



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

**ESTUDIO DE LA PARTICIPACION DE MIF EN EL DESARROLLO DE LA
MICROBIOTA INTESTINAL DURANTE LA GENESIS DEL CCR MURINO**

T E S I S

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

P r e s e n t a:

Octavio Hernández Rosas

Directora de tesis:

Dra. Miriam Rodríguez Sosa





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.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi mamá Rocío y a mi papá Javier, por ser ambos los pilares que me sostuvieron en todo sentido hasta el día de hoy, yo soy lo que soy gracias a ustedes y no podría encontrar palabras para describir cuan agradecido estoy de tenerlos conmigo. Solo Dios sabe cuánto los amo y cuan especiales son para mí y de cómo estoy lidiando en encontrar palabras para escribir esto y no caer en las lágrimas, simplemente los amo con todo mi corazón con todo lo que este puede dar, estoy eternamente agradecido por ello.

Mi hermana Nahui la cual no se en que momento llegó convertirse en la mujer que más amo en este mundo. En las relaciones entre hermanos siempre hay peleas y conflictos, cosa que en nosotros no fue una excepción, pero desde el primer momento en que nos alejamos uno del otro me di cuenta lo mucho que te quería y cuanta falta me hacías. Hoy por hoy el tenerte me hace muy feliz, eres mi confidente y mi aliada en todo esto, soy extremadamente feliz de que seas mi hermana.

Quiero dedicar este trabajo a toda mi familia, los momentos, el apoyo, el cariño, el afecto que he recibido por parte de ustedes durante tanto tiempo. A mis abuelitos que los amo tanto, a mis tíos a mis primos y sobrinos, a quienes no especifico porque son muchos, pero que saben cómo soy, que me conocen y saben cuánto significan para mí, con quienes sé que puedo confiar y con quienes sé que puedo recurrir en los momentos buenos y malos. Gracias por siempre hacerme sentir parte de hogar. Me hace muy feliz tener una familia tan grande, en donde sé que con cualquiera puedo apoyarme en cualquier cosa sin importar que se trate. Infinitas gracias.

Tengo que admitir que a lo largo de toda mi vida he hecho muchos y muy buenos amigos, con quienes tal vez al día de hoy no tengo mantengo tanto contacto como antes, pero que definitivamente han sido relevantes a lo largo de mi vida. Gracias a todos ellos que me han hecho reír y alegrarme y volverme quien soy. A Beto, Sergio y Jesús por mantenerse conmigo y seguir ahí a pesar de tantos años. Miguel, César, Rubén, Geovanny, con quien he encontrado una amistad fuerte desde la infancia. A todos ellos con quien compartí mi tiempo y mis risas gracias por estar allí.

Mis amigos que forme durante esta etapa, que son los que más me han enseñado. Mencionarlos a todos sería mencionar a todos los de Biología, pero gracias por viajar conmigo, por festejar, por dejarme conocerlos, porque siempre los tendré conmigo. Alexis, Armando, Emmanuel, Karen, Cristina, Jaz, Fonny, Sasa, Beto, Omar, Frida, Sopas, Walter y a mis roomies con quienes pase y comparto tanto. Todos ustedes y todos los que me llegaron a conocer, definitivamente no sería yo sin mis amigos.

Durante los primeros años de la carrera no estaba completamente seguro a que rama de la carrera me orientaría más, decidí meterme al laboratorio 5 de la UBIMED y desde entonces me di cuenta el área que más me apasionaba, la que más me hacía feliz. Debo agradecerles a todos por lo bien que me sentí aquí, a la Dra.

Miriam, a Thali a quien esta tesis debería tener su foto como portada, a Yuriko, a la Dra. Martita bebé la mejor sposi del mundo, a la Dra. Diana Alexia, Ime, Oscar, Danae, Tona, Víctor y Ulises. Gracias por enseñarme tanto y querer ser tan inteligente como ustedes.

También quiero dedicar esto a Botarga quien su compañía me ha hecho tanto bien, que siempre me hace sentir feliz y me saca una sonrisa en cuanto veo.

Quiero dedicar esto a la UNAM, a mi hermosa Facultad, mi segunda casa, a mis profesores y maestros que me mostraron tanto. Me siento muy orgulloso de pertenecer a esta institución. Egresar de ella me hace sentir capaz de todo, gracias por tanto a esta universidad tan noble.

Finalmente a mí mismo, por encontrar fortaleza y no dejarme derrotar. Porque no creía lo fuerte que podía ser y lo fuerte que fui. Por lograr ser y buscar la mejor versión que puedo de mí.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación fue financiado por el consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de registro A1-S-10463; y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) No. IN209718, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Agradezco también la beca para estudios de Licenciatura/Realización de tesis derivada del proyecto PAPIIT IN209718, UNAM durante el 2018.

Gracias a la Dra. Miriam por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio y brindarme su paciencia y su apoyo durante este proceso.

De igual manera quiero agradecer a mis sinodales, por su paciencia y tiempo para revisar mi tesis.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
Cáncer.....	5
Respuesta inmune inflamatoria.....	6
Enfermedad inflamatoria intestinal	9
Cáncer de colon.....	11
Etiología del cáncer colorrectal	14
Papel del sistema inmune durante el desarrollo del cáncer	17
Citocinas y cáncer	18
Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF).....	18
Papel de MIF en el cáncer colorrectal asociado a colitis	19
Microbiota	20
Microbiota y cáncer de colon	21
El papel de MIF en la microbiota.....	22
JUSTIFICACIÓN.....	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	24
Objetivos particulares	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Establecimiento del modelo experimental de CCR.....	25
Método de inducción de cáncer colorrectal.....	27
Final del modelo experimental y sacrificio de los ratones.....	28
Análisis histopatológicos	28
Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).....	29
Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).....	29
Preparación de las bibliotecas para la secuenciación masiva en paralelo	31
Análisis bioinformático	34
RESULTADOS.....	35
La transferencia de microbiota se encuentra relacionada con el aumento de peso de los ratones durante el modelo	35

Los ratones con microbiota procedente de ratones <i>mif</i> ^{-/-} presentan menor número de tumores	36
Determinación de MIF en tejido tumoral	40
Determinación de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias por RT-PCR.....	41
Análisis histológico de los tumores.....	44
Análisis bioinformático	46
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	60

Índice de tablas y figuras

Figura 1. Respuesta inflamatoria e interacción del sistema inmune con la microbiota intestinal	8
Figura 2. Diferencias entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.....	10
Figura 3. Tipos de cáncer más comunes.....	11
Figura 4. Incidencia de cáncer en México	13
Figura 5. Vía de señalización Wnt-β-catenina.....	16
Figura 6. Modelo de cáncer colorrectal inducido por AOM	27
Figura 7. Comparación del porcentaje de peso	35
Figura 8. Longitud de los intestinos	37
Figura 10. Producción de MIF en tejido tumoral	40
Figura 11. Transcritos de genes de citocinas.....	41
Figura 12. Expresión relativa de las citocinas, en relación a β-actina.....	43
Figura 13. Cortes histológicos de los intestinos	45
Figura 14. Microbiota intestinal no modificada	47
Figura 15. Microbiota intestinal modificada.....	48
Figura 16. Bacterias identificadas en el intestino de los ratones	49
Figura 17. Análisis de coordenadas principales (PCoA).....	50
Tabla 1. Grupos experimentales	26
Tabla 2. Secuencias de primers	30
Tabla 3. Asignación de nuevos grupos para la secuenciación masiva en paralelo ..	32
Tabla 4. Número de secuencias analizadas	46

ABREVIATURAS

AOM	Azoximetano
APC	Adenomatous polyposis coli
Bcl-2	Células B de linfoma
CCR	Cáncer colorrectal
CD	Células dendríticas
CD	Cumulo de diferenciación
C-JUN	Protooncogen C-JUN
c-MYC	Protooncogen c-MYC
COX	Ciclooxigenasa
CUC	Colitis ulcerosa crónica
CXCR	Receptor de quimiocinas tipo CXC
D-DT	D-Dopachrome Tautomerase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Dvl	Dishevelld
DSS	Dextrán sulfato de sodio
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
Fzd	Frizzled
FRA-1	Antígeno 1 ligado a FOS
GSKB	Glucógeno sintasa 3-beta
H. pylori	<i>Helicobacter pylori</i>
HIF-1α	Factor 1 Inducible de Hipoxia
H&E	Hematoxilina-Eosina
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
LEF	Factor vinculante potenciador linfocitario
LPS	Lipopolisacárido
MAM	Metilazoximetanol
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIF	Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos
MMTV	Virus del tumor mamario del ratón
mRNA	RNA mensajero
MyD88	Respuesta primaria de diferenciación mielocítica
NF-KB	Factor nuclear kappa de células B activadas
NK	Células asesinas naturales
NKT	Células asesinas naturales invariables
NO	Óxido nítrico
OTU	Unidad taxonómica operativa
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PLA	Fosfolipasa A
PGE	Prostaglandina E
RNA	Ácido ribonucleico
RSV	Virus sincitial respiratorio

TCF	T-Cell-Factors
TCR	Receptor de células T
Th	Linfocitos T cooperadores
TIR	Receptor Toll/IL-1
TLR	Receptor tipo Toll
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
TP53	Proteína tumoral p53
T-reg	Linfocito T regulador.
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WT	Tipo silvestre
β -TrCP	Transducción beta de la proteína F-box/WD

RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) ocupa el 3er lugar en incidencia y el 4to en mortalidad a nivel mundial. Entre otros, la inflamación crónica del intestino es un importante factor de riesgo para el desarrollo del CCR. Además, se ha relacionado la disbiosis con el desarrollo de diversas patologías incluido el CCR, revelando grandes diferencias entre las poblaciones microbianas de individuos sanos y pacientes. El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), es una citocina inflamatoria que se encuentra sobre-expresada en una gran cantidad de tipos de cáncer, incluido el CCR. También se le ha asociado con la modulación de la respuesta inmunitaria y de la resistencia dirigida hacia diversos microorganismos.

Dada la importancia que tiene MIF en la regulación de la respuesta inflamatoria y en la carcinogénesis, decidimos evaluar el efecto de esta citocina sobre la composición de la microbiota intestinal, y si esta a su vez juega un papel en el desarrollo de CCR.

Desarrollamos un modelo de CCR en ratones BALB/c libres de patógenos, que fueron tratados con antibióticos para disminuir sus poblaciones microbianas. Posteriormente, se les realizaron transferencias de microbiota obtenidas de ratones WT o *mif*^{-/-} también de fondo genético BALB/c, y se les indujo CCR a partir de un modelo que consistió en la administración de azoximetano (AOM) y dextran sulfato de sodio (DSS). Se realizaron dos experimentos: El primero culminó el día 40 y el segundo en el día 68 post-inducción con AOM.

Los ratones con microbiota procedente de ratones *mif*^{-/-} mostraron un menor número de tumores comparado con los ratones con microbiota WT pero de mayor tamaño, además de presentar un microambiente pro-inflamatorio exacerbado lo que posiblemente influya en el desarrollo de los tumores formados. En cuanto a la microbiota intestinal, se identificaron diferentes bacterias patógenas en ambos grupos experimentales, además de analizar los cambios en las poblaciones de *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, observándose un aumento en el porcentaje de las

ultimas en los ratones con microbiota procedente de ratones *mif*^{-/-}, en comparación con los ratones con microbiota procedente de ejemplares WT.

Los resultados de este estudio sugieren que MIF influye en la composición de la microbiota intestinal lo que repercute en el establecimiento y desarrollo de cáncer colorrectal. Estos resultados nos permitirán comprender mejor la funcionalidad de MIF en el organismo.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) ranks 3rd in incidence and 4th in mortality worldwide. Chronic inflammation of the intestine is an important risk factor for the development of CRC. In addition, dysbiosis has been linked to the development of several pathologies including CRC showing large differences between microbial populations of healthy individuals and patients. The inhibitory factor of macrophage migration (MIF) is an inflammatory cytokine that is over-expressed in a large number of cancers, including CRC. It has also been associated with the modulation of the immune response and tolerance directed towards different microorganisms.

Given the importance of MIF in the regulation of the inflammatory response and carcinogenesis, we decided to evaluate the effect of this cytokine on the composition of the intestinal microbiota, and if this in turn plays a role in the development of CRC.

We developed a CRC model in pathogen-free BALB / c mice, which were treated with antibiotics to decrease their microbial populations. Subsequently, microbiota transfers obtained from WT or *mif* -/- mice were also carried out, also with a BALB/c genetic background, and CRC was induced by administering a model of azoxymethane (AOM) and sodium dextran sulfate (DSS). Two experiments were performed: The first one culminated on day 40 and the second on day 68 post-induction with AOM.

Mice with microbiota from *mif* -/- showed a lower number of tumors compared to WT microbiota but larger, in addition to presenting an exacerbated pro-inflammatory microenvironment which possibly influences the development of tumors. Regarding to the gut microbiota, different pathogenic bacteria were identified in both experimental groups, besides to analyzing the changes in the populations of Firmicutes and Bacteroidetes, look an increase in the percentage of the latter in the mice with microbiota from mice *mif* -/-, compared with mice with microbiota from WT specimens.

This study suggest that MIF influences the composition of the intestinal microbiota, which affects the establishment and development of colorectal cancer. These results will allow us to better understand the functionality of MIF in the organism.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El término cáncer engloba un grupo numeroso de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales, que se dividen y crecen sin control en cualquier parte del cuerpo. El cáncer surge de la transformación de células normales en células tumorales, en un proceso de múltiples etapas que promueven dicha transformación [1, 2]. Cada uno de estos cambios reflejan alteraciones en el código genético y (o) en el sistema regulatorio de su expresión, que conducen a la progresión de células normales en células altamente malignas [3].

Normalmente, las células crecen y se dividen para producir nuevas células, necesarias para mantener sano el cuerpo, en homeóstasis. Algunas veces, este proceso ordenado y controlado por una serie de señales bioquímicas, se descontrola. Nuevas células se siguen formando cuando el cuerpo no las necesita, y las células viejas no mueren cuando deberían morir [2]. Las células cancerosas no responden a estas señales de la misma manera que una célula sana, y pueden, además, desregular estas señales alterando el efecto de sus procesos y funciones [4]. Para que una célula sea considerada maligna debe cumplir con ciertos criterios como lo son la evasión de la apoptosis, autosuficiencia en las señales de crecimiento e insensibilidad a las señales de anti-crecimiento, que promueva el proceso de angiogénesis, capacidad auto-replicativa ilimitada y la invasión de tejidos o metástasis [3]

El proceso por el cual las células normales se transforman en células cancerosas se denomina carcinogénesis. Este proceso comienza cuando agentes externos actúan sobre la célula alterando su material genético (mutación) [5]. El proceso que conduce al desarrollo de un tumor maligno comienza con una mutación individual en una sola célula del organismo. Las células dañadas comienzan a multiplicarse a una velocidad ligeramente superior a la normal, transmitiendo a sus descendientes dicha mutación [6]. Esta reproducción acelerada permite la aparición de nuevas

mutaciones y de alteraciones en la expresión de genes asociados con el ciclo celular. Tarde o temprano, durante el desarrollo de la mayoría de los tipos de cáncer, las células formadas en las masas tumorales adquieren la capacidad para invadir tejidos adyacentes (metástasis) [3].

Respuesta inmune inflamatoria

Como ya se describió, la carcinogénesis es un proceso que requiere de diferentes etapas de mutación a lo largo de un periodo de tiempo, que terminan con el progreso de células con propiedades de crecimiento altamente desarrolladas [7].

Existen diferentes factores que causan mutaciones en el ADN. La susceptibilidad genética del individuo juega un papel importante, al igual que lo hace el estilo de vida, y los factores ambientales a los que el individuo se ve expuesto durante su vida cotidiana [3]. Uno de estos factores es la inflamación, esta puede ayudar al desarrollo y crecimiento del cáncer de distintas formas.

La inflamación es una función crucial del sistema inmune innato. En condiciones normales, el proceso inflamatorio se da de forma aguda, agresiva, rápida e inespecífica contra microorganismos y cuerpos extraños que penetren en nuestro sistema [8]. Sin embargo, la inflamación puede persistir por largos periodos de tiempo y volverse crónica. Esto puede ser el resultado de un proceso infeccioso o irritante que resulta en una lesión que no logra ser controlada, y en consecuencia se prolonga la respuesta inflamatoria (Figura 1).

En la respuesta inflamatoria aguda o crónica, se suelen reclutar y activar de forma constante una gran cantidad de leucocitos que destruyen los agentes infecciosos, reparan el tejido dañado, e inician la respuesta inmune específica y de largo plazo. Los lugares de inflamación crónica también sufren a menudo una reestructuración tisular, con angiogénesis y fibrosis [8].

La inflamación puede contribuir de múltiples formas al desarrollo de las células malignas, una de ellas es por medio de una gran cantidad de moléculas que actúan en el microambiente tumoral, incluyendo factores de transcripción, factores de

crecimiento que intensifican las señales de proliferación, factores de supervivencia que evitan la muerte celular, así como diversas enzimas que facilitan los procesos de angiogénesis, proliferación y metástasis [9, 10].

En la última década, las investigaciones acerca de la respuesta inflamatoria asociada al desarrollo tumoral han demostrado que las células del sistema inmune tienen una participación importante tanto en la génesis como en la progresión del cáncer [9, 10].

Las células inflamatorias del sistema inmune son una fuente primordial de las moléculas procancerígenas antes mencionadas (promueve de la activación factores de transcripción, de supervivencia, proangiogénicos, etc.), además utilizan y generan de forma constante especies reactivas de oxígeno, las cuales causan mutaciones en el genoma que pueden acelerar la evolución del cáncer [11].

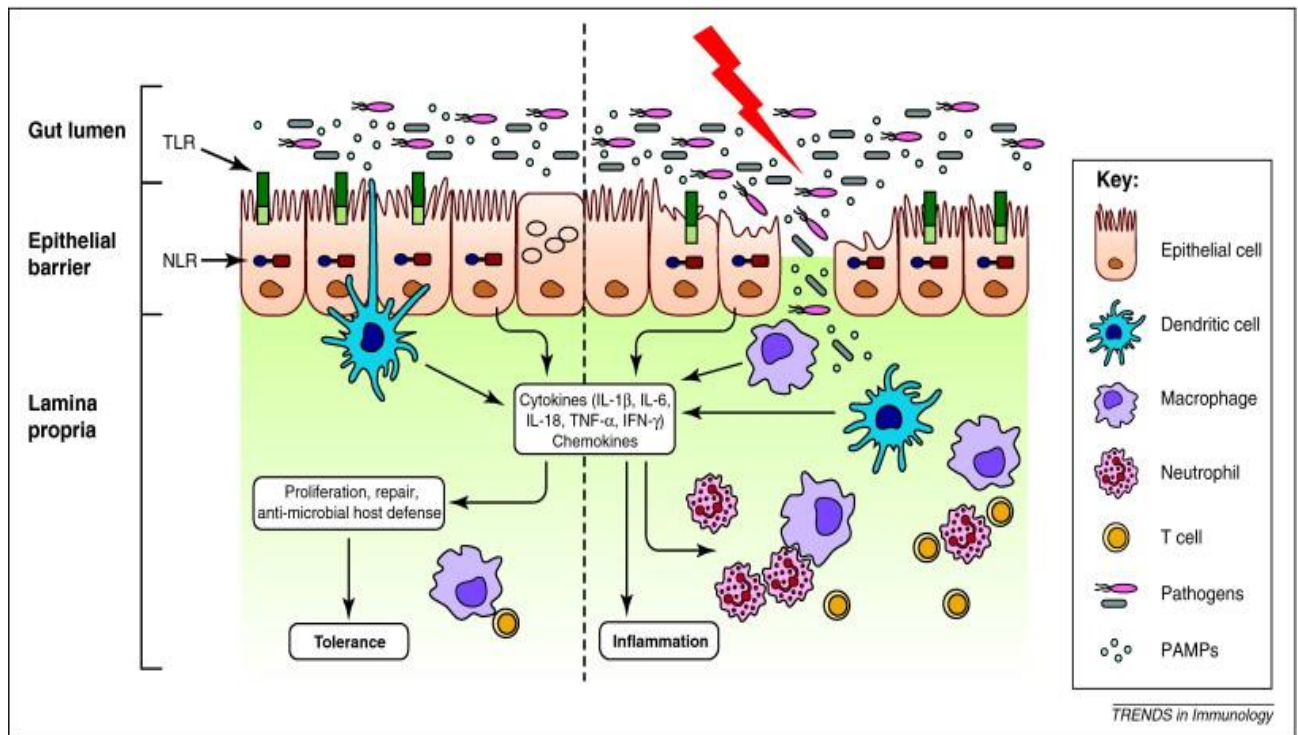


Figura 1. Respuesta inflamatoria e interacción del sistema inmune con la microbiota intestinal

La barrera epitelial del intestino junto con el mucus, protegen los tejidos de las bacterias del lumen intestinal. En individuos sanos existe un estado de tolerancia inmune que permite a las bacterias no patógenas establecerse en el intestino. Las células dendríticas a través de espacios intraepiteliales reconocen las bacterias comensales e inducen respuestas regulatorias que permiten una tolerancia inmune. En individuos susceptibles, la barrera epitelial se ve comprometida y las bacterias comensales pueden invadir la lámina propia y la mucosa. Una vez infiltrados interactúan con diversas células como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas reclutadas a través de señalizaciones de reconocimiento llevados por receptores como TLRs o NLRs. La activación de los diferentes receptores de la inmunidad innata activa la producción de diversas citocinas pro-inflamatorias que generan en los tejidos infectados el proceso inflamatorio. Tomado de *Zaki, M. H., Lamkanfi, M., & Kanneganti, T. D. (2011). The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis. Trends in immunology, 32(4), 171-179.*

Enfermedad inflamatoria intestinal

El término Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) se refiere a una serie de enfermedades crónicas del tracto digestivo, en las cuales la inflamación crónica se presenta como síntoma distintivo [12].

Las dos formas más comunes de EII son la colitis ulcerosa crónica (CUC) y la enfermedad de Crohn (EC). La CUC es una inflamación difusa crónica restringida a la mucosa y a la submucosa, que afecta preponderantemente colon y recto. Origina ulceración, edema, sangrado y desequilibrio hidroelectrolítico causado por la inadecuada absorción de minerales a nivel renal [12]. Generalmente inicia en el recto, y en la porción sigmoide del intestino, propagándose por todo el colon en dirección ascendente, solo en raros casos llega a afectar al íleon terminal (Figura 2) [13].

La manifestación más típica es la aparición de sangrado rectal o de una hemorragia digestiva baja que suele ser intermitente. En el caso del sangrado, el color suele ser determinante para inferir el grado de avance de la enfermedad en el colon, esto debido a que rastros de hemoglobina pigmentan las heces. Los vasos sanguíneos en estas zonas altamente vascularizados, sobre todo los que se encuentran en la superficie de los pólipos, adenomas o tumores colorrectales, frecuentemente son frágiles y se dañan fácilmente durante el paso de las heces, así la prueba de sangre oculta en heces nos puede dar indicios del avance y las zonas donde se generan las úlceras [13].

En el caso de la EC esta es una enfermedad crónica que se caracteriza por la inflamación, pudiendo afectar prácticamente cualquier parte del tracto digestivo, seguido de una discapacidad severa a causa de la inflamación que puede llegar a desarrollarse hasta la muerte del individuo. Se desconoce la causa de esta enfermedad, pero durante su desarrollo es muy común presentar periodos de exacerbaciones espontáneas y posteriormente la remisión de las mismas, dificultando la evaluación de esta enfermedad. Debido a que esta enfermedad

puede desarrollarse en cualquier parte del sistema digestivo los síntomas entre pacientes pueden diferir unos de otros [14]

El riesgo de malignización del colon es una complicación a tener en cuenta en aquellos casos donde se presentan una pancolitis (inflamación generalizada del colon) con 10 años de evolución. El riesgo de malignización se incrementa con el aumento de años de enfermedad, más comúnmente en íleon terminal [12].

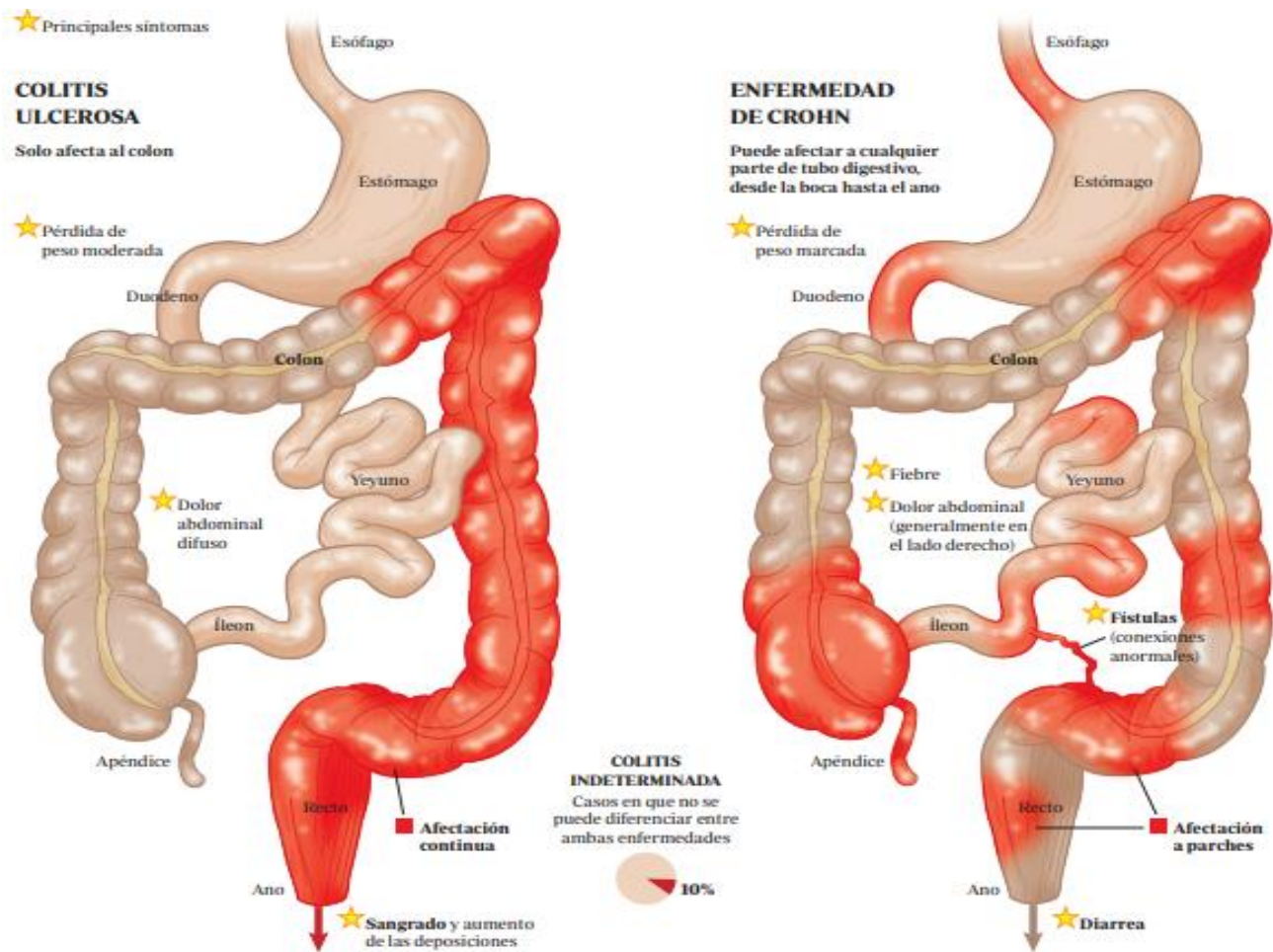


Figura 2. Diferencias entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn

Aunque ambas enfermedades son muy similares y se caracterizan por la inflamación crónica del intestino, se pueden diferenciar entre sí a partir de los síntomas, las zonas de afección, las diversas capas de la pared gastrointestinal en las que afecta o las lesiones que provoca. Tomado de <https://www.cun.es/material-audiovisual/infografia/enfermedad-inflamatoria-intestinal>

Cáncer de colon

El cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad en todo el mundo. En 2015 se atribuyeron a esta enfermedad 8,8 millones de defunciones [1]. Es la segunda causa principal de muerte en el continente americano, donde se estima que 2,8 millones de personas son diagnosticadas cada año y 1,3 millones mueren cada año [15]. Se prevé que durante las próximas dos décadas los casos de cáncer aumenten en un 70%. Existen más de 100 diferentes tipos de cáncer, y se pueden encontrar subtipos de tumores en diferentes órganos [3].

Los tipos de cáncer más frecuentes a nivel mundial para ambos sexos son, el de mama, próstata, pulmón y el cáncer colorrectar, mientras que los que poseen el índice de mortalidad más alto son el de pulmón, mama, el colorrectal y el cáncer de hígado. (Figura 3).

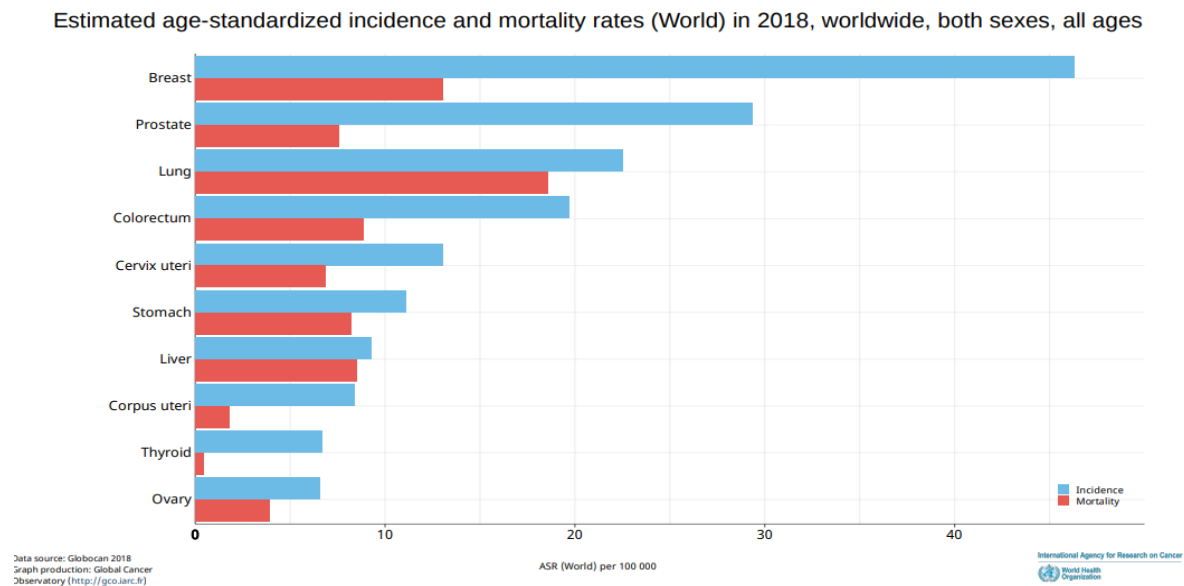


Figura 3. Tipos de cáncer más comunes

Incidencia (Azul) y mortalidad (Rojo) de los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial durante el 2018.

Tomado de Globocan. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&ancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id=

El CCR es un tumor maligno que se desarrolla en la última porción del tubo digestivo. En más del 80-90% de los casos de CCR, se produce primero un tumor premaligno formado por glándulas mucosas preexistentes (pólipo), el cual puede llegar a crecer por varios años hasta transformarse en un cáncer [16].

Solo el 5 % de los casos de CCR se encuentran relacionados a un historial en alteraciones genéticas hereditarias. Entre estas podemos encontrar el Síndrome de Lynch (2-4 %) o la Poliposis adenomatosa familiar (1%) [17]. La gran mayoría de los casos de CCR se deben a factores externos relacionados con el estilo de vida de los individuos.

El 25% de los casos de CCR se presentan en pacientes que tienen un historial médico que los mantiene vulnerables, por ejemplo: antecedente personal de adenomas únicos o múltiples, CCR o EII, y antecedentes familiares de CCR o de adenomas únicos o múltiples [16].

En México esta enfermedad se representa como el cuarto cáncer más frecuente, y aproximadamente el 52% de los casos registrados en 2018 se dieron en hombres mientras que el 48% se dieron en mujeres (Figura 4). Más del 90% de los casos de cáncer colorrectal se manifiestan después de los 50 años de edad [18].

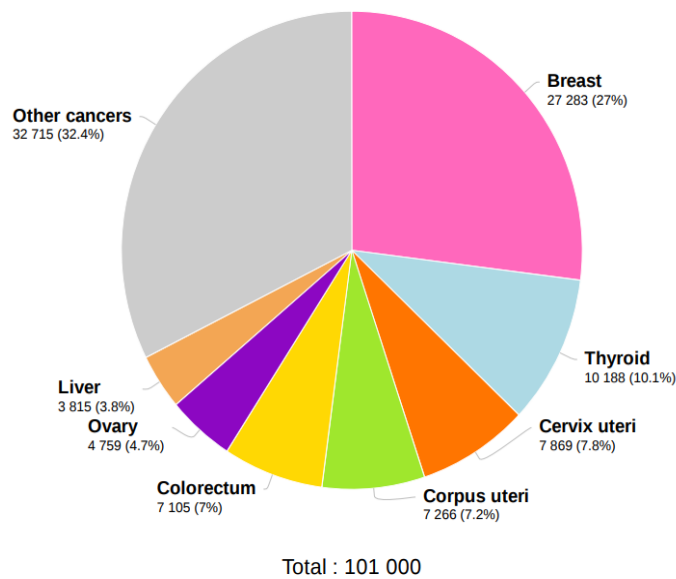
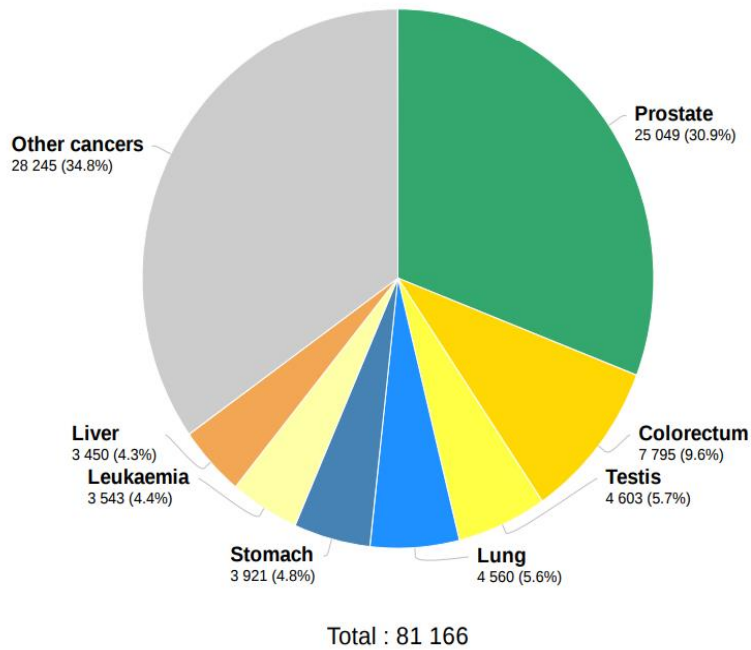


Figura 4. Incidencia de cáncer en México

Incidence of various types of cancer in Mexico during 2018, in men (Arriba) and women (Abajo). Taken from Globocan.

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=population&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=1&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=2&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&population_group_list=32,44,52,84,68,76,152,170,188,192,214,218,222,312,474,254,320,328,332,340,388,484,558,591,600,604,630,662,740,780,858,862&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=904

Etiología del cáncer colorrectal

Los factores de riesgo que se asocian con el desarrollo de CCR (al igual que como con muchos otros cánceres), resultan de una interacción entre: los hábitos de vida del individuo, el fondo genético y la exposición al ambiente en donde se encuentra [1, 2]. Por ejemplo, pacientes con colitis ulcerativa presentan un riesgo más elevado de desarrollar CCR.

Se cree que el mecanismo por el cual la CUC se desarrolla, resulta de la interacción compleja de diversos factores como la genética, la desregulación de la respuesta inmune y alteraciones en la composición de la microbiota intestinal [19]. Los pacientes con esta enfermedad presentan un riesgo más elevado de desarrollar CCR, y aunque aún no se comprende del todo el mecanismo involucrado, posiblemente el estrés oxidativo juegue un papel importante en su desarrollo. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, generadas por las células inflamatorias, podrían alterar la regulación de genes clave en el control del ciclo celular y el proceso de carcinogénesis [20]. Estas especies pueden causar metilaciones en genes supresores como *Adenomatous polyposis coli (APC)*, la metilación de *APC* es conocida por ser uno de los primeros eventos en el desarrollo de la carcinogénesis colorrectal durante etapas tempranas. Este proceso es seguido por la mutación de genes supresores de tumor como p53, que llevan a su inactivación y la progresión de la carcinogénesis [21].

La interacción de APC con el proto-oncogen Beta-catenina vincula la carcinogénesis colorrectal a la vía de transducción de señal Wnt [21]. La pérdida de la función en APC resulta en la acumulación de β -catenina en el citoplasma. Usualmente, la beta-catenina se encuentra asociada a dos proteínas: E-cadherina, y a un complejo denominado degradosoma formado por las proteínas APC, Axina y Glucógeno sintasa cinasa 3 beta (GSK3B), en el citoplasma. La función del degradosoma es fosforilar a β -catenina, generando sitios de reconocimiento para β -TrCP, y favoreciendo su posterior ubiquitinación para finalmente ser degradada en el proteosoma. La ausencia de β -catenina en el núcleo inhibe la expresión de los genes blanco en la vía canónica de Wnt [22].

La activación de la vía se inicia con la secreción de proteínas Wnt y la unión de estas con su ligando. Estos son receptores de superficie celular llamados Frizzled (Fzd). La activación del receptor Fzd recluta a la proteína Dishevelled (Dvl). Cuando Dvl es fosforilado bloquea al degradosoma, encargado de la degradación de β -catenina, ya que se unen Dvl y Axina, previniendo la formación del complejo con GSK3B [22].

Todo esto conduce a la acumulación de β -catenina en el citoplasma, que al no ser degradada puede translocarse al núcleo, donde interactúa con diferentes factores de transcripción como los T-cell factors (TCF) y el factor vinculante potenciador linfóide (LEF) [23]. Cuando los factores de transcripción TCF/LEF son reprimidos gracias a la unión con β -catenina, se comienzan a sobre-expresar diferentes proto-oncogenes como c-MYC, c-JUN, FRA-1 y ciclina D1, que terminan por desencadenar un aumento en la proliferación celular, así como la pérdida de diferenciación celular [24].

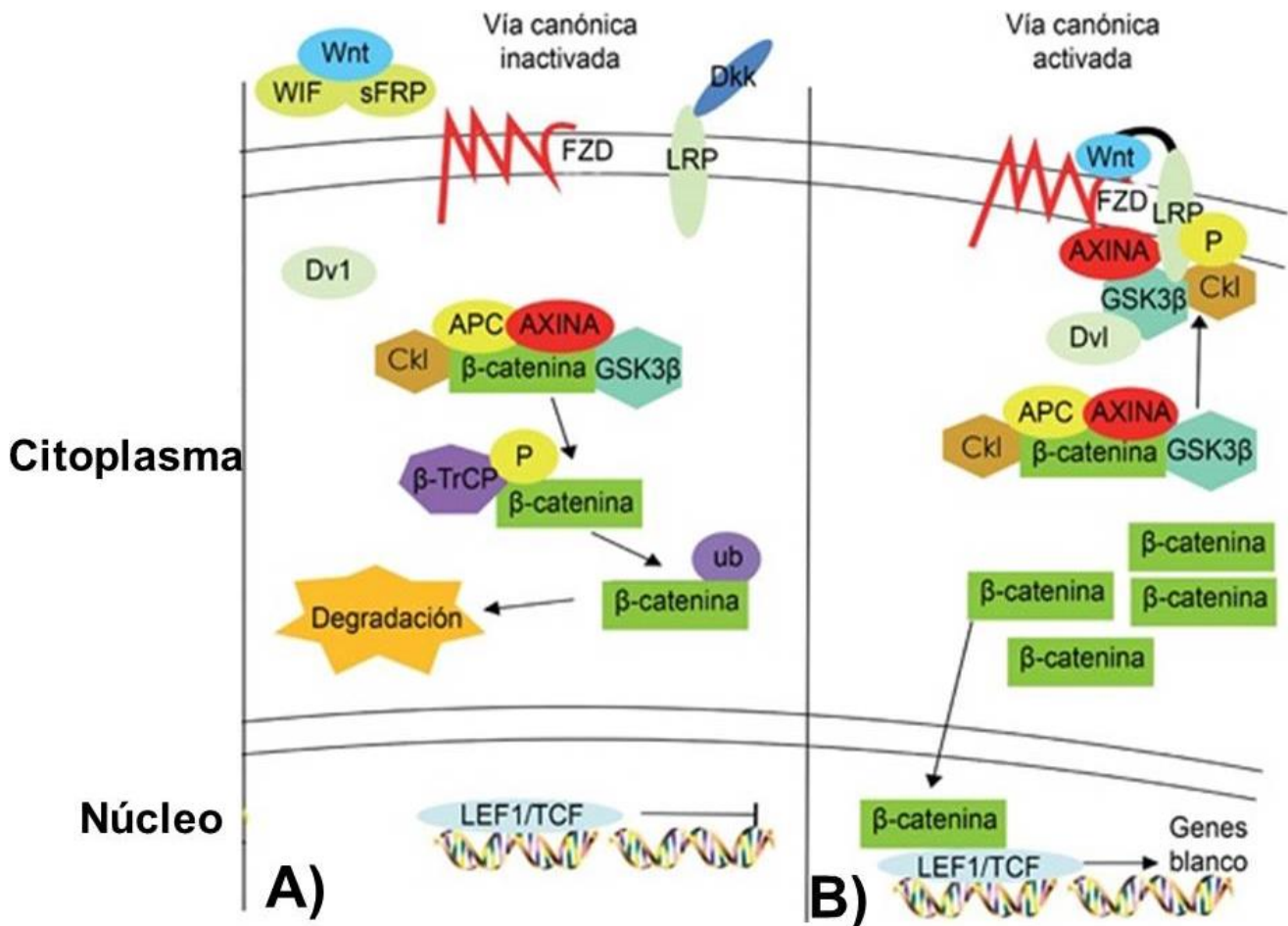


Figura 5. Vía de señalización Wnt-β-catenina

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

Papel del sistema inmune durante el desarrollo del cáncer

En principio, el sistema inmune tiene la capacidad de detectar y destruir las células cancerígenas de manera específica, es decir, sin dañar el tejido sano. Sin embargo, en la realidad la respuesta inmune presenta una dualidad que puede contener o favorecer el desarrollo del cáncer. 1) Por un lado tiene la capacidad de detectar y eliminar los daños que afectan las funciones celulares normales, pero por otro lado, 2) puede promover un microambiente favorable para el desarrollo tumoral debido a la presencia exacerbada y persistente de diversas citocinas pro-inflamatorias. Así, la inflamación crónica en el microambiente tumoral y la capacidad del tumor para evadir la respuesta inmune son factores condicionantes para la oncogénesis [25].

El sistema inmunológico también puede favorecer el desarrollo de células tumorales que escapan al reconocimiento del hospedero. Para describir la capacidad del sistema inmunológico de amoldar la inmunogenicidad de tumores se creó el concepto de inmunoedición [25]. La inmunoedición es la selección (mediada por células T) de células tumorales que por azar presentan una menor antigenicidad. Las células T citotóxicas eliminan a las células más antigénicas sin afectar a las menos antigénicas, promoviendo que el tumor en conjunto se vuelva menos inmunogénico [26].

Para que esto ocurra primero debe darse un reconocimiento por parte del sistema inmune. El crecimiento invasivo causa interrupciones menores dentro del tejido circundante que inducen señales inflamatorias que conducen al reclutamiento de células del sistema inmune innato (NKT, NK, células T $\gamma\delta$, macrófagos y células dendríticas) en el sitio [27]. Posteriormente, se da una etapa en donde el sistema inmune del huésped y cualquier variante de células tumorales que haya sobrevivido al proceso de eliminación entran en un equilibrio dinámico. Durante este lapso, muchas de las células originales son destruidas, pero se mantienen aquellas menos inmunogénicas e incluso surgen nuevas variantes con mutaciones que les confieren una capacidad de evasión mayor frente a la respuesta inmune.

Finalmente, se da un proceso de escape por parte de las células tumorales que han adquirido la capacidad de evadir la detección por parte del sistema inmune, y que terminan por expandirse de una manera descontrolada [27].

Citocinas y cáncer

Es sabido que varias moléculas mediadoras de la inflamación se encuentran sobre-expresadas en patologías como el cáncer. Estas moléculas incluyen citocinas liberadas durante la activación de células inmunes, que son necesarias para la realización de procesos como la diferenciación y proliferación celular, la quimiotaxis y la inflamación. Entre estas citocinas podemos encontrar diversas interleucinas (IL), el Factor de Necrosis Tumoral (TNF- α), el IFN- γ y el Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) [28].

Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF)

Aunque MIF fue descrito desde 1966 [29], el papel que juega esta molécula en nuestro organismo se desconocía casi por completo. Actualmente se sabe que MIF es una pequeña proteína formada por tres subunidades idénticas, cada uno de estos monómeros contiene dos hélices alfa antiparalelas y una hoja beta de cuatro cadenas, los cuales rodean un canal central [30]. Esta citocina producida por una gran cantidad de tipos celulares, es almacenada en depósitos intracelulares de células sin estímulo, los cuales están asociados con el aparato de Golgi a través de la proteína p115. Una vez estimulada la célula, MIF se disocia de p115 con lo cual lleva a cabo sus funciones [31]. En años recientes, se ha visto que MIF cumple un importante rol en la inmunidad innata, siendo un integrante crucial en la respuesta del hospedero frente a patógenos microbianos o ante el estrés, que actúa promoviendo las funciones pro-inflamatorias de diferentes células siendo una citocina pluripotente llegando a actuar como hormona, pues en ocasiones es producida por células corticotrópicas [32]. MIF ejerce una variedad de funciones biológicas, incluida la activación de macrófagos, aumento de la adherencia celular, de la fagocitosis y de la actividad tumoricida, inducción de la producción de óxido nítrico (NO), funciones enzimáticas (actividad tautomerasa *in vitro*) entre otros [32-]

34]. Esta citocina se expresa en casi todos los órganos de cuerpo, y sirve además como mediador para la expresión y activación de otras citocinas inflamatorias como IL6, IL1 β o TNF- α [33].

Papel de MIF en el cáncer colorrectal asociado a colitis

Diversos trabajos han mostrado que MIF se sobre-expresa en una gran variedad de enfermedades relacionadas con la inflamación, incluida una amplia gama de enfermedades autoinmunes, así como en la exacerbación de la EII [35]. Por esto, recientemente se ha investigado el rol que tiene sobre el desarrollo de cáncer [36].

La interacción que MIF lleva a cabo con las células se da a través de un receptor transmembranal localizado en la superficie celular llamado CD74, el cual también funge como una molécula de procesamiento en la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC)-II. Este receptor es transitoriamente expresado en la superficie celular de diversas células, incluyendo monocitos, células B, fibroblastos, etc [36].

Se sabe que MIF se une al dominio extracelular de CD74, activando la vía de MAPK/ERK [37]. Esto resulta en la translocación de MAPKs al núcleo, donde interaccionan con diversos factores de transcripción, como la cascada de señalización que activa NF-kappaB, exacerbando la respuesta inflamatoria del hospedero [38].

Además, se sabe que MIF puede interaccionar con la fosfolipasa A2 (PLA2) que aumenta la concentración de la ciclooxigenasa -2 (COX-2) y la prostaglandina E2 (PGE2). La producción excesiva de COX-2 promueve la tumorigénesis del CCR y el mantenimiento neoplásico a través de los efectos que genera sobre la angiogénesis, la apoptosis y la invasividad de las células tumorales. Además al mismo tiempo, la disminución en la fosforilación de p53 a causa de la mediación por óxido nítrico (NO) permite la progresión del ciclo celular [39, 40].

Por otro lado, MIF es considerada una citocina con funciones de quimiocina por la capacidad que tiene de unirse 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 quimiotaxis de los macrófagos (CXCR2) y de linfocitos (CXCR4) [41]

Otro mecanismo importante por el cual MIF contribuye al proceso carcinogénico es estabilizando la subunidad alfa del Factor 1 Inducible por Hipoxia (HIF-1 α), la cual es una proteína que una vez activada, induce la expresión del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), la cual es una molécula de suma importancia para el crecimiento vascular durante la angiogénesis y por ende el desarrollo del cáncer. Por otra parte, MIF coopera con su único homólogo conocido, D-Dopachrome Tautomerase (D-DT) para promover la expresión de VEGF a través de una vía de señalización dependiente de la quinasas c-Jun-N-terminal (JNK) / AP-1. Es importante destacar que para la activación de JNK mediada por MIF y D-DT, que conduce a la transcripción de VEGF dependiente de AP-1, es necesaria la presencia del receptor de superficie celular CD74 [42].

Como se ha descrito, MIF puede promover a través de varios mecanismos el crecimiento y supervivencia de una neoplasia, debido a que actúa en varias etapas del desarrollo tumoral como son la proliferación celular, angiogénesis, y la supresión de la vigilancia inmune de la célula huésped-tumor [34].

Microbiota

Los microorganismos influyen extensamente en la vida y constitución tanto física como química de nuestro planeta. Durante miles de años el desarrollo y convivencia entre diferentes especies de microorganismos, ha dado como resultado un proceso de evolución mutua, una simbiosis [43].

Ciertos agentes infecciosos como las bacterias, pueden generar o ayudar al desarrollo del CCR. Estas infecciones pueden debilitar el sistema inmunitario, haciendo que el cuerpo no pueda defenderse de manera adecuada contra el cáncer. Además también existe la posibilidad de que estas infecciones lleguen a generar inflamación crónica, que puede conducir al cáncer [44].

El término de “Microbiota” se refiere a la población de microorganismos vivos reunidos en un nicho ecológico determinado, como la piel y mucosas de las personas. El tubo digestivo del ser humano alberga una población numerosa, diversa y dinámica de microorganismos, principalmente bacterias, pero también hongos y virus, que se han adaptado a la vida en las superficies mucosas o en la luz del intestino desde hace milenios. Se estima que la población microbiana del intestino humano incluye unos 100 billones de bacterias de aproximadamente 500 especies distintas. En años recientes se han adquirido suficientes conocimientos para poder afirmar que las funciones del tubo digestivo, nutrición y defensa, dependen no solo de las estructuras propias (barrera mucosa, glándulas secretoras, sistema inmune de las mucosas) sino también de la presencia y actividad de las comunidades microbianas que colonizan el intestino [45]. Así, el papel que cumple la microbiota en nuestro sistema es muy extenso, ayuda a la digestión, participa en la degradación de toxinas y contribuye a la maduración del sistema inmunitario [43].

Tal es su importancia en nuestro desarrollo, que la alteración de la misma puede generar diversas patologías como la enfermedad inflamatoria intestinal o el cáncer de colon [46].

Microbiota y cáncer de colon

En los últimos años, estudios que exploran las patologías generadas a través del cambio en la microbiota normal (disbiosis), han generado gran interés en la comunidad científica. Diversos trabajos han mostrado que una alteración en la composición de la microbiota humana pueden generar enfermedades como la obesidad, desordenes metabólicos, alergias, e inclusive autismo o esquizofrenia, así como enfermedades autoinmunes y el desarrollo y mantenimiento de diversas neoplasias [47].

El rol que cumple la microbiota en el cáncer aún no se comprende del todo, esto debido a la gran cantidad de factores que pueden afectar esta interacción. Nuestros cuerpos están continuamente expuestos a células microbianas, tanto residentes como transitorias, así como a sus productos de excreción/secreción, incluidos los

metabolitos tóxicos que generan. Además, al entrar en circulación, estos metabolitos tóxicos pueden contribuir a la progresión de la enfermedad incluso desde lugares distantes [48].

Diversos trabajos de metagenómica, el estudio de material genético presente en un determinado ambiente (en este caso el lumen intestinal), apuntan a que la disbiosis está asociada con trastornos inflamatorios diversos. Uno de los casos donde más evidentemente se observa este cambio es en las poblaciones residentes del hospedero, es en la EII, donde los ecosistemas se ven alterados tanto en las mucosas, como a nivel fecal [49].

Aunque la microbiota influye en la carcinogénesis a través de mecanismos independientes de la inflamación y el sistema inmune, como son la producción de genotoxinas que dañan directamente el ADN o la desregulación en los niveles de pH, el vínculo más reconocible entre el microbioma y el cáncer se da a través del sistema inmunitario [48]. La microbiota residente juega un papel esencial en la activación, el entrenamiento y la modulación de la respuesta inmune del hospedero, por medio de un amplio repertorio de señales inmunogénicas y no inmunogénicas, y de mecanismos por los que afectan la activación del sistema inmune y el tipo de respuesta que se genera, incluida la remodelación epigenética y la alteración de la expresión de genes clave en la respuesta inmune [50]. Además, en individuos sanos, los microorganismos residentes tienen un papel clave en la regulación de la respuesta inmunológica, controlando la polarización Th1-Th2 y el desarrollo de tolerancia, lo cual define los procesos inmunes e inflamatorios que se llevan a cabo. Una alteración en este mecanismo, puede provocar una polarización inadecuada o exacerbada, y un descontrol en la función de los tejidos del huésped [50].

El papel de MIF en la microbiota

Dentro de las funciones más importantes que tiene MIF, podemos encontrar que es un regulador de la respuesta inmune y del proceso inflamatorio contra diversos patógenos. Su característica más distintiva frente a una infección bacteriana, es la inducción de la expresión de una proteína transmembranal, llamada receptor tipo

Toll 4 (TLR4), el cual está presente en una gran cantidad de células del sistema inmune, como los monocitos, macrófagos y células dendríticas, entre otras [51].

La función básica del receptor TLR4 es la de reconocer productos de origen microbiano, así como moléculas expresadas o liberadas por células estresadas o que están muriendo. Entre los productos microbianos que pueden unirse a este receptor, podemos encontrar la proteína de fusión (F) del virus sincicial respiratorio (RSV), la proteína de la envoltura del virus del tumor mamario del ratón (MMTV) y el lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram-negativas (-) [8, 52].

Este receptor posee un dominio en el citoplasma llamado dominio TIR (Toll/IL-1 Receptor) que puede activar diferentes vías de señalización cuando el receptor se une con alguno de sus ligandos. Este dominio requiere de unirse a otros dominios TIR en proteínas adaptadoras como MyD88, permitiendo que la señal se transmita a través de la vía de señalización dependiente de MyD88, la cual es la más común en este proceso. Esta termina