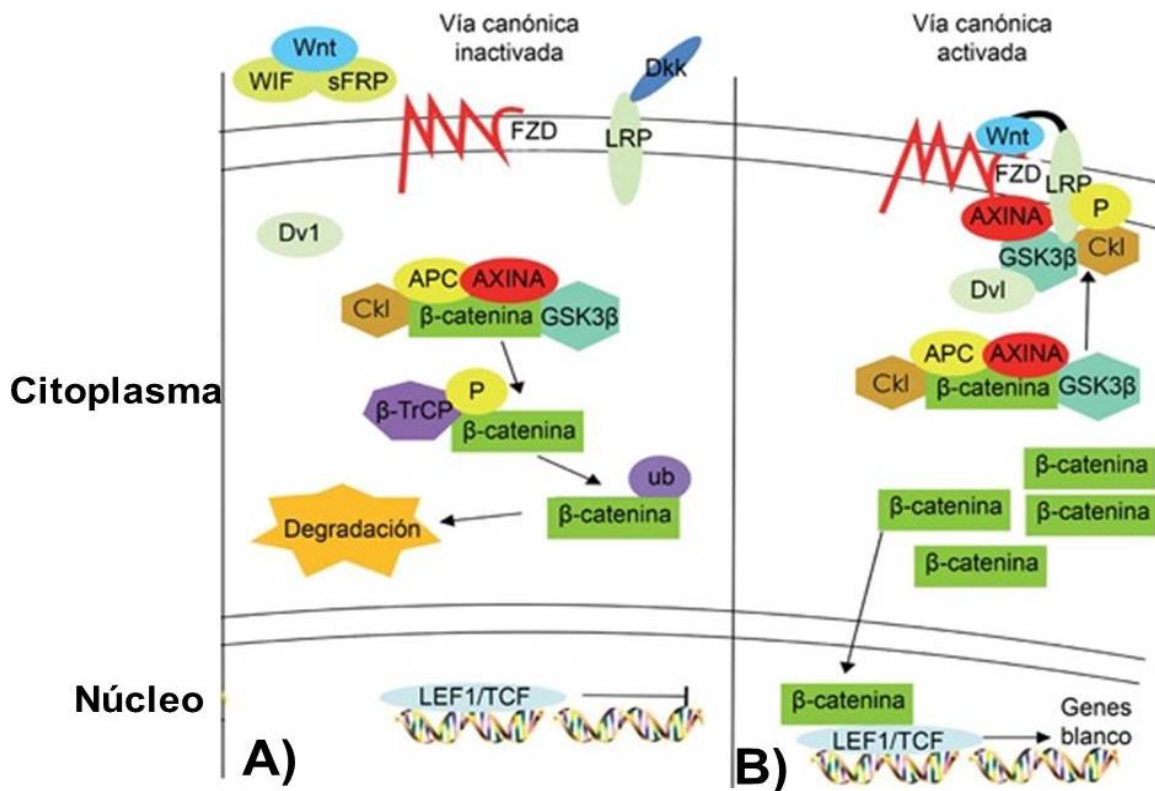


Figura 3. Vía de señalización Wnt-β-catenina. A) En ausencia del ligando Wnt, las β-cateninas son reclutadas por el complejo APC/axina/ GSK-3β y fosforiladas por GSK-3β. Las β-cateninas fosforiladas son degradadas en los proteosomas. B) Wnt se une al receptor Fzd y al co-receptor LRP5/6, lo que activa la proteína Dvl que, a su vez, inhibe al complejo APC/Axina/GSK-3β, como resultado, β-catenina no se degrada, se acumulan y migran al núcleo, en donde forma un complejo con LEF-1/TCF que inicia la transcripción de genes diana: c-MYC, Ciclina D1, entre otros. Esquema tomado y modificado de (5).

5. RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE ANTE EL CÁNCER

5.1 INMUNOVIGILANCIA

Numerosas evidencias experimentales y clínicas indican que la respuesta inmune, tanto innata, como adaptativa nos protege frente al desarrollo de tumores.

El sistema inmune a través de la interacción con las propias células tumorales, modifica el fenotipo tumoral, determinando la aparición de variantes poco inmunogénicas que facilitan el crecimiento tumoral al impedir el reconocimiento inmunitario. El término inmunovigilancia es referido al momento en que el sistema inmune no ha sido manipulado y es capaz de reconocer y eliminar células que ya conforman tumores primarios. A pesar de este mecanismo cualquier organismo puede desarrollar cáncer, ya que el sistema inmunológico edita o modela la inmunogenicidad del tumor, este proceso es conocido como inmunoedición del cáncer (44).

5.1.1. INMUNOEDICIÓN

La inmunoedición del cáncer pertenece a la interacción permanente de los tumores con el sistema inmune durante extensos períodos de tiempo, en donde este determina, por un proceso de selección natural que estos tumores sean editados o modificados. Consta de tres fases:

Eliminación: Esta etapa corresponde al concepto original de inmunovigilancia. Los protagonistas del sistema inmune son tanto de la inmunidad innata, como de la inmunidad adaptativa. Los linfocitos TCD4+ (Th1), los linfocitos Th17, los linfocitos TCD8+ citotóxicos, las células NK, las células NKT, los macrófagos y los linfocitos Tγδ, son claves en la eliminación de las células transformadas. Los linfocitos Th1, Tγδ y las células NK son la mayor fuente de IFN-γ, citocina clave en el proceso de eliminación tumoral, ya sea actuando directamente sobre la célula tumoral o activando células efectoras de la respuesta inmune. Los mecanismos que conducen a la eliminación de las células tumorales involucran, en primer lugar, mecanismos citotóxicos mediados por perforinas y granzimas, y por el sistema de apoptosis Fas-ligando.

Las células NK son clave en la eliminación temprana de tumores dependiendo de la producción de IFN-γ y a la manifestación de su potencialidad citotóxica (45).

Equilibrio: Las células tumorales que no son eliminadas por el sistema inmune en la primera fase, proceden hacia una fase de equilibrio, en donde si bien son

controladas, ya no pueden ser eliminadas. Aquí los linfocitos TCD4+ y TCD8+ e IFN- γ mantienen a las células transformadas en estado de “dormancia” o latencia para impedir el crecimiento y proliferación del tumor por largos periodos de tiempo, generando así una presión de selección sobre las células tumorales propiciando la edición del tumor, lo que a su vez permite la formación de variantes tumorales con baja inmunogenicidad (45).

Escape: Finalmente los tumores que ya no son susceptibles al reconocimiento y al ataque del sistema inmune progresan hacia la fase de escape. Esta fase coincide en general, con la aparición de manifestaciones clínicas. Y es, en esta fase donde los tumores despliegan múltiples mecanismos inmunosupresores para evadir la respuesta de las células T efectoras, ya sea eludiendo el reconocimiento inmunitario o inhibiendo a los mecanismos inductores efectoras en la respuesta inmune antitumoral (45).

Los principales mecanismos de escape incluyen:

- Alteraciones en los componentes de la maquinaria de procesamiento y presentación antigénica.
- Defectos en la señalización a través del TCR.
- Liberación de factores pro- apoptóticos o inmunosupresores.
- Activación de vías inhibitorias de señalización y reclutamiento de células T reguladoras.

En algunos casos, por influencia de factores externos, las fases no siempre ocurren en el mismo orden (19).

6. AMBIENTE INFLAMATORIO EN EL CÁNCER COLORECTAL

En el cáncer colorrectal el primer paso es la inflamación aguda, que es la acumulación de leucocitos, proteínas plasmáticas y líquido derivados de la sangre en el tejido extravascular. Los leucocitos y citocinas plasmáticas realizan varias funciones efectoras que sirven para comenzar la reparación del daño tisular. El

leucocito más abundante que se recluta de la sangre en las zonas con una inflamación aguda es el neutrófilo y los monocitos sanguíneos, que se convierten en macrófagos que destacan más, a medida que pasa el tiempo y pueden convertirse en la población dominante. El reparto de estos componentes sanguíneos en la zona inflamatoria depende de cambios reversibles en los vasos sanguíneos del tejido dañado o infectado. Todos estos cambios los inducen las citocinas y moléculas mediadoras pequeñas derivadas inicialmente de las células residentes del tejido, como los mastocitos, los macrófagos y las células endoteliales, en respuesta al estímulo de los PAMPs (Patrones moleculares asociados a patógenos) y DAMPs (Patrones moleculares asociados a lesión/daño) (29).

La inflamación aguda puede desplegarse en minutos y durar horas o incluso días. La inflamación crónica es el proceso que le sigue, suele implicar el reclutamiento y activación de monocitos y linfocitos. Los lugares de inflamación crónica también sufren a menudo una reestructuración tisular con angiogenia y fibrosis. Aunque los estímulos de la inmunidad innata pueden contribuir a la inflamación crónica también puede participar la respuesta adaptativa, debido a que las citocinas producidas por los linfocitos T son poderosos inductores de la inflamación sostenida (29).

6.1. LINFOCITOS TCD4+

Las funciones de los Linfocitos TCD4+ son reclutar y activar a los macrófagos y neutrófilos así como otros leucocitos para que destruyan a los patógenos intracelulares y a algunos extracelulares, y ayudar a los linfocitos B para producir anticuerpos. Los linfocitos TCD4+ son cruciales para eliminar los microbios por medio de los fagocitos, pero no se consideran suficientes para destruir las células tumorales, aunque cuando son activados hacia un perfil Th1 pro-inflamatorio promueven la proliferación de linfocitos TDC8+ que son más eficaces en la destrucción del tumor (29) (46).

6.2. LINFOCITOS TCD8+

También llamados linfocitos citotóxicos, llevan a cabo la función de matar a las células infectadas. Las citocinas producidas por los linfocitos TCD8+ efectores también contribuyen a la eliminación de muchos tumores.

Los linfocitos TCD8+ pueden diferenciarse en CTL (Linfocitos citotóxicos) efectores, esta diferenciación implica la adquisición de la maquinaria necesaria para matar a las células diana cómo células infectadas o tumorales que, por expresar antígenos distintos a los propios asociados a las moléculas MHC I, son identificadas como diferentes. Los linfocitos TCD8+ vírgenes reconocen antígenos, pero necesitan proliferar y diferenciarse para generar un grupo suficientemente grande de CTL que destruya la fuente del antígeno. Dentro del citoplasma de los CTL diferenciados hay numerosos lisosomas modificados, que contienen proteínas, incluidas la perforina y las granzimas, cuya función es matar a otras células; mientras que la perforina se polimeriza para formar poros en la membrana de la célula blanco, las granzimas activan vías apoptóticas endógenas de las células blanco. Además, los CTL diferenciados son capaces de secretar citocinas, sobre todo IFN- γ , que activa a los fagocitos (29, 47).

Gracias a estas funciones descritas se ha asociado la presencia y ubicación en el ambiente tumoral, de linfocitos TCD8+ infiltrados cercanos a las células tumorales con un buen pronóstico, es decir una mayor supervivencia para los pacientes con esta característica (47).

7. LAS CITOCINAS EN LA INFLAMACIÓN Y EL CÁNCER

Se sabe que las células neoplásicas contienen mediadores pro-inflamatorios a menudo sobre-expresados, que incluyen proteasas, eicosanoides, quimiocinas y citocinas que son liberadas de la activación de células inmunes; entre ellas, el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α), el IFN- γ , algunas Interleucinas (IL), y el Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) (48).

Célula productora	Citocina	Blancos celulares y efectos biológicos
Macrófagos, linfocitos T.	IL-10	Regulador de la respuesta inflamatoria del huésped, particularmente de respuestas donde participan macrófagos (29).
Linfocitos TCD4+, Linfocitos B, células NK y NKT, macrófagos, fibroblastos y células dendríticas.	IFN-γ	Favorece la apoptosis, el arresto del ciclo celular y la inflamación. Activación de macrófagos, aumento del procesamiento de antígeno y su presentación a linfocitos (49).
Macrófagos, Linfocitos T, las células dendríticas y otros tipos celulares. En los macrófagos la estimulación está dada por PAMPs y DAMPs	TNF-α	Induce inflamación y la activación de células endoteliales y neutrófilos. Favorece la apoptosis de numerosos tipos celulares (29).
Macrófagos activados	IL-1β	Induce las moléculas de adhesión en las células endoteliales (50).
Macrófagos, Células B y células T.	MIF	Citocina pro-inflamatoria, e inductora de otras citocinas inflamatorias como TNF- α e IL-1 β . Tienen función de

		quimiocina, recluta diferentes tipos celulares (37).
--	--	--

Tabla 2. Descripción de los blancos celulares y efectos biológicos de citocinas implicadas en cáncer.

7.1. FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS (MIF)

El Factor Inhibidor de la migración de Macrófagos (MIF) fue originalmente identificado como una linfocina derivada de células T (51). Estudios recientes han revelado que MIF es una proteína que se expresa de forma ubicua en diversos tipos de células y se ha reevaluado como citocina pluripotente; al ser reconocida con funciones de una hormona, pues en ocasiones es producida por células corticotrópicas de la glándula pituitaria (37), cómo activador de las células T en las respuestas inmunes, funciones enzimáticas (actividad tautomerasa *in vitro*) (52); aunque no se ha demostrado que tenga una función biológica como enzima se ha observado que la estructura de su sitio de unión a sus receptores es indispensable para que la molécula pueda realizar sus funciones biológicas, se considera una citocina pro-inflamatoria liberada principalmente por los macrófagos. Es un hecho que las citocinas pro-inflamatorias están involucradas en la patogénesis de la EII, especialmente en la exacerbación de la enfermedad (36).

Por lo anterior MIF se ha descrito también cómo una molécula pleiotrópica que promueve la producción de otras citocinas inflamatorias incluyendo TNF- α , IFN- γ , y algunas Interleucinas, favoreciendo así un ambiente inflamatorio.

8. PAPEL DE MIF EN EL CÁNCER COLORECTAL ASOCIADO A COLITIS

Debido a que distintos estudios han descrito sobre-expresión de los niveles en suero o plasma de MIF en enfermedades relacionadas a inflamación, tales como

encefalomielitis (51), esclerosis múltiple (53) , diabetes mellitus no dependiente de insulina (54), cáncer de vejiga (55), cáncer de próstata (56) y cáncer de colón (48). MIF, ha sido recientemente propuesto cómo un marcador biológico de cáncer (57).

La internalización de MIF en las células puede ser a través de una vía mediada por el receptor clásico CD74 o por la vía endocítica no clásica (mediante endocitosis) (37).

El grupo de diferenciación CD74, el receptor de MIF, es una proteína transmembranal de tipo complejo principal de histocompatibilidad (MHC)-II, este receptor es transitoriamente expresado en la superficie de diversas células, incluyendo monocitos, células B, fibroblastos, etc (37).

La función exacta de CD74 en la superficie de las células no se ha determinado concretamente. Sin embargo, sí se sabe que MIF se une al dominio extracelular de CD74 con alta afinidad, activando la vía de las MAPK, favoreciendo la fosforilación de ERK1/2 e induciendo la activación de A2 (PLA2) y la síntesis de ácido araquidónico, lo que tiene como consecuencia un aumento en los niveles de COX2. Al mismo tiempo, se disminuye la fosforilación de la Ser 15 de p53 mediada por óxido nítrico (NO). Como consecuencia no se va acumular p53 y se va detener el proceso de apoptosis, permitiendo así, la progresión del ciclo celular (crecimiento y proliferación) (56).

El dominio citosólico de CD74 es muy corto y parece carecer de dominios de señalización intracelular. Estudios recientes han identificado el reclutamiento de una proteína accesoria potencial transmembranal CD44 como necesaria para la transducción de señales MIF-CD74, teniendo así la formación de un complejo molecular entre MIF, CD74 y CD44. Con esta activación tenemos que el enlace MIF-CD74, logra prender también la cascada de señalización que activa NF-kappa B promoviendo aún más la respuesta inflamatoria (56).

Por otro lado, MIF es considerada una citocina con funciones de quimiocina por poseer ligandos a receptores acoplados a proteínas G como CXCR2 y CXCR4 que intervienen en la activación de la vía de Rho-GTPasas permitiendo la

remodelación del citoesqueleto de actina y la quimitoaxis de los macrófagos (CXCR2) y de linfocitos (CXCR4) (57).

Con lo anterior tenemos que MIF es inusual en su contribución al crecimiento y la supervivencia de una neoplasia en desarrollo, en primer lugar, porque es constitutivamente expresado y almacenado, preformado en las células (9). En segundo lugar, MIF es único debido a que funciona en muchos procesos asociados con la supervivencia del tumor incluyendo la división celular, la angiogénesis, y la supresión de la vigilancia inmune de la célula huésped-tumor (52).

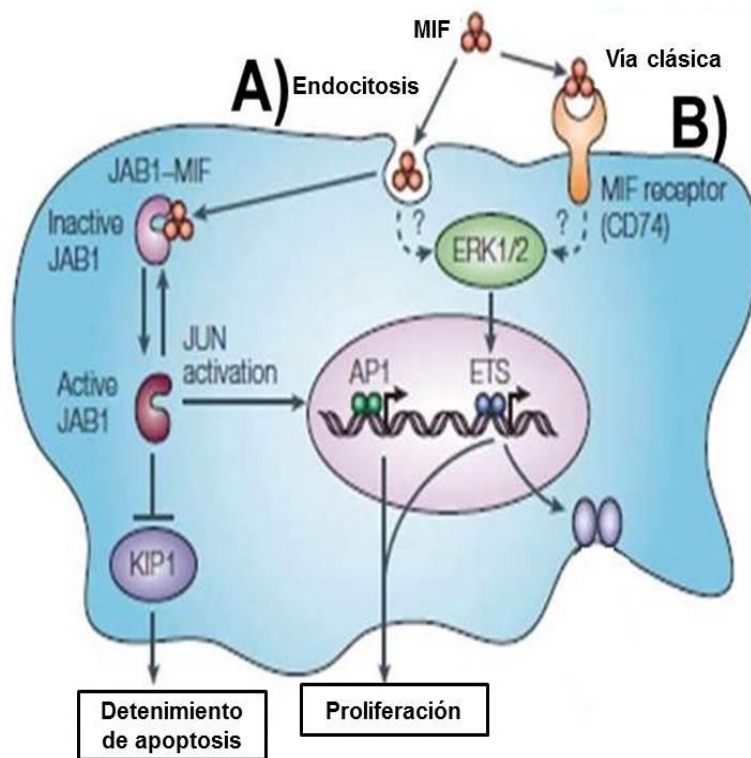


Figura 4. Mecanismo de acción de MIF. La manera en que MIF regula sus actividades biológicas, puede ser a través de: A) una vía endocítica, no clásica, es decir por endocitosis, o mediante B) vía clásica, mediada por el receptor CD74. Una vez activado promueve el crecimiento celular y activa factores de transcripción de la familia ETS. Esquema tomado y modificado de (12).

8.1 INHIBICIÓN DE MIF

En diversas enfermedades inflamatorias se ha encontrado sobre-expresado MIF en suero o plasma. Y se ha podido establecer su influencia como molécula que favorece el proceso inflamatorio en éstas patologías. Dado que el cáncer colorrectal deriva de una CU, caracterizada por inflamación crónica asociada a niveles incrementados de MIF, estudios recientes se han enfocado a tratar de establecer la participación de MIF en la génesis y desarrollo del cáncer colorrectal. Para tales casos, se han utilizado algunos anticuerpos y compuestos químicos específicos para inhibir la acción de MIF. En la Tabla 3 se resumen algunos de estos trabajos.

AUTOR	APORTACIÓN
Bucala y Donnelly, 2009 (58).	-MIF también se ha mostrado antagonista de la detención del crecimiento y acciones pro-apoptóticas del gen supresor de tumor Tp53, el cual es inducido en células normales para limitar las excesivas respuestas pro-inflamatorias.
Xing-Xiang He, et al, 2009 (48).	-In vitro la adición de MIF recombinante (rMIF) en líneas celulares CT26 aumentó significativamente sus propiedades invasivas y la expresión de VEGF y MP 2 y 9. - <i>In vivo</i> carga tumoral y peso de tumores significativamente reducidos cuando se aplica el inhibidor ISO-1 (20mg/kg) y anti MIF.
Sanchez-Zamora, et al., 2010 (54).	-En ratones inducidos con diabetes tipo 1 (NIDDM) se observó una reducción significativa de los niveles de glucosa en sangre y los niveles de citocinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α en ratones WT administrados con CPSI-1306 y resultados parecidos en ratones <i>Mif</i> ^{-/-} .
Kithcart A. P., et.	-En las patologías de Esclerosis Múltiple y Encefalomielite, los ratones <i>Mif</i> ^{-/-} son menos propensos a desarrollar las

al., 2010 (53).	<p>enfermedades que ratones <i>Mif+/+</i>.</p> <p>-La aplicación oral de CPSI-1306 y CPSI-2705 tiene un efecto protector para el desarrollo de Encefalimelitis en ratones WT, demostrando así que los inhibidores de MIF, reducen la actividad biológica, ya que evitan la migración de células inflamatorias en el SNC.</p>
Choudhary S., et al., 2013 (55).	<p>El uso de un inhibidor oral de MIF (CPSI-1306) disminuye eficazmente el crecimiento y la progresión de tumores de cáncer de vejiga en un experimento <i>in vivo</i>.</p>
Lee, et al., 2008 (59).	<p>-MIF presenta mayor sensibilidad (47.3%) que un marcador establecido CEA (29.5%) en el diagnóstico del cáncer colorectal, a pesar de que en este no hay reportes que se use como marcador, si es utilizado en el cáncer de ovario.</p>
Ogawa, et al., 2000 (60).	<p>-Ratones portadores de tumores (inducido con líneas celulares de cáncer colorectal) tratados con un anticuerpo antiMIF en los días 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21, reducen significativamente el crecimiento de tumores del día 15 al 22 (etapas avanzadas).</p>
Short A., 2010 (61).	<p>-Exploran la eficacia de los inhibidores de MIF CPSI-00155F y CPSI-00155S en ratones C57Bl/6 inducidos con Encefalimelitis, 17 días p.i., durante el pico de la enfermedad, se les administro 10.0 mg / kg de cada inhibidor, disuelto en DMSO al 25% y metilcelulosa al 0.5%</p> <p>-Los dos inhibidores disminuyen la gravedad de la enfermedad, aunque CPSI-00155F en mayor porcentaje.</p>
Choi S., et al., 2015 (62).	<p>Utilizaron la línea celular de cáncer de colón CT26 en ratones <i>Mif-/-</i> y <i>Mif+/+</i>, el crecimiento del tumor fue significativamente menor en ratones <i>Mif-/-</i>; en el análisis de citometría de flujo de células de bazo y células tumorales, ratones <i>Mif-/-</i> tenían niveles más bajos de TCD4+, así como un aumento de las TCD8+ inducidas por citotoxicidad tumoral, que ratones</p>

	<i>Mif</i> ^{+/+} .
Ramireddy L. <i>et al.</i> , 2015 (63).	La presencia de un polimorfismo de <i>Mif</i> se asoció con la susceptibilidad, edad del paciente, y las etapas en que se encuentra el CAC. Personas menores de 50 años, en etapas tardías, presentan elevadas concentraciones de MIF.

Tabla 3. Antecedentes donde se ve involucrada la molécula MIF en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer.

8.1.1. INHIBIDOR DE MIF, CPSI-156

Los compuestos relacionados a las isoxazolininas son composiciones farmacéuticas involucradas en tratamientos contra algunas bacterias, parásitos y algunos tipos de cáncer. Este tipo de compuestos son útiles para tratar una variedad de enfermedades que implican cualquier estado de inflamación, en humanos, u otros mamíferos, que presenta exacerbada, alterada o no regulada la actividad de MIF sistémico o local, o que presente cualquier estado de enfermedad que se modula mediante la inhibición de la ruta de ERK/ MAPK (64).

Estos compuestos actúan de modo sistémico, es decir, tras la ingestión, la sustancia activa se absorbe en sangre, a través de la cual se distribuye por todo el cuerpo, de ahí la importancia de que se administren de manera oral (65).

CPSI-156, inhibidor sintético de MIF, es una molécula pequeña, hidrofóbica y con estructura de isoxazolinina que actúa inactivando el trímero MIF, impidiéndole así, que se lleve a cabo cualquiera de sus actividades biológicas (54), y en consecuencia altera también las actividades relacionadas con otras citocinas afectadas por la actividad de MIF, incluyendo interleucinas, IFN- γ y TNF- α . La actividad enzimática (tautomerasa) de MIF, así como sus otras actividades biológicas se ven afectadas debido a que estos agentes de bajo peso molecular se unen a MIF, cerca o específicamente en su dominio de unión a receptores (64).

Los vehículos de suministro para fármacos hidrófobos deben ser ciertos disolventes orgánicos tales como dimetilsulfóxido (DMSO), en algún porcentaje de dilución para disminuir su toxicidad. Adicionalmente, los compuestos se pueden administrar también usando liposomas, aunque se describe una menor biodisponibilidad por ser aplicados subcutáneamente (64) (54).

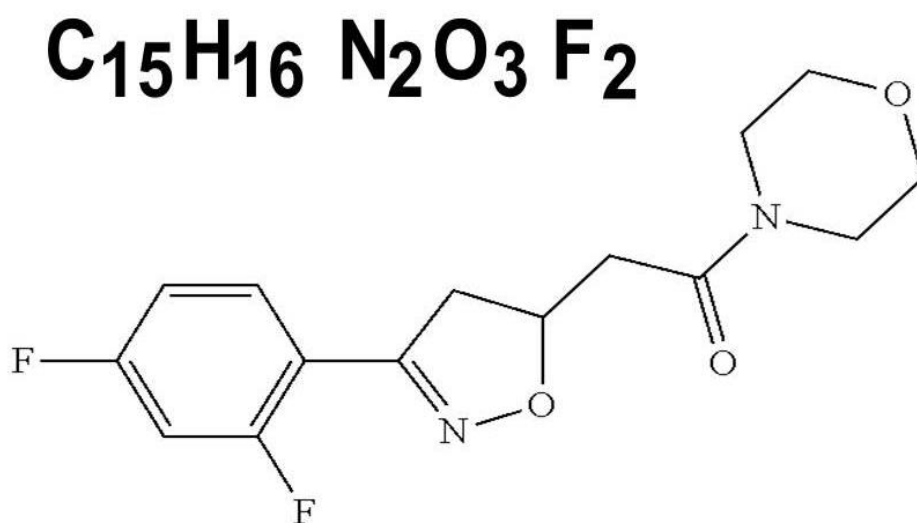


Figura 5. Estructura química del inhibidor sintético de MIF. Estructura y fórmula química del inhibidor utilizado en este estudio (63).

JUSTIFICACIÓN

MIF es un componente importante como promotor del proceso inflamatorio característico de la CU, uno de los mayores factores de riesgo para desarrollar cáncer de colón (CAC). Sin embargo, la participación de MIF en la génesis y desarrollo del CAC no ha sido bien establecida. Los pocos estudios que se han realizado de MIF y CAC muestran resultados controversiales (revisar tabla 3). En algunos casos se sugiere que MIF tiene una participación benéfica para controlar la progresión del cáncer (54), mientras que en otros se sugiere que MIF actúa a favor del desarrollo de los tumores (57,47).

Estas inconsistencias en los distintos reportes pueden ser debido a que, en algunos casos, a pesar de haber utilizado ratones genéticamente deficientes para MIF, el modelo de CAC fue generado por la implantación de células tumorales que son altamente productoras de MIF, de tal manera que no había una plena ausencia de la molécula MIF para poder establecer su participación (61,62). En otros estudios donde se ha trabajado con compuestos químicos inhibitorios de la molécula MIF que están destinados a inhibir su acción biológica (59), los resultados casi siempre muestran una disminución en la progresión de la patología, es decir, menor desarrollo de tumores. Pero nuevamente, estos modelos experimentales también fueron generados con la implantación de líneas celulares. Que además, previamente han sido manipuladas y cultivadas, y como ya se mencionó, también son capaces de producir MIF por sí mismas.

En este trabajo proponemos un modelo murino de CAC que se genera a partir de un daño genético inducido por azoximetano, e inhibir la actividad de la proteína MIF. De esta manera estaremos determinando el impacto de ésta molécula en el desarrollo del CAC e inferir un posible mecanismo de acción de MIF sobre el CAC.

HIPOTESIS

En el modelo murino de CAC por azoximetano la inhibición de la proteína MIF en el inicio del desarrollo del cáncer reducirá el proceso inflamatorio y el infiltrado de células inmunes (linfocitos, y células presentadoras de antígeno), afectando la capacidad de contener la transformación celular y el desarrollo de los tumores. Por tanto, la aparición de tumores colorectales se verá exacerbada.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar el efecto de la inhibición de la proteína MIF utilizando el inhibidor sintético CPSI-156 (administrado vía oral) en el desarrollo del cáncer colorectal derivado de colitis crónica en un modelo murino.

PARTICULARES

1. Inducir el modelo de CAC mediante el uso de azoximetano (AOM) y dextrán sulfato de sodio (DSS).
2. Establecer los grupos experimentales: grupo 1) Ratones tratados vía oral con CPSI-156 (CAC+CPSI-156), grupo 2) ratones con CAC tratados únicamente con vehículo (CAC+DMSO-MC), grupo 3) ratones con CAC sin tratamiento (CAC), y grupo 4) ratones sanos (S).
3. Observar y registrar en los grupos experimentales los signos clínicos cómo cambio en el porcentaje de peso, presencia de diarrea y sangrado, a lo largo del experimento.
4. Comparar longitud, carga tumoral y tamaño de tumores del intestino grueso en los grupos CAC, CAC+DMSO-MC, CAC+CPSI-156 , al final del tratamiento (68 días pos inducción de CAC).
5. Conocer el grado del daño morfológico a nivel microscópico mediante cortes histológicos, en todos los grupos.
6. Evaluar el reclutamiento celular de macrófagos, células dendríticas, y linfocitos T CD4+ y CD8+ mediante citometría de flujo en todos los grupos, al final del tratamiento
7. Analizar la expresión de los transcritos de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en tejido intestinal mediante RT-PCR.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) hembra de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad (ENVIGO, Mex), se mantuvieron durante todo el tratamiento en un ambiente libre de patógenos con libre acceso a agua y alimento en el bioterio de la FES-Iztacala.

Inducción del CAC y tratamientos

Se formaron 4 grupos con 5 ratones cada uno, de los cuales en 3, se desarrolló el modelo de cáncer de colón derivado de colitis crónica (CAC) descrito por Neufert et al., 2007 (66), este consiste en una inyección única de azoximetano (25mg/Kg) (Sigma-Aldrich, México) vía intraperitoneal, seguido de 3 ciclos de dextran sulfato de sodio (DSS) al 2% (MP Biomedicals, México) (Figura 5). En cada ciclo se administró DSS al 2% disuelto en el agua para beber durante 7 días, seguido de la administración de agua y alimento normales durante 14 días.

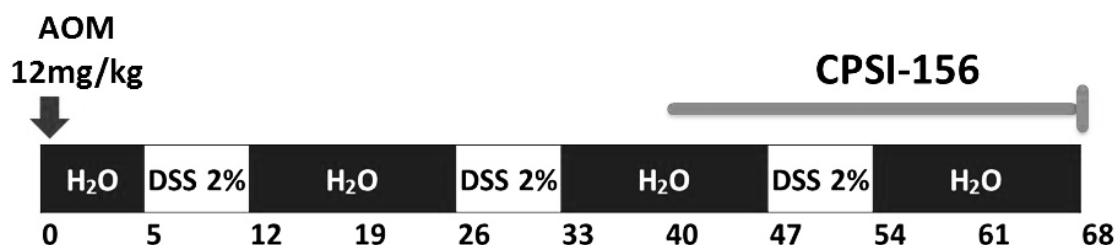


Figura 6. Modelo de cáncer colorectal inducido por AOM.

Los grupos quedaron conformados de la siguiente manera: un grupo de ratones sanos, un grupo de control negativo: CAC+DMSO-MC (inducido con cáncer de colón y administrado con el vehículo DMSO al 15% y metilcelulosa al 0.1%), un grupo de control positivo CAC (inducido únicamente con cáncer de colón) y el grupo administrado con el inhibidor: CAC+CPSI-156 (inducido con cáncer de colón y administrado con el inhibidor sintético de MIF, CPSI-156 (1mg/Kg) disuelto en el vehículo DMSO al 15% y metilcelulosa 0.1%). El tratamiento del inhibidor (o en su caso solo vehículo) fue administrado vía oral con ayuda de una cánula de metal

(54) a partir del día 40 del tratamiento. Todos los grupos fueron monitoreados visualmente hasta el día 68 cuando fueron sacrificados en cámara de CO₂.

Monitoreo de los síntomas clínicos

Se monitorearon los cambios de peso por semana durante los 68 días, en los cuatro grupos. Se registró el día cuando apareció diarrea y sangrado rectal en los grupos de CAC, CAC+DMSO-MC y CAC+CPSI-156.

Evaluación del desarrollo de tumores

Al día 68 los ratones fueron sacrificados, se les extrajo el intestino grueso, se lavó con PBS frío y se midió la longitud de cada uno con ayuda de un vernier. Posteriormente los intestinos se abrieron longitudinalmente para cuantificar los tumores que presentaron (con ayuda de gotas de azul de tripano, para poder distinguirlos mejor) y se midió el tamaño de cada tumor (largo x ancho), para obtener de cada ratón la carga tumoral en mm³ con la fórmula: $(\text{Largo} \times \text{ancho}^2)/2$.

Análisis histopatológicos

De cada intestino extraído se cortó 0.5 cm de tejido y se fijó en paraformaldehído al 1%, posteriormente se procesó para su deshidratación (anexo 6) pasando por alcoholes (etanol) desde el primero al 50%, hasta un alcohol absoluto, terminando en parafina de inclusión, para después realizar los cortes histológicos a 5 µm y las tinciones de Hematoxilina & Eosina (anexo 8) y Hematoxilina-Eosina-azul alcian (anexo 9), que nos sirvieron para examinar el grado de la deformación de criptas presente en las muestras de cada grupo con ayuda del microscopio de luz.

Obtención de células de intestino

Para evaluar el reclutamiento de macrófagos, células dendríticas y linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺, que se lleva a cabo durante el proceso de carcinogénesis, se obtuvieron células intestinales de lámina propia. Después de remover el intestino de los ratones, se lavó y se cortó en piezas de aproximadamente 1.5 cm, estos fueron tratados con soluciones libres de Ca²⁺ y Mg²⁺, y posteriormente

colagenasa, para separar las células epiteliales, aislando sólo las de lámina propia, para su posterior tinción (la técnica detallada se muestra en el anexo 1).

Tinción de células de lámina propia

Después de obtener las células del intestino grueso se ajustaron aproximadamente a 500,000 para cada tinción, se lavaron con buffer de lavado y se resuspendieron en solución FACS para teñir con los anticuerpos correspondientes según las moléculas a analizar, en una concentración de 1 – 0.5 µg por cada 1×10^6 de células. Las muestras se dejaron incubar cubiertas de la luz para permitir el acomplamiento del fluorocromo.

Los anticuerpos (BioLegend) utilizados fueron los siguientes:

Tinción	Fluorocromo	Color
Viabilidad	7AAD	Amarillo
Macrófagos y células dendríticas	Anti CD11b Anti F4/80	PECy7 PE-A
Linfocitos TCD4+	Anti-CD4	PE-A
Linfocitos TCD8+	Anti-CD8	FITC-A

Tabla 4. Anticuerpos para el análisis por citometría de flujo

Posterior a la tinción las células se fijaron en paraformaldehído al 4% recién elaborado, ya que no fueron utilizadas inmediatamente, sino hasta el siguiente día, cuando los tubos fueron leídos en el citómetro FACS Arias y posteriormente los datos se analizaron mediante el programa Flowing Software.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Después de extraer y enjuagar el intestino de cada ejemplar en PBS frío, se cortó un trozo de aproximadamente 1cm, se trituró en mortero con nitrógeno líquido y se almacenó en 500 µL de TRIzol (Invitrogen) a -70°C hasta su uso.

Posteriormente utilizando cloroformo e isopropanol se obtuvo el RNAm (Anexo 3) de cada muestra, se cuantificó y se ajustó la concentración de las muestras a 1000 ng/μl para su posterior conversión en cDNA (anexo 5) con ayuda del kit (Invitrogen RT-PCR) y se utilizó el kit DNAsa I, RNAsa free de Thermo Scientific (anexo 4) para asegurarse de retirar el DNA genómico.

Una vez obtenido el cDNA se ajustaron todas las muestras a una concentración de 1000 ng/μl para comenzar con la técnica de PCR (anexo 6) utilizando el Termociclador (BIOER, XP cycler) basándose en los parámetros térmicos específicos para cada *primer*, se amplificaron los transcritos de los genes, GAPDH, TNF-α, IL-1β, IL-10 e IFN-γ.

Se tomó a GAPDH (Gliceraldehído 3-fostato deshidrogenasa) como control de carga de un gen endógeno de expresión constitutiva. Se corrieron en un gel de Agarosa al 2%, junto con el marcador de peso molecular de la marca *Fermentas* SO-1333, que va desde 100 pb hasta 1 Kb. Posterior a esto las bandas expresadas, productos de los distintos genes se analizaron por densitometría con ayuda del programa Multi Gauge y normalizadas con la expresión de GAPDH para obtener el índice relativo de expresión. Los resultados obtenidos fueron graficados.

RESULTADOS

Síntomas clínicos

La pérdida de peso es un síntoma clínico asociado a alteraciones a nivel intestinal, ya sea por diarrea y/o alteración en la absorción de los alimentos. En la figura 7 se muestra el registro del porcentaje de peso corporal de los ratones experimentales, los ciclos del suministro del dextrán sulfato de sodio (DSS) y el comienzo de la aplicación del inhibidor CPSI-156, a lo largo del experimento (68 días).

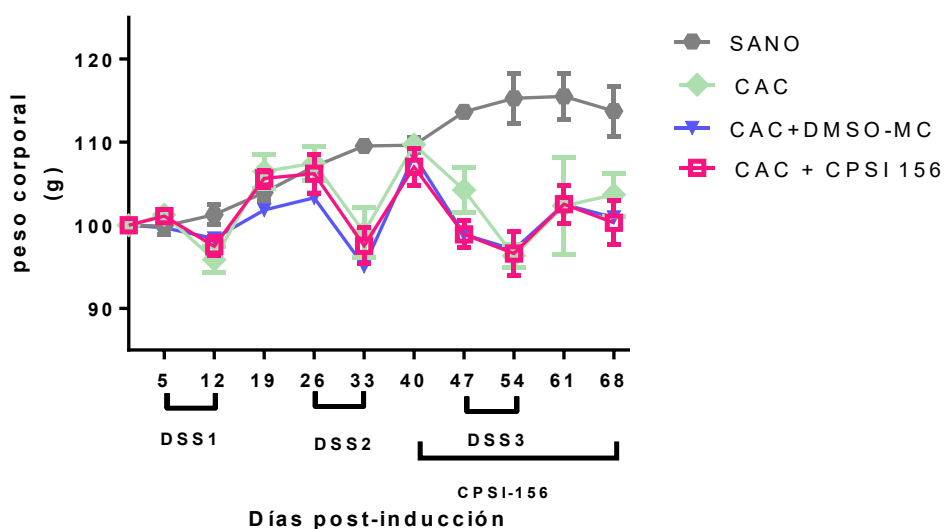


Figura 7. Comparación del porcentaje de peso en los tres grupos. El eje «X» muestra los días transcurridos del tratamiento y el eje «Y» el porcentaje de cambio de peso tomando como 100% el peso del día 0 (antes de cualquier tratamiento).

Como se muestra en la figura 7, se observaron tres bajas de peso que coinciden con los días en que finalizan los ciclos de DSS, aproximadamente en los días 12, 33 y 54 en los grupos CAC, CAC+DMSO-MC y CAC+CPSI-156. Esta pérdida de peso en los ratones con CAC pudo estar relacionada a la presencia del sangrado rectal (figura 8) y diarrea, que conforme pasaba el tiempo se agudizaba. Mientras

que en el grupo control sano el peso se incrementó paulatinamente como resultado del crecimiento normal de los ratones.

Cabe destacar que el sangrado rectal se manifestó en todos los grupos que se indujo cáncer, cómo se observa en la figura 8, pero éste se observó en mayor grado en el grupo CAC+CPSI-156. La presencia de diarrea comenzó alrededor de la semana 4, en el transcurso del segundo ciclo de DSS y estuvo presente en lo que resto del tratamiento, mientras que el sangrado rectal se agudizaba con el paso de los días, sobre todo en las últimas dos semanas de tratamiento.

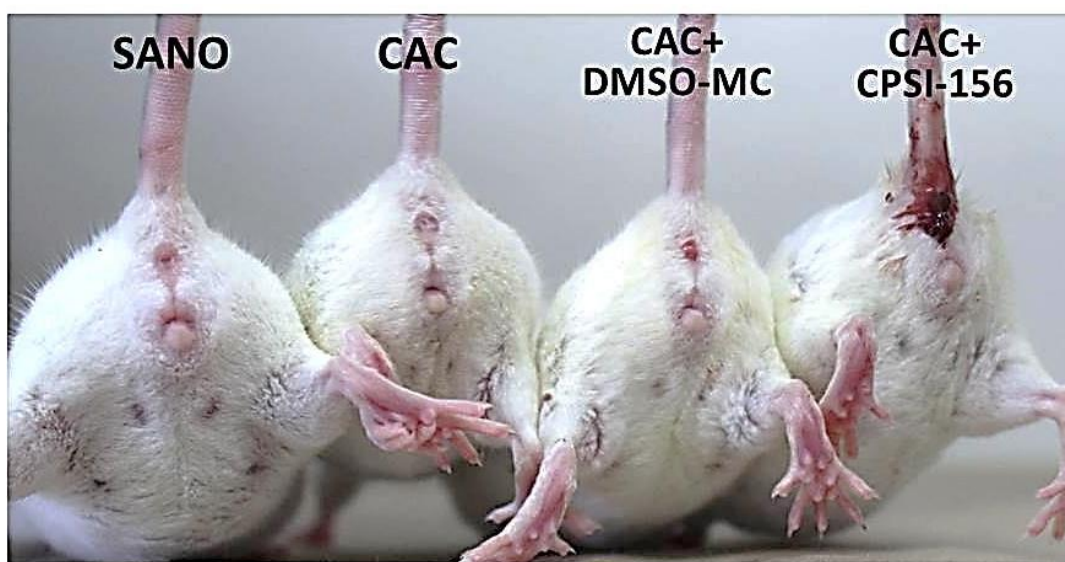


Figura 8. Sangrado rectal. Grupo sano (Sano), CAC (Grupo al que se le indujo cáncer colorectal), CAC+DMSO-Metilcelulosa (ratones con CAC y administración oral del vehículo 40 d.p.i), CAC+CPSI-156 (ratones con CAC y administración oral de inhibidor disuelto en el vehículo 40 d.p.i).

Tamaño longitudinal del colón

Al final del tratamiento, a los 68 días los ratones fueron sacrificados en cámara de CO₂, se removió el intestino grueso de cada ratón y se registraron las medidas de largo y ancho. La longitud del colón osciló entre los 50 y 70 mm, la medida fue tomada antes de retirar el ciego gástrico (Fig. 10).

Como se muestra en la figura 9 A y B, el grupo tratado con el inhibidor (CAC+CPSI-156) presentó acortamiento significativo de los intestinos en comparación con el grupo Sano (*P<0.05), *t*-student independientemente GraphPad Prism 6.

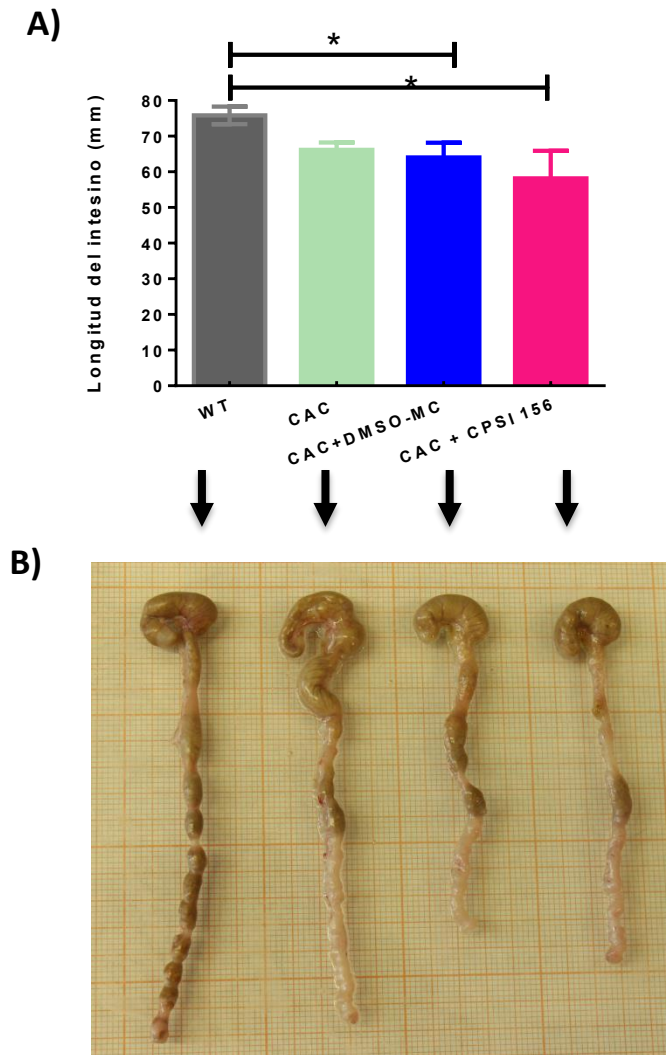


Figura 9. Longitud de los intestinos. A) Fotografía representativa del tamaño de los intestinos. B) Gráfica que muestra la media y error estándar (ES) de las mediciones de los grupos experimentales: Control (Sano), cáncer colorectal (CAC), administrado con vehículo (CAC+DMSO-MC), administrado con inhibidor (CAC+CPSI-156). Resultados de tres experimentos independientes, n=5-7 prueba *t*-student, medias de (*P<0.05).

Número de tumores por colon

Una vez extraídos los intestinos se enjuagaron y abrieron longitudinalmente para realizar el conteo de tumores en cada uno. En la figura 10A se observan los intestinos gruesos abiertos longitudinalmente, se hace visible el crecimiento de tumores. En el lado derecho, figura 10B el total de tumores que presentó cada grupo y en la figura 10C se muestra la carga tumoral.

El grupo CAC+CPSI-156 registró el mayor número de tumores con diferencias estadísticamente significativas comparado al grupo CAC y CAC+DMSO-MC (Fig. 10B). La carga tumoral, referida como la media de las medidas del volumen de todos los tumores que presentó cada ratón, también fue significativamente mayor en comparación con el grupo CAC y el grupo CAC+DMSO-MC (Fig. 10 C)

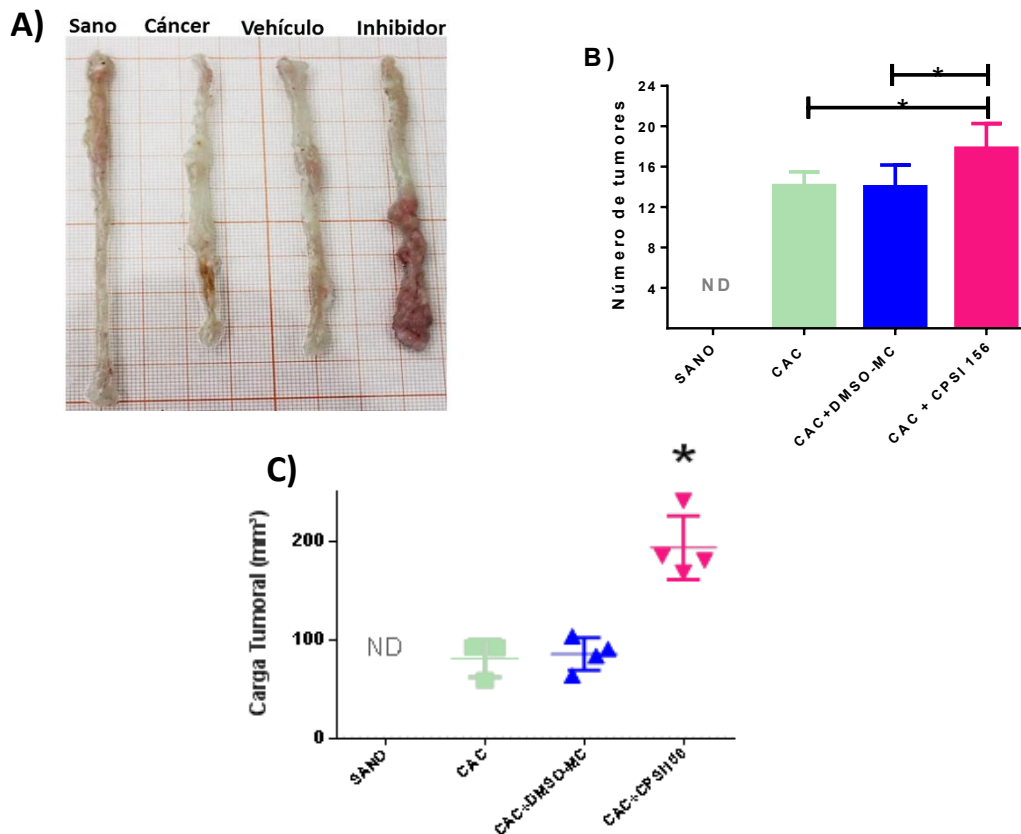


Figura 10. Carga tumoral. A) Imagen representativa del desarrollo tumoral en los grupos experimentales. B) Promedio del número total de tumores C) Volumen en mm³ total de tumores presentes en los intestinos de los grupos inducidos con cáncer. Los resultados corresponden a las medias de dos experimentos independientes n=3-4. *P<0.05, prueba t-student, GraphPad Prism 6.

Tamaño de los tumores desarrollados

También se evaluó el tamaño de los tumores en los tres grupos que se les indujo cáncer. Los tumores de menor tamaño (rango de 0-2 mm) se detectaron en los tres grupos; con un 44.23% el grupo administrado con vehículo (CAC+DMSO-MC), en segundo lugar el grupo tratado con el inhibidor de MIF (CAC+CPSI-156) 30.08% y con un menor porcentaje el grupo de cáncer (CAC) 28.97% (Figura 11 B, C y A, área verde claro; respectivamente).

Los tumores para el rango entre 2.1-4 mm estuvieron presentes en el grupo que recibió inhibidor (CAC+CPSI-156) 59.73%, le siguieron el grupo CAC con 57% y el grupo CAC+DMSO-MC con 50.96% para ese mismo rango (Figura 11 C, A y B, área azul; respectivamente).

Los tumores de rango entre 4.1-6 mm se presentaron en mayor porcentaje en el grupo CAC con 14.01%, seguido del grupo con inhibidor CAC+CPSI-156 con 8.84% y por último el grupo con vehículo CAC+DMSO-MC con 4.80% (Figura 11 A, C y B, área rosa; respectivamente).

Finalmente, los tumores más prominentes con tamaños de entre 6.1-8 mm estuvieron presentes únicamente en los ratones con inhibidor (CAC+CPSI 156) con 1.32 % (Figura 11 C, área violeta). Cabe destacar que, aunque el porcentaje fue mínimo, el resultado es importante si se considera que ninguno de los intestinos analizados de los grupos CAC y CAC+DMSO-MC presentaron tumores con este tamaño.

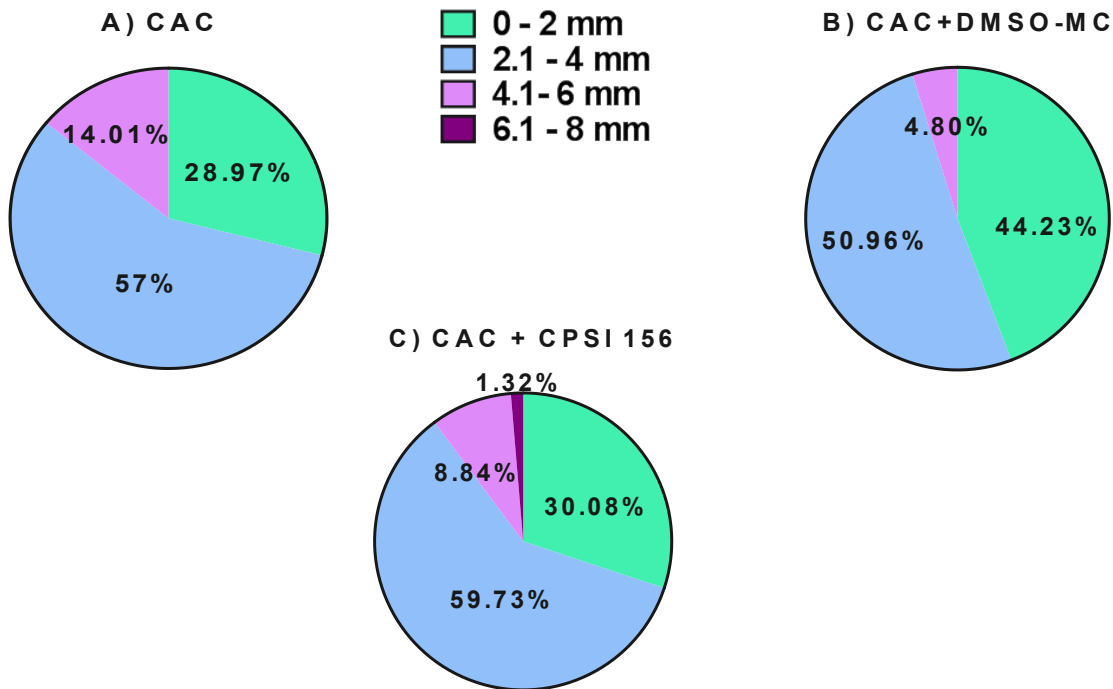


Figura 11. Porcentaje del tamaño de tumores. A) CAC, B) CAC+DMSO-MC, C) CAC+CPSI-156. Promedios de tres experimentos independientes.

Análisis histológico de los tumores

Para conocer el daño celular a nivel morfológico se realizaron cortes histológicos de 5 μm de los intestinos gruesos en la parte media y distal (donde se presentaron los tumores) después de los 68 días, al final del experimento. Se buscó evaluar el daño al epitelio intestinal que se ha asociado a la deformación de criptas, con presencia de infiltrado celular inflamatorio en cada uno de los grupos

experimentales. Para tal caso se utilizó tinción Hematoxilina-Eosina (H&E) y Hematoxilina-Eosina-azul Alcian (H-E&A).

En la figura 12-I se muestra una imagen de un corte histológico representativo de cada grupo experimental. En la primera tinción H&E se muestra la estructura de las criptas epiteliales de un ratón sano: el músculo, las submucosa y el epitelio están íntegros (Fig 12-I, A y B). En el grupo CAC se observó una deformación de criptas característica de neoplasias de bajo grado y un infiltrado inflamatorio adjudicado al proceso de carcinogénesis que se está desarrollando. (Fig. 12-I, C y D). En el grupo CAC-DMSO-MC la deformación de las criptas del intestino permitió detectar atipia citológica en la mayoría de los núcleos, e incluso se aprecia perfectamente un tumor de tipo veloso por la forma de crecimiento de las células en la base del tumor. (Fig 12-I E y F). El grupo administrado con el inhibidor desarrollo neoplasias de alto grado que se definen por la deformación total de las células y la pérdida de polarización de los núcleos (Fig 12-I G y H).

En la figura 12-II se puede apreciar una tinción con H-E&A representativa de los cortes histológicos de cada uno de los grupos experimentales. El azul alcian se agregó para teñir la mucina presente en las mucosas del intestino grueso, gracias a ésta tinción se puede observar con mayor precisión la deformación epitelial asociada a la pérdida de mucina. El grupo sano no presentó mucosa con pérdida de mucina en las células epiteliales y por tanto el crecimiento y acomodo no tienen alteración (Fig 12-II A y B); los intestinos del grupo CAC (Fig 12-II C y D) y del grupo CAC+DMSO-MC (Fig 12-II E y F) mostraron crecimientos tumorales en los cuales algunas células de la base aún presentan producción de mucina (color azul), pero conforme las células se alejan de la base van dejando de mostrar esta característica. En el caso del grupo administrado con el inhibidor en las células tumorales de la neoplasia que se observó presentan muy baja o nula producción de mucina (color azul), y, por tanto, cómo ya se describió en la tinción H&E las células presentan un crecimiento totalmente anormal y desproporcionado, deformando así el acomodo de las criptas.

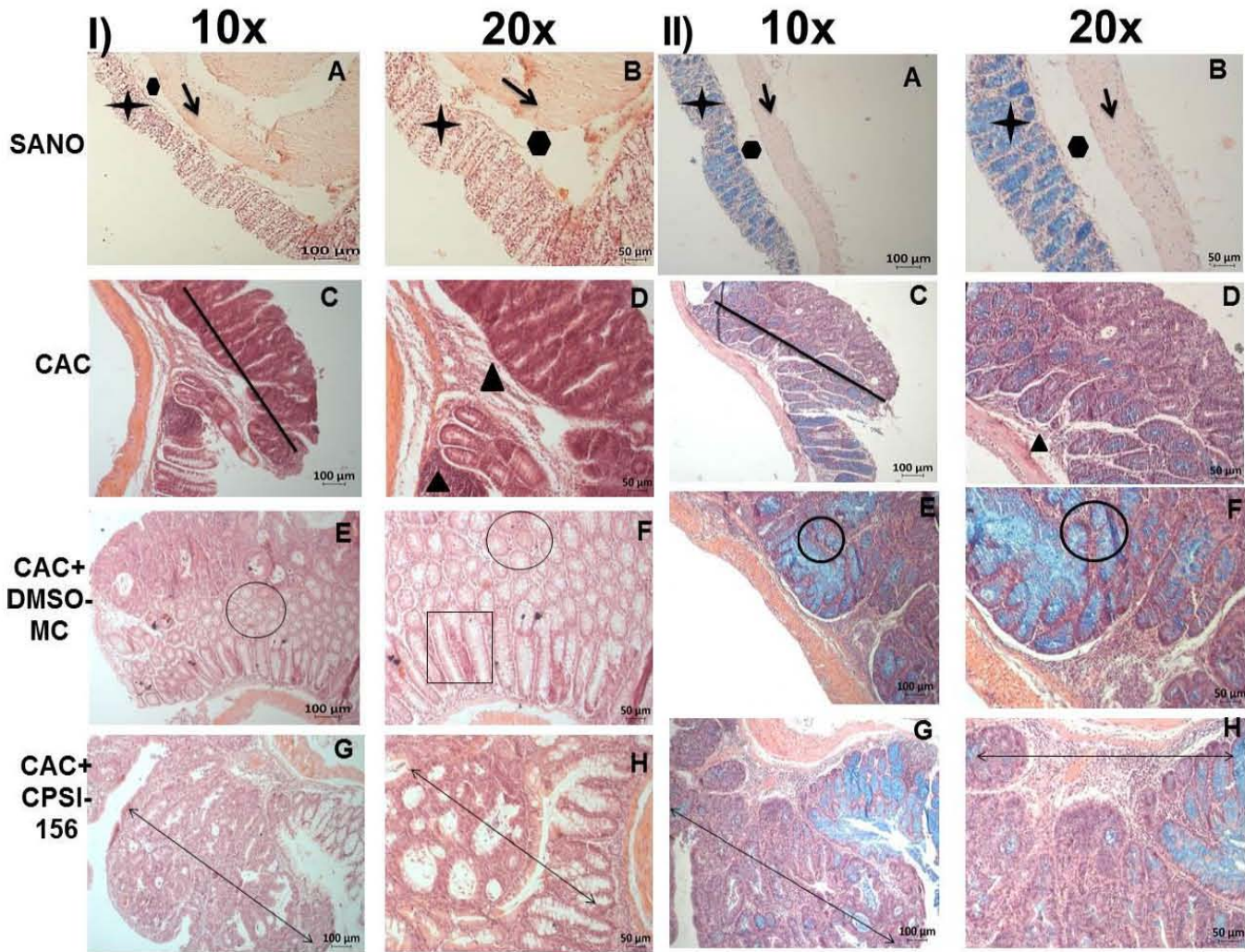


Figura 12. Cortes histológicos de 5 μ m, vistos a 10x y 20x. Para el caso de las dos tinciones. En el grupo Sano se observa una morfología del colon sin alteraciones: músculo \downarrow , submucosa \bullet y epitelio \blackstar (A, B). I) **Tinción hematoxilina-eosina (H-E).** El grupo CAC muestra una displasia de bajo grado — en donde también hay poca deformidad de criptas (C y D), pero ya se registra alto grado de infiltrado inflamatorio \blacktriangle (D). El grupo CAC+DMSO-MC presenta núcleos con atipia citológica \circ que comienzan a formar los primeros focos de criptas aberrantes (E y F), este crecimiento de las células \square es clásico de un crecimiento tumoral de tipo vellosa (F). El grupo del inhibidor (CAC+CPSI-156) muestra neoplasias de alto grado (G y H), con deformación total de las criptas. \longleftrightarrow II) **Tinción hematoxilina-eosina-azul alcian (H-E&A).** El grupo sano no muestra deficiencias o alteraciones en las células productoras de mucina (fig. A y B, color azul). En los grupo CAC (C y D) y CAC+DMSO-MC (E y F) sólo algunas células de la base aún presentan producción de mucina (color azul). En el grupo CPSI-156 las células tumorales de la neoplasia presentan pérdida importante de mucina en las células.

Caracterización del infiltrado celular por Citometría de Flujo

MIF tiene propiedades de quimiocina, particularmente recluta células inmunes como monocitos y células dendríticas con capacidad de presentar antígeno. Estas células reclutadas por MIF promueven una respuesta Th1- inflamatoria capaz de contener el crecimiento de las células malignas (67). Para tratar de explicar por qué la inhibición de MIF favoreció el crecimiento de los tumores colorectales es que se evaluó el reclutamiento de células inmunes en los distintos grupos experimentales mediante citometría de flujo. Los eventos totales contabilizados para cada tinción fue de 100 000 eventos (100%).

Se extrajeron las células de la lámina propia y se hizo una tinción con el marcador de viabilidad 7AAD que nos ayudó a diferenciar las células vivas de células muertas, y de ahí partimos para analizar los demás tipos celulares analizados (Fig. 13 A).

A continuación, se muestra una comparación en grafica de puntos (dot plots) representativo para cada grupo, para macrófagos infiltrados (F4/80) y células dendríticas (Cd11b) (Fig. 13 B). Las gráficas muestran los porcentajes de eventos, promedio de dos experimentos independientes.

La figura 13C es el grafico representativo para el porcentaje de eventos registrados para macrófagos, puede apreciarse una variación muy notable, mientras que por un lado el grupo sano muestra un porcentaje de reclutamiento muy bajo, en el grupo administrado con el vehículo (CAC+DMSO-MC) el porcentaje se dispara superando los porcentajes de los grupos CAC y CAC+CPSI-156, estos grupos presentaron un porcentaje de reclutamiento similar que no muestra diferencias estadísticamente significativas.

La figura 13 D representa el porcentaje de eventos registrados para células dendríticas, el grupo sano muestra la barra con mayor porcentaje, en segundo lugar el grupo CAC+DMSO-MC, seguido del grupo CAC, y con el menor porcentaje de células dendríticas el grupo tratado con el inhibidor de MIF (CPSI-156).

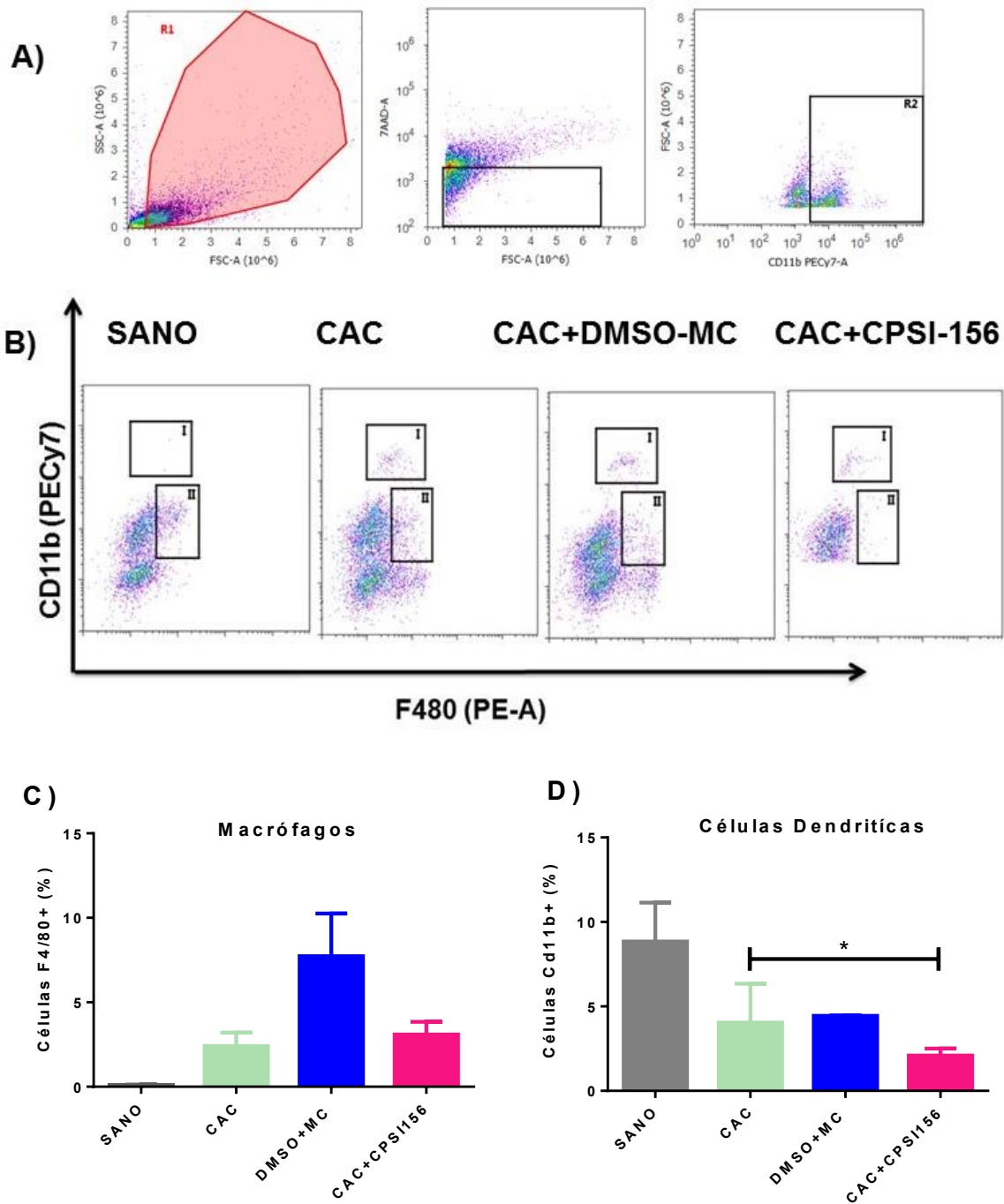


Figura 13. Macrófagos y células dendríticas infiltradas. A) En el primer dot plot, la R1 muestra la región de las células seleccionadas para trabajar. En el segundo dot plot se observa el cuadrante seleccionado para las células vivas y en el tercer dot plot la R2 está señalando las células positivas para CD11b. B) A partir de esta última región, en cada grupo se evaluó CD11b+ contra F4/80+, la región I corresponde a los macrófagos y la región II a células dendríticas. Las gráficas son representativas del porcentaje de eventos por grupo C) macrófagos y D) células dendríticas.

Para determinar la proporción de células linfoides TC4+ y TCD8+ infiltradas en los tumores se siguió la misma estrategia experimental. Se extrajeron las células de la lámina propia y se hizo una tinción con el marcador de viabilidad 7AAD que nos ayudó a diferenciar las células vivas de células muertas (Células 7AAD negativa son las células vivas). De las células vivas se seleccionó la población CD3+ y de ésta población se partió para analizar las subpoblaciones CD4+ y CD8+ (Fig. 14 A).

A continuación, se muestra una comparación en grafica de puntos (dot plots) representativo para cada grupo, para TCD8+ (Fig. 14 C) y TCD4+ (Fig. 14 D). Las gráficas muestran los porcentajes de eventos, promedio de dos experimentos independientes.

LA figura 14 C es el gráfico para TCD8+; a barra con mayor porcentaje de eventos corresponde al grupo CAC (verde), enseguida la barra del grupo sano (gris) y muy similar a esta, la barra del grupo CAC+CPSI-156 (rosa), dejando con el menor porcentaje de eventos al grupo CAC+DMSO-MC (azul).

La figura 14 D muestra los porcentajes de eventos para células TCD4+; en este caso, también, el mayor porcentaje de eventos se registró en el grupo CAC (barra verde), seguido de la barra azul correspondiente al grupo CAC+DMSO-MC, enseguida el grupo CAC+CPSI-156 (barra rosa) y con el menor porcentaje de eventos presentes para el grupo sano.

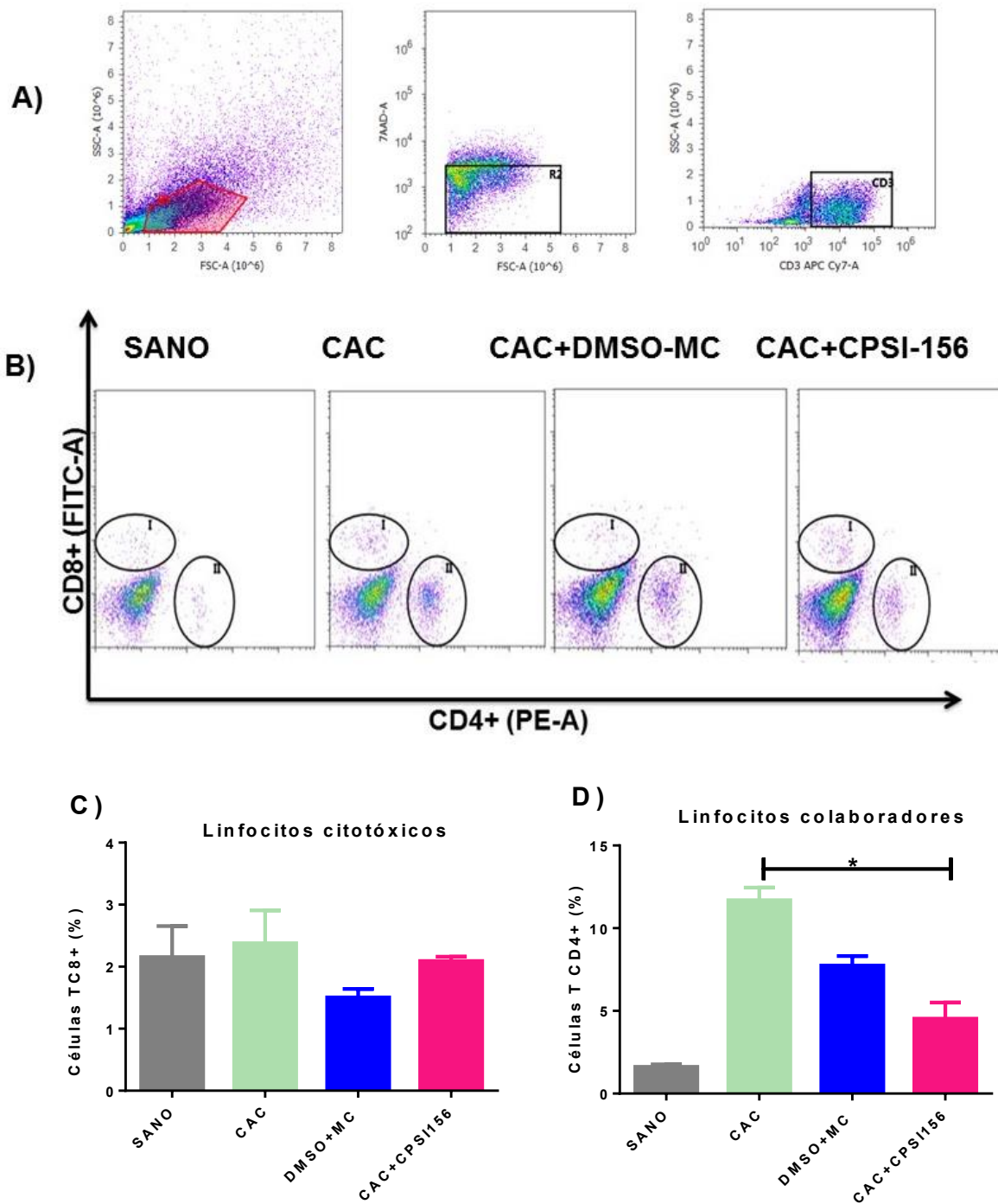


Figura 14. Linfocitos TCD4+ y TCD8+. A) En el primer dot plot, la R1 muestra la región de las células seleccionadas para trabajar. En el segundo dot plot se observa el cuadrante seleccionado para las células vivas y en el tercer dot plot la R2 está señalando las células positivas para CD3+ (Linfocito). B) A partir de esta última región, en cada grupo se evaluó CD8+ contra CD4+, la región I corresponde a los Linfocitos TCD8+ y la región II a Linfocitos TCD4+. C) Gráfica representativa del porcentaje de células TCD8+ y D) gráfica representativa del porcentaje de células TCD4+. n=3 de un experimento.

Determinación de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias por RT-PCR

Finalmente se evaluaron, por RT-PCR, los transcritos de algunas citocinas importantes en el proceso inflamatorio, como TNF- α , IL1 β , IFN- γ ; y como citocina reguladora anti-inflamatoria, la IL-10 (Fig. 15).

A continuación se muestra el gel con las bandas expresadas para cada citocina, estas se evaluaron mediante densitometría, comparando la expresión de cada banda con el gen constitutivo utilizado para los tres grupos: GAPDH.

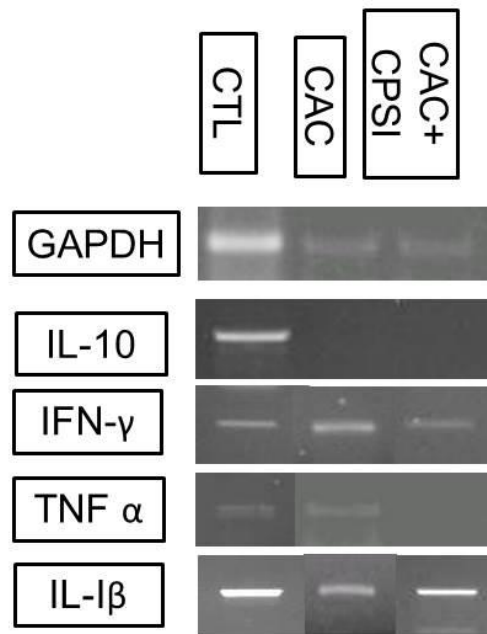


Figura 15. Transcritos de genes de citocinas. Gel de agarosa al 2% que muestra la expresión de las bandas para cada citocina evaluada, n= 3-4.

Como se muestra en la figura 16 A, el transcrito para TNF- α se observó sobre expresado en el grupo CAC respecto al grupo Sano. Es de destacar que no se expresó en el grupo tratado con el inhibidor (CAC+CPSI-156).

El transcrito para IL-1 β si se encontró en los tres grupos, pero la expresión en el grupo CAC fue basal, similar al grupo Sano. El grupo tratado con el inhibidor (CAC+CPSI-156) presentó sobre expresión de transcrito de IL-1 β comparado con el grupo Sano y CAC (Fig. 16 B).

El transcrito para el IFN- γ se observó sobre-expresado en el grupo CAC comparado con el grupo Sano. En el grupo con inhibidor (CAC+CPSI-156) no se observó una sobreexpresión estadísticamente significativa respecto al grupo Sano (Fig. 16 C).

El transcrito de la citocina anti-inflamatoria IL-10 fue detectado en el grupo Sano pero la expresión de éste se perdió en los grupos de ratones inducidos con cáncer (CAC y CAC+CPSI-156) (Fig. 16 D).

A pesar de las diferencias descritas en la parte superior en ninguno de los casos fueron estadísticamente significativas cuando se aplicó la prueba *t*-student para comparar individualmente el grupo CAC contra el grupo CAC+CPSI-156. Probablemente a que la n utilizada fue muy pequeña (n=2), por lo que será necesario ampliar el tamaño de muestra para poder hacer conclusiones verdaderas.

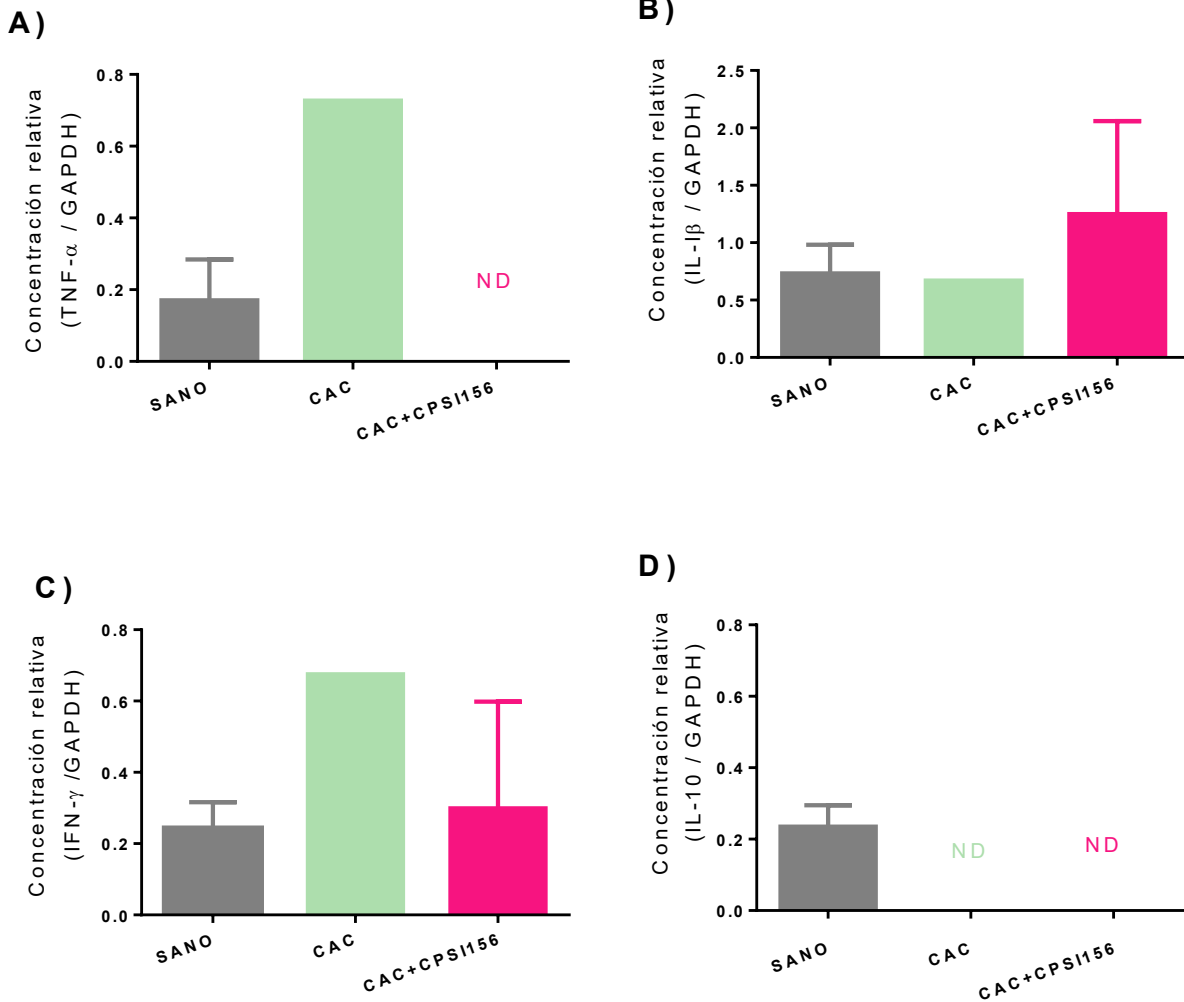


Figura 16. Expresión del RNAm de citocinas, en relación a GAPDH. Las barras representan la relación de la concentración de los transcritos para las citocina pro-inflamatorias; A) TNF- α , B) IL-1 β , C) IFN- γ y el transcrito para la citocina anti-inflamatorias D) IL-10; comparadas con la concentración del gen constitutivo GAPDH. Promedio de muestras de dos experimentos independientes (*=P<0.05).

DISCUSIÓN

Los diversos esfuerzos por describir y analizar la participación de MIF en distintos tipos de cáncer han mostrado resultados contradictorios. En el caso del cáncer colorectal asociado a colitis (CAC), algunos reportes han relacionado la sobreexpresión de MIF con un mal pronóstico (53) (47). Mientras que en otros casos se ha sugerido que la presencia de MIF es benéfica para controlar la proliferación de células cancerígenas (38).

Hay que destacar que en estos estudios los modelos experimentales están basados en la implantación de células cancerígenas o son trabajos con modelos desarrollados *in vitro*, que en cualquiera de los casos utilizan líneas celulares del cáncer a estudiar. Así, tenemos que el ambiente que se propicia en el cultivo celular, o por la implantación de células de línea celular cancerígena en un modelo animal puede generar características y condiciones diferentes, que pueden llevar a resultados contradictorios. Sobre todo cuando en el modelo experimental no se contemplan todos los factores involucrados en el desarrollo o control del cáncer, como sería la respuesta inmune del organismo.

En este sentido, el cáncer estudiado *in vitro* o generado por implantación de línea celular está en desventaja con aquel cáncer que se induce de *novo* en modelos animales para estudiar la participación de una molécula en particular, bajo las condiciones más reales posibles de un cáncer con todos los factores inmunes o no inmunes involucrados en su desarrollo.

El modelo murino utilizado para este proyecto consiste en la inducción de cáncer de colon con una inyección de azoximetano y una simulación de colitis ulcerativa. Una vez asimilado el azoximetano, es metabolizado en el hígado por el citocromo P450 que transforma el grupo metil del azoximetano en metilazoximetanol (MAM). Este produce especies alquilantes que vía bilis viajan al intestino; ahí la alquilación del DNA en células madre provoca que la guanina se convierta en 06-Metilguanina o 04-Metilguanina, éstas causan mutaciones directas a genes que están

implicados en algunas vías de señalización cómo es el caso de β -catenina y APC que en humanos son los responsables del cáncer colorectal (66).

Por otra parte, la colitis ulcerativa es uno de los principales factores de riesgo para padecer CAC; se caracteriza por la inflamación crónica del tracto gastrointestinal (68), alterando principalmente la secreción de la mucosa del colón (69). En nuestro modelo, aunado al daño químico generado por el azoximetano, la colitis inducida con tres periodos de DSS vía oral, genera ciclos recurrentes de inflamación intestinal. Estos ciclos de inflamación aumentan la probabilidad de una transformación eventual de las células epiteliales en células cancerígenas resultando un modelo de CAC semejante al que se desarrolla en humanos (70).

Los principales síntomas clínicos de pacientes con CAC incluyen una considerable baja de peso y la presencia de diarrea, acompañada de un sangrado rectal (71), (72). El modelo presenta las mismas características, pasado el primer ciclo de DSS empiezan a aparecer estos primeros síntomas y se agudizan en el segundo y tercer ciclo.

Por las razones descritas arriba, creemos que el modelo murino de CAC inducido con azoximetano-DSS es el mejor modelo para estudiar la participación de MIF en el desarrollo y patología del CAC, ya que se asemeja al CAC humano. Y no deja fuera ninguno de los factores biológicos involucrados en la génesis y desarrollo del CAC.

En esta tesis abordamos el estudio de la participación de MIF en el CAC utilizando ratones BALB/c que se les indujo CAC con azoximetano-DSS, a un grupo se le administró, vía oral, inhibidor sintético de MIF CPSI-156 (CAC+CPSI-16); un grupo con cáncer que no recibió el inhibidor (CAC), un grupo con cáncer recibió vehículo (CAC+DMSO-MC) y ratones sanos (S), estos tres últimos grupos se utilizaron como controles.

Como se mostró en los resultados, el grupo de ratones con CAC+CPSI-156 fue el grupo que presentó síntomas clínicos más severos, característicos de esta enfermedad, como pérdida de peso, diarrea y sangrado rectal comparados con los

grupos controles CAC y CAC+DMSO-MC que presentaron síntomas clínicos menores. Estas observaciones estuvieron de acuerdo con el tamaño de los intestinos del grupo CAC+CPSI-156, que fueron considerablemente más cortos asociado a un número mayor de tumores y más grandes (6.1-8 mm) comparados con los grupos CAC y CAC+DMSO-MC.

El análisis histológico de los tumores del grupo que recibió el inhibidor (CAC+CPSI-156) demostró que las criptas del intestino grueso estaban alteradas y totalmente modificadas con formación de tumores más desarrollados, es decir, neoplasias de alto grado. Mientras que el grupo CAC y CAC+DMSO-MC presentaron displasia de bajo grado y medio, respectivamente, con formación media de focos de criptas aberrantes y distintos crecimientos de pólipos.

Según la evaluación mediante la escala Dukes (73), los tumores del grupo del inhibidor podrían encontrarse entre el estadio B1, donde el cáncer se encuentra en parte de la pared del recto y del colon pero no lo traspasa o el estadio B2, donde el tumor se extiende en toda la pared del colon y del recto pero no invade los ganglios linfáticos. Mientras que el grupo CAC+DMSO-MC podría estar en la escala B1 y el grupo CAC podríamos ubicarlo en la etapa A porque solo presenta neoplasias de bajo grado (38) (74). Así tendríamos que los de peor pronóstico y mayor malignidad serían los tumores desarrollados en los ratones tratados con CPSI-156, esto debido a que un 90% de pacientes humanos con cáncer gástrico en etapa A, puede sobrevivir más de 5 años, contrario a que un 70% de los pacientes en etapa B no rebasan los 5 años de sobrevivencia (75), comparado con los ratones significaría que los ratones tendrían no los 5 años que se considera para humanos, sino mucho menos esperanza de vida.

El inhibidor sintético de MIF, CPSI-156 actúa impidiendo la unión de MIF con su receptor CD74, deteniendo así sus actividades biológicas como reclutador de células y citocina proinflamatoria (76). Por lo tanto un cuestionamiento de este trabajo surge porque en este grupo se esperaría que al inhibir MIF la inflamación disminuyera y, por lo tanto la progresión tumoral también (si consideramos la inflamación como un detonante del cáncer).

Conroy y col. en 2010 (77) describen que MIF actúa como promotor directo de la tumorigénesis, inhibiendo el gen *p53*, que es el encargado de mediar la apoptosis y detener el ciclo celular para reparar los daños del DNA, por lo tanto la inhibición de *p53* interfiere con la estabilidad genómica y permite la supervivencia y proliferación celular. Nuestros resultados no van de acuerdo con esta observación ya que la inhibición de MIF impactó en el desarrollo exacerbado de la enfermedad, por tanto podríamos explicarlo en el contexto de que MIF tiene la propiedad de quimiocina, es decir es un importante reclutador de células. Las quimiocinas son un grupo de pequeñas moléculas protéicas (8-14 KDa) con características bioquímicas comunes y funcionan como quimioatrayentes para leucocitos, reclutando monocitos, neutrófilos y otras células efectoras del sistema inmune a los sitios de infección e inflamación (29). Recientemente se ha descrito que MIF favorece el reclutamiento de leucocitos en el desarrollo de la aterosclerosis (67) y juega un papel crucial en el reclutamiento de monocitos en el tejido adiposo en la obesidad (78).

En este mismo contexto, es bien sabido que en la respuesta inflamatoria los neutrófilos son las primeras células en ser reclutadas, seguidas de los monocitos que se diferencian en macrófagos, acompañados de células dendríticas y linfocitos. Una vez reclutadas y activadas en el sitio del daño, estas células son la principal fuente de factores de crecimiento, citocinas e interleucinas (31). Debido a que MIF es una quimiocina, y el reclutamiento celular puede influir en desarrollo del cáncer se buscó caracterizar el infiltrado celular en el tejido tumoral de los grupos experimentales.

El análisis del infiltrado celular mostró que el reclutamiento de macrófagos (F4/80+) y linfocitos citotóxicos (TCD8+) en el grupo CAC+CPSI-156 fue similar al reclutamiento del grupo con CAC, no hubo diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, el porcentaje de células dendríticas y linfocitos colaboradores (TCD4+) fue significativamente menor en el grupo CAC+CPSI-156 comparado con los grupos CAC y CAC+DMSO-MC. Estos resultados son parecidos a los obtenidos por Choi, *et al.*, 2015, en otro modelo murino de cáncer

de colon (62). Ellos reportaron niveles disminuidos de células TCD4+ y células TCD8+ en ratones *Mif*^{-/-}, en comparación con ratones *Mif*^{+/+}, pero contrario a nuestros resultados ellos observaron disminuido el número de tumores en los ratones *Mif*^{-/-}. Cabe destacar que en ese modelo de cáncer de colon, los tumores fueron inducidos con células de la línea celular CT26 de cáncer de colon, y fueron ratones genéticamente deficientes de MIF (*Mif*^{-/-}), diferencias que pudieron influir para obtener un resultado, en cuanto al desarrollo de tumores, diferente al nuestro.

Entonces, nuestros resultados indican que la inhibición de MIF influyó en el reclutamiento de células dendríticas y linfocitos TCD4+ que se vieron disminuidos en la patología. Para averiguar si esta disminución celular afectó el microambiente de citocinas se determinaron por RT-PCR los transcritos de las citocinas inflamatorias IFN- γ , IL-1 β y TNF- α , y de la citocina anti-inflamatoria reguladora IL-10. El grupo CAC+CPSI-156 no mostró expresión del transcrito de TNF- α y tuvo niveles disminuidos de IFN- γ . Este resultado está de acuerdo con el hecho de que MIF es un promotor de la expresión de algunas citocinas pro-inflamatorias, así la inhibición de MIF, inhibió la producción de IFN- γ y TNF- α . Fue de llamar la atención que la citocina anti-inflamatoria IL-10 estuviera también ausente en el grupo CAC+CPSI-156 esto porque se esperaría que al disminuir las citocinas inflamatorias IFN- γ y TNF- α estuviera presente la anti-inflamatoria IL-10. Este hecho podría hacer pensar que el inhibidor tuvo efecto inhibitorio a todos los niveles, sin embargo esta posibilidad se descartó debido a que el grupo CAC+CPSI-156 tuvo sobre expresión del transcrito para la IL-1 β , por encima de los grupos: Sano y CAC.

Las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IFN- γ estimulan la fase aguda de la reacción inflamatoria aunque cuando están presentes de manera continua y exacerbada son los principales mediadores de las enfermedades de inflamación crónica (79). Además, TNF- α media la adherencia de los leucocitos al endotelio vascular, así restringe y dirige los leucocitos en áreas específicas a reparar (31). Por otro lado, IL-1 β es una citocina pro-inflamatoria producida principalmente por macrófagos activados, en cáncer se ha reportado que participa de manera activa

para inducir y mantener la señalización y el crecimiento de las células tumorales vía canónica Wnt, a través de la inactivación de GSK3 (80) (81).

En el grupo CAC+CPSI-156, en el que el número y tamaño de tumores fue mayor comparado con los otros grupos con cáncer, el transcrito para TNF- α estuvo disminuido, si consideramos las propiedades de atraer leucocitos atribuidas a TNF- α , la reducción de la expresión del mismo explica la reducción en el porcentaje de células TCD4+ y CD observada en el grupo CAC+CPSI-156. Mientras que el transcrito de IL-1 β estuvo aumentado en el mismo grupo, esto podría estar relacionado con el mayor número de tumores desarrollados en este grupo.

La IL-10 es una citocina reguladora producida por las células Th2, células B, células tumorales y macrófagos, y es un potente inhibidor de las citocinas pro-inflamatorias, incluyendo IL-1 β . En este sentido, el incremento en el transcrito de IL-1 β observado en el grupo CAC+CPSI-156 pudo estar influenciado por la ausencia de IL-10, ya que no se observó expresión del transcrito, por lo menos de manera local en tejido tumoral. Algo parecido se ha observado en ratones IL-10-/- inducidos con enterocolitis, donde la enfermedad se mantiene perpetua por la producción incontrolada de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , e IL-6, ante la ausencia de IL-10 (80).

Tenemos entonces que, la respuesta inflamatoria requiere del reclutamiento de diversos tipos celulares capaces de desencadenar el proceso inflamatorio mediante la producción de citocinas pro-inflamatorias. Por otro lado, estas células reclutadas también participan en la eliminación y reparación de tejidos dañados. Para el caso de cáncer, los macrófagos y CD son las células que se reconocen que contribuyen a detener o por lo menos contener la diseminación del cáncer (82) (75).

Así, la desregulación de cualquiera de los factores que participan en la respuesta dada en este microambiente puede conducir a anomalías y, en definitiva producir o permitir el desarrollo de una patogénesis (31). Entonces con estos resultados y

hasta este momento podemos decir que al inhibir MIF no se da una correcta respuesta del sistema inmunológico.

Cabe destacar que MIF es un elemento indispensable en la respuesta inflamatoria debido a que, una de sus funciones es de citocina pro-inflamatoria que promueve la producción de otras citocinas inflamatorias, como TNF- α IL-1 β e IL-6 (37). Pero otra de sus funciones, igualmente importante es la de quimiocina que ayuda al reclutamiento de macrófagos, linfocitos y CD, mediando así, la respuesta inflamatoria desde distintos frentes (37). En este trabajo al inhibir MIF con el compuesto CPSI-156, en la fase inicial del desarrollo de los tumores (día 40), el reclutamiento de células que infiltran al tumor se vió disminuido, al menos el reclutamiento de los linfocitos T CD4+ y CD. Junto con una disminución importante en la producción de la citocina inflamatoria TNF- α .

La aplicación del inhibidor comenzó en el día 40, tiempo aproximado de la aparición de los primeros tumores para el modelo murino según lo reportado por Neufert *et al.* en 2004 (66) y momento, también, en el que hubo una franca inflamación y el reclutamiento celular se hizo evidente. En este punto, el fenómeno inflamación-infiltrado, favorecido por MIF, parece contribuir a contener el crecimiento tumoral, ya que cuando MIF se inhibió con CPSI-156 los tumores crecieron en mayor número y progresaron a su forma más "maligna". Confirmando, entonces, que el proceso inflamatorio y la presencia de células efectoras resultan benéficas para contener el desarrollo tumoral en una fase inicial.

Aunque MIF ha sido propuesto como un blanco terapéutico en el cáncer de colon asociado a colitis, basado en sus propiedades pro-inflamatorias que favorecerían el cáncer (83) los resultados de este trabajo demuestran que la presencia de MIF en el punto inicial del cáncer es importante para contener el mismo.

Los resultados de este trabajo de tesis son contrarios a los resultados observados cuando se utilizó CPSI-1306 (análogo de CPSI-156) para controlar la progresión tumoral en un modelo murino de cáncer de vejiga. La diferencia con el modelo

presentado aquí es que es otro tipo de cáncer y el inhibidor fue aplicado alrededor de las semanas 16-22, cuando los tumores ya estaban bien establecidos, y observaron que el inhibidor actuó de manera favorable, revirtió la progresión tumoral de alto grado (55). De igual manera, se ha reportado que al inhibir MIF con anticuerpo monoclonales anti-MIF, los tumores de cáncer colorrectal inducidos con la implantación de células CT26 disminuyen alrededor de los días 15-22 después del tratamiento (60). Es justo volver a mencionar que estas características difieren del modelo utilizado en este trabajo, debido a que el cáncer es inducido con líneas celulares, recordemos que el proceso de desarrollo de éste tipo de cáncer es diferente, ya que las células por si mismas ya están transformadas, el desarrollo de la patología en los ratones es más rápido y agresivo, y la inhibición de MIF se hizo en etapas avanzadas del cáncer establecido a partir de las células cancerígenas bien definidas, provenientes de la línea celular, Este tipo de modelo de cáncer de colon, con células implantadas, no permite analizar la participación de MIF en la transformación celular y el desarrollo tumoral desde un principio.

Entonces, en conjunto nuestros resultados sugieren que MIF actúa como molécula que promueve el proceso inflamatorio y el reclutamiento de células; ambos indispensables para contener la transformación celular, o detener el desarrollo de pólipos inflamatorios que tienen el riesgo de convertirse en adenomas y posteriormente en carcinoma establecido.

CONCLUSIONES

- El modelo utilizado en este proyecto es viable para estudiar desde su origen el cáncer de colon asociado a colitis, ya que se asemeja a la patología de un paciente humano.
- La ausencia de MIF impactó en una mayor recurrencia de signos clínicos característicos del cáncer de colón en el grupo tratado con el inhibidor CPSI-156.
- La ausencia de MIF favoreció un mayor acortamiento de los intestinos asociado a un número mayor de tumores.
- La ausencia de MIF provocó tumores más malignos y mayor daño en la morfología de las criptas del intestino grueso de los ratones tratados con el inhibidor.
- MIF juega un papel importante en el desarrollo de la respuesta inmune inflamatoria y el reclutamiento de células inmunes importantes para contener el desarrollo inicial del cáncer esto se comprobó gracias a que el inhibidor de MIF CPSI-156, afectó de forma negativa el reclutamiento de células TCD4+ y células dendríticas en el sitio tumoral, así como la disminución en el transcrito para TNF- α e IL-10 en el sitio tumoral.

Con esto concluimos que MIF, cómo se describió anteriormente, tiene distintas funciones, es decir, dependiendo de la etapa de desarrollo en que se encuentre el cáncer actúa de forma diferente.

PERSPECTIVAS

1. Analizar los niveles de la proteína MIF en todos los grupos experimentales a lo largo del desarrollo del modelo murino de cáncer de colon asociado a colitis por azoximetano.
2. Determinar el porcentaje de apoptosis en el sitio tumoral en todos los grupos experimentales, en etapas tempranas, día 45-48 (5-8 después de la administración del inhibidor) y al final del modelo de cáncer de colon. Con la finalidad de establecer si existe algún efecto apoptótico inducido por el inhibidor.
3. Caracterizar por histología el efecto del inhibidor de MIF, CPSI-156 en la morfología de las criptas en etapas más tempranas día 45-48 (5-8 días después de la administración del inhibidor). Para establecer si el inhibidor impacta en el desarrollo tumoral de forma inmediata.
4. Caracterizar por citometría de flujo el efecto del inhibidor de MIF, CPSI-156 en el infiltrado celular en etapas más tempranas día 45-48 (5-8 después de la administración del inhibidor). Con el fin de establecer si el inhibidor afecta el reclutamiento celular significativamente en este punto.
5. Administrar MIF recombinante en etapas avanzadas del cáncer colorectal para estudiar su efecto en este punto.

Literatura citada

1. WHO. Cancer Fact sheet N°297. 2015 [updated February 2015; cited 2015 November 30]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
2. Society AC. Cáncer colorrectal: Guía detallada 2014.
3. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*. 2011;144(5):646-74.
4. Plus M. Intestino grueso. https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/19220.htm2015 [cited 2016].
5. Ramos-Solano M, Álvarez-Zavala M, García-Castro B, Jave-Suárez L, Aguilar-Lemarroy A. [Wnt signalling pathway and cervical cancer]. *Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2015;53:S218.
6. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology*. 2010;25(2):85-101.
7. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *cell*. 2010;141(7):1117-34.
8. Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current opinion in cell biology*. 2009;21(2):177-84.
9. Cheng N, Chytil A, Shyr Y, Joly A, Moses HL. Transforming growth factor- β signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Molecular Cancer Research*. 2008;6(10):1521-33.
10. Perona R. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clinical and Translational Oncology*. 2006;8(2):77-82.
11. Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer cell*. 2002;2(2):103-12.
12. Burkhart DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews Cancer*. 2008;8(9):671-82.
13. Galluzzi L, Kroemer G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *cell*. 2008;135(7):1161-3.
14. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *cell*. 2008;132(1):27-42.
15. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2007;7(12):961-7.
16. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes & development*. 2007;21(22):2861-73.
17. White E, Karp C, Strohecker AM, Guo Y, Mathew R. Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer. *Current opinion in cell biology*. 2010;22(2):212-7.
18. Baeriswyl V, Christofori G, editors. *The angiogenic switch in carcinogenesis*. Seminars in cancer biology; 2009: Elsevier.
19. Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-oncology*. 2005;7(4):452-64.
20. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(6):789-91.
21. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *cell*. 1996;86(3):353-64.
22. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(6):453-8.
23. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research*. 2010;70(14):5649-69.
24. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *cell*. 2007;128(4):683-92.

25. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*. 2008;7(1):11-20.
26. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *cell*. 2008;134(5):703-7.
27. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071-8.
28. Kastan MB. DNA Damage Responses: Mechanisms and Roles in Human Disease 2007 GHA Clowes Memorial Award Lecture. *Molecular Cancer Research*. 2008;6(4):517-24.
29. Abbas Abul K, H. Lichtman Andrew, and S. Pober Jordan. *Inmunología celular y molecular*. edición a, editor2002. p.p 13 p.
30. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer cell*. 2005;7(3):211-7.
31. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
32. Candido J, Hagemann T. Cancer-related inflammation. *Journal of clinical immunology*. 2013;33(1):79-84.
33. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*. 2004;306(5701):1568-71.
34. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li Z-W, Egan LJ, et al. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *cell*. 2004;118(3):285-96.
35. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*. 2004;431(7007):461-6.
36. IBAÑEZ DJM, CIENTIFICO I. Nuevos marcadores genéticos de predisposición a la enfermedad inflamatoria intestinal. 2008.
37. Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews immunology*. 2003;3(10):791-800.
38. Legendre H, Decaestecker C, Nagy N, Hendlisz A, Schüring M-P, Salmon I, et al. Prognostic values of galectin-3 and the macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human colorectal cancers. *Modern pathology*. 2003;16(5):491-504.
39. Hofmanová J, Straková N, Vaculová AH, Tylichová Z, Šafaříková B, Skender B, et al. Interaction of dietary fatty acids with tumour necrosis factor family cytokines during colon inflammation and cancer. *Mediators of inflammation*. 2014;2014.
40. Kolligs FT, Bommer G, Göke B. Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*. 2002;66(3):131-44.
41. Ramos-Solano M, Álvarez-Zavala M, García-Castro B, Jave-Suárez LF, Aguilar-Lemarroy A. Vía de señalización Wnt y cáncer cervicouterino.
42. Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *cell*. 2006;127(3):469-80.
43. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes & development*. 2000;14(15):1837-51.
44. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*. 2002;3(11):991-8.
45. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.
46. Rosenstein Y, Garcia-Garcia E, Becker I. MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES DE LA RESPUESTA INMUNE ADQUIRIDA.
47. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer research*. 1998;58(16):3491-4.
48. He X-X, Chen K, Yang J, Li X-Y, Gan H-Y, Liu C-Y, et al. Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer. *Molecular Medicine*. 2009;15(1-2):1.

49. Zaidi MR, Merlino G. The two faces of interferon- γ in cancer. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(19):6118-24.
50. Lin W-W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(5):1175-83.
51. CALLEJA QUEVEDO EA. EFECTO DE LA CARENCIA DEL GEN PARA MIF Y DEL TRATAMIENTO CON LOS AINES DICLOFENACO Y NIMESULIDE EN EL HUESO ALVEOLAR 2010.
52. Fingerle-Rowson G, Kaleswarapu DR, Schlender C, Kabgani N, Brocks T, Reinart N, et al. A tautomerase-null macrophage migration-inhibitory factor (MIF) gene knock-in mouse model reveals that protein interactions and not enzymatic activity mediate MIF-dependent growth regulation. *Molecular and cellular biology*. 2009;29(7):1922-32.
53. Kithcart AP, Cox GM, Sielecki T, Short A, Pruitt J, Papenfuss T, et al. A small-molecule inhibitor of macrophage migration inhibitory factor for the treatment of inflammatory disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(11):4459-66. Epub 2010/07/14.
54. Sanchez-Zamora Y, Terrazas LI, Vilches-Flores A, Leal E, Juárez I, Whitacre C, et al. Macrophage migration inhibitory factor is a therapeutic target in treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The FASEB Journal*. 2010;24(7):2583-90.
55. Choudhary S, Hegde P, Pruitt JR, Sielecki TM, Choudhary D, Scarpato K, et al. Macrophage migratory inhibitory factor promotes bladder cancer progression via increasing proliferation and angiogenesis. *Carcinogenesis*. 2013;34(12):2891-9.
56. Meyer-Siegler KL, Iczkowski KA, Leng L, Bucala R, Vera PL. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *The Journal of Immunology*. 2006;177(12):8730-9.
57. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nature medicine*. 2007;13(5):587-96.
58. Bucala R, Donnelly SC. Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer. *Immunity*. 2007;26(3):281-5.
59. Lee H, Rhee H, Kang HJ, Kim H-S, Min BS, Kim NK, et al. Macrophage migration inhibitory factor may be used as an early diagnostic marker in colorectal carcinomas. *American journal of clinical pathology*. 2008;129(5):772-9.
60. Ogawa H, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Takahashi N, Oshima T, et al. An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis. *Cytokine*. 2000;12(4):309-14.
61. Short AE. The Role of MIF Production by B Lymphocytes in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. 2010.
62. Choi S, Kim H-R, Leng L, Kang I, Jorgensen WL, Cho C-S, et al. Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulatory T cell response of tumor-bearing mice. *The Journal of Immunology*. 2012;189(8):3905-13.
63. Ramireddy L, Chen WTL, Peng CT, Hu RM, Ke TW, Chiang HC, et al. Association between genetic polymorphism of the MIF gene and colorectal cancer in Taiwan. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2015;29(4):268-74.
64. Thais Sielecki-Dzurdz VFDLC. Compounds, compositions, processes of making, and methods of use related to inhibiting macrophage migration inhibitory factor 2013 [cited 2016]; Available from: <http://www.google.com/patents/US20130225586>.
65. Junquera P. ISOXAZOLINAS para uso veterinario en perros contra pulgas y garrapatas. 2016 [cited 2016].

66. Neufert C, Becker C, Neurath MF. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nature protocols*. 2007;2(8):1998-2004.
67. van der Vorst EP, Döring Y, Weber C. Chemokines and their receptors in Atherosclerosis. *Journal of molecular medicine*. 2015;93(9):963-71.
68. Bamias G, Nyce MR, Sarah A, Cominelli F. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Annals of internal medicine*. 2005;143(12):895-904.
69. Atreya R, Neurath MF. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2005;28(3):187-95.
70. Triantafillidis JK, Nasioulas G, Kosmidis PA. Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies. *Anticancer research*. 2009;29(7):2727-37.
71. Martínez Cedillo J. Sociedad Mexicana de Oncología, AC. Gamo. 2007;6(3).
72. Mujer PS. Todo sobre Cáncer Colorrectal. 2015.
73. Medicina syb. Cáncer de colon. 2015 [cited 2016]; Available from: <http://www.dmedicina.com/enfermedades/cancer/cancer-de-colon.html>.
74. Arévalo F, Aragón V, Alva J, Perez Narrea M, Cerrillo G, Montes P, et al. Pólipos colorectales: actualización en el diagnóstico. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 2012;32(2):123-33.
75. Funada Y, Noguchi T, Kikuchi R, Takeno S, Uchida Y, Gabbert HE. Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncology reports*. 2003;10(2):309-13.
76. Al-Abed Y, inventor; Isoxazoline compounds having MIF antagonist activity 2011 february 2015.
77. Conroy H, Mawhinney L, Donnelly S. Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF)—the potential missing link. *Qjm*. 2010;103(11):831-6.
78. Kim B-S, Pallua N, Bernhagen J, Bucala R. The macrophage migration inhibitory factor protein superfamily in obesity and wound repair. *Experimental & molecular medicine*. 2015;47(5):e161.
79. Rivera LEC, Cabrera SAM, Ramos AP. Participación de la interleucina 1 β (IL-1 β) en periodontitis. *Revista Odontológica Mexicana*. 2007;11(4):185-200.
80. Klampfer L. Cytokines, inflammation and colon cancer. *Current cancer drug targets*. 2011;11(4):451.
81. Kaler P, Augenlicht L, Klampfer L. Macrophage-derived IL-1 β stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D3. *Oncogene*. 2009;28(44):3892-902.
82. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-61.
83. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*. 2002;23(11):549-55.

ANEXO TÉCNICO

ANEXO 1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS DE LÁMINA PROPIA INTESTINAL

Soluciones:

A) CMF-HBSS: Solución Balanceada de Hank's libre de Ca y Mg (1L)

8 g NaCl	Disolver en 900 ml de H ₂ O
1 g D-glucosa	
0.4 g KCl	
0.06 g KH ₂ PO ₄	
0.35 g NaHCO ₃	
0.112 g NaH ₂ PO ₄ ° 12 H ₂ O	

Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 2M (para subirlo) o con HCl 1M para bajarlo
Aforar a 1L

Esterilizar por filtración si es para cultivo y guardar a 4°C

B) CMF-HBSS+EDTA (60 ml por ratón)

56.55 mL CMF-HBSS + 0.4468 g EDTA + 3ml SFB

C) CMF-HBSS+Colagenasa (20 ml por ratón)

19 ml CMF-HBSS + 0.003 g Colagenasa tipo IV (SIGMA)+ 1ml SFB

Material:

Cámara	Coladores	Organza blanca
Equipo de disección	Frasco de desechos	Sanitas
Tupper con PBS a temp ambiente	Tubos de 50	Vortex
Papel milimétrico	Charola para pesar	
Tubos de 50	Tijeras finas	

Procedimiento:

- Remover intestino, cortar longitudinalmente y medir volumen de los tumores, tomar fotos en vidrio sobre papel milimétrico. Enjuagar agitando el intestino en PBS a temperatura ambiente
- Cortar en piezas de 1.5 cm aprox.
- Poner las piezas en tubos verdes de 50 con 30 ml de HBSS+EDTA tibio
- Incubar en shaker orbital de manera horizontal 250 rpm 20 min a 37°C
- Pasar por un colador y descartar el sobrenadante (epiteliales)
- Recuperar las piezas de intestino en un tubo de 50 con 30 ml de HBSS+EDTA tibio

- Incubar en shaker orbital de manera horizontal 250 rpm 20 min a 37°C
- Pasar por un colador y descartar sobrenadante; secar el exceso de líquido poniendo el colador sobre una sanita
- Poner el intestino en una charola para pesar y picarlo rápidamente con unas tijeras
- Pasar a un tubo de 50 ml que contenga 20 ml de HBSS+Colagenasa tibia
- Incubar en shaker horizontal a 200 rpm 15 min a 37°C
- Vortexear 5 segundos exactos
- Filtrar en organza hacia otro tubo de 50 y aforar a 50 ml con CMF-HBSS
- Centrifugar 5 min a 4°C 2200 rpm de la centrífuga refrigerada grande (425g)
- Descartar el sobrenadante y resuspender en 10 ml de HBSS a 4°C
- Centrifugar 5 min a 4°C 2200 rpm de la centrífuga refrigerada grande (425g)
- Descartar el sobrenadante y resuspender en 10 ml de HBSS a 4°C
- Poner en el hielo. En este punto, si se va a contar se resuspende en 1 ml de HBSS el botón, si no, ya es posible teñir las células para citometría.
- Para retirar el moco puede usarse una incubación después de la de colagenasa pero se dañan mucho las células. También puede utilizarse al final un gradiente de percoll pero se pierden muchas células, y mueren las que quedan.

ANEXO 2. TINCIÓN DE CÉLULAS PARA CITOMETRIA

Una vez obtenidas las células a analizar (en este caso las células de intestino):

- Ajustar las células desde 400, 000,00 a 1×10^6 / mL. utilizando la cámara de Neubauer con azul tripano y poner en tubos eppendorft nuevos.
- Centrifugar 10 minutos a 1500 rpm.
- Lavar las células 2 veces con buffer de lavado cuidando de resuspender el botón antes de agregar el buffer.
- Centrifugar nuevamente y quitar el sobrenadante, poner los anticuerpos correspondientes para la molécula a analizar, a la concentración de 1 – 0.5 μg / 1×10^6 de células en 200 μl de buffer de lavado.
- No olvidar poner isotipos como controles.
- Dejar incubar por 30 minutos a 4° cubiertos de la luz con papel aluminio.
- Centrifugar, lavar con 1 mL. de buffer de lavado 2 veces por 10 minutos a 1500 rpm y resuspender en 500 μl de solución de FACS.
- Leer inmediatamente en el citometro.
- Si no se lee inmediatamente fijar las células con paraformaldehído al 1% (200 μl por vial). El paraformaldehído debe ser de reciente preparación.

BUFFERS

- 1.- Buffer de lavado PBS + 5% de SFB (suero fetal bovino) + 0.05% de ázida de sodio: 500ml PBS – 25ml SFB.

- 2.- El paraformaldehído está en polvo y no se disuelve fácilmente. Calentar primero el PBS y agregar el paraformaldehído en la campana de extracción. Filtrar y enfriar a 4°C.

ANEXO 3. EXTRACCIÓN DE RNA

- Posterior a extraer y enjuagar el intestino grueso se corta un trozo de aproximadamente 1 cm., se macera con ayuda de nitrógeno líquido hasta que esté completamente disgregado.
- El macerado se coloca en un tubo eppendorft con 500µl de trizol y puede almacenarse a -70°C.
- Para comenzar con la extracción del RNA se agregan 100µl de cloroformo grado molecular por cada ml. de trizol agregado y se agita a mano (sin usar vortex).
- Se incuba a temperatura ambiente de 2 a 3 minutos y posteriormente se centrifuga a 14000 rpm, durante 15 min a 4°C.
- Después de centrifugar quedan tres fases: Una superior transparente, una ligera natita blanca y en la parte inferior queda el resto de trizol. Se debe tomarse solamente la parte transparente evitando tocar alguna de las otras dos. Tomar el sobrenadante y se le agregan 500 µl de isopropanol frío por 1ml. de trizol utilizado.
- Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos, y después centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C.
- Tirar el sobrenadante y re suspender, lavar con 500 µl de etanol al 75% frío (esta solución se debe elaborar con agua grado molecular o agua Di-etil pirocarbonato DEPC estéril).
- Centrifugar a 14000 rpm por 5 min a 4°C.
- Secar el botón, a temperatura ambiente colocando el frasco eppendorft boca abajo en una servilleta para que se pueda evaporar o escurrir, esto dentro de la campana de PCR durante 5 a 10 minutos. Una vez seco, re suspenderlo con 20 µl de agua DEPC.

ANEXO 4. DIGESTIÓN CON DNAsa

- Se debe cuantificar el RNA en el epoch para conocer la concentración de ng/µl.
- Tomar una alícuota de 10 µl de RNA de cada tubo eppendorft y colocarlos 10 min a 55°C en el termoblock.
- Ajustar con la lectura del epoch aproximadamente a 1000 ng/µl (Si esta lectura es de más de 2000, es recomendable diluir la muestra, por lo menos a la mitad)
- Después de ajustar, se debe tomar 1000 ng de RNA y utilizando el kit DNAsa I, RNAsa free de Thermo Scientific, agregar 1µl de buffer 10x, 1de DNAsa y aforar a 10µl con agua DEPC.
- Incubar esta mezcla a 37°C, 30 minutos en el termociclador.

- Agregar 1µl de EDTA e incubar 65°C 10 minutos en el termociclador.

Se puede almacenar a -20°C.

ANEXO 5. TÉCNICA PARA OBTENER cDNA

- Se van a utilizar 5µl del RNA digerido con la DNAsa, y se va utilizar también la concentración ajustada a 1000 ng/µl.
- En un tubo de termociclador se coloca 1µl de dNTPs y 1µl de oligodt (del kit Super Script de SIGMA), los µl requeridos de cDNA (según el ajuste a 1000ng) y aforar esto a 10 con agua DEPC.
- Incubar en el termo 65°C por 5 minutos, después poner directamente en el hielo 1 minuto para detener la reacción.
- Preparar por reacción:
 - *2µl de Buffer RT
 - *4µl de Cloruro de magnesio
 - *2 µl DTT
 - *1 µl de RNA out
- Poner 9 µl de la mezcla en cada tubo de termociclador, para completar un volumen de 19, e incubar esto 42°C por 2 minutos en el termociclador.
- Pasado el tiempo agregar 0.5 µl de SSIIRT e incubar durante dos ciclos a 42°C por 50 minutos y 70°C por 15 minutos.
- Agregar 0.5 µl de RNAsa H y poner en el termociclador 15 minutos a 36°C.

ANEXO 6. AMPLIFICACIÓN DEL mRNA por PCR

En tubos de termociclador estériles se preparó la reacción utilizando:

Por reacción se utilizó:

- Buffer Kappa 2 µl
- DNTPs 0.4 µl
- Primer forward 0.4 µl
- Primer reverse 0.4 µl
- Enzima Kappa 0.25 µl
- Agua DEPC estéril 15.55 µl
- cDNA 1 µl

Se amplificaron los siguientes genes:

Gen	Pares de bases (pb)	Secuencia 5´ - 3´	Temperatura
GAPDH	201	F—CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC R- CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC	54°C
IL-10	237	F- ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AG GCA R- CTA TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A	56 °C
IFN-γ		F- AGC GGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG R- GTC ACA GTT TTC AGC CTG TAT AGG G	57 °C
TNF-α	307	F- GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C	59 °C

		R- ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG	
IL-1β	520	F- GAG TGT GGA TCC CAA GCA AT R- CTC AGT GCA GGC TAT GAC CA	59 °C

Los tubos se colocaron en el termociclador (BIOEXP CYCLE) programando de la siguiente manera

- Desnaturalización inicial 1 ciclo de 95°C por 10 minutos
- Desnaturalización 40 ciclos de 94°C por 35 segundos
- Alineación Variable 40 ciclos por 35 segundos
- Extensión 1 ciclo de 72 °C por 36 segundos
- Extensión final 40 ciclos 72 °C por 4 minutos
- Enfriamiento 1 ciclo de 4 °C por 10 minutos

ANEXO 7. INCLUSIÓN DE TEJIDOS Y TREN DE DESHIDRATACIÓN

Una vez obtenido el tejido debe fijarse en paraformaldehído al 4% y no debe permanecer ahí por más de 20 días.

Paraformaldehído amortiguado al 4%

- 4 g de paraformaldehído + 80 ml de PBS
- Calentar hasta 60°C y agregar unas gotas de NaOH 1M acuoso hasta disolver
- Dejar enfriar y ajustar pH a 7.4
- Aforar a 100 ml con PBS.

TREN DE DESHIDRATACIÓN

Se tira el paraformaldehído en el frasco de deshechos correspondiente y en ese mismo tubo se va agregando todas las soluciones siguientes, debe mantenerse en agitación el tiempo que requiere cada una.

- Agua corriente 30 minutos
- Alcohol al 50% 30 minutos
- Alcohol al 60% 20 minutos
- Alcohol al 70% 20 minutos
- Alcohol al 75% 20 minutos
- Alcohol al 80% 20 minutos
- Alcohol al 85% 20 minutos
- Alcohol al 90% 20 minutos
- Alcohol al 96% 20 minutos
- Alcohol al 100% 20 minutos (2 veces)
- Alcohol amílico 20 minutos (2 veces)
- Parafina I 24 horas
- Parafina II 2ª horas
- Incluir en parafina de inclusión

ANEXO 8. TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

- Xilol 2 cambios de 5 minutos
- Alcohol etílico absoluto 5 minutos
- Alcohol al 96% 5 minutos
- Alcohol al 80% 5 minutos
- Alcohol al 70% 5 minutos
- Agua corriente 5 minutos
- Hematoxilina de Harris 5 minutos
- Enjuagar con agua corriente 5 minutos
- Alcohol etílico ácido 70% al 1% HCL 10 segundos
- Enjuagar con agua destilada
- Agua amoniacal 30 segundos
- Enjuagar con agua destilada
- Eosina 3 minutos
- Enjuagar con agua destilada
- Lavar con alcohol 96% por chorreo
- Alcohol absoluto 3 seg-1 minuto
- Xilol 5 minutos
- Montar en resina entellan

ANEXO 9. TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA-AZUL ALCIAN

- Xilol 2 cambios de 5 minutos
- Alcohol etílico absoluto 5 minutos
- Alcohol al 96% 5 minutos
- Alcohol al 80% 5 minutos
- Alcohol al 70% 5 minutos
- Agua corriente 5 minutos
- Ácido acético 1 minuto
- Azul alcian 15 minutos
- Enjuar con agua
- Hematoxilina 4 minutos
- Enjuagar con agua corriente
- Ácido clorhídrico 0.25% 2-3 segundos
- Enjuagar con agua corriente
- Agua amoniacal 0.25% 2-3 segundos
- Enjuagar con agua corriente
- Alcohol al 70% 1minuto
- Eosina 1 minuto
- Alcohol al 95% 30-60 segundos
- Alcohol al 100% (dos veces) 30 segundos
- Xilol 5 minutos
- Montar en resina entellan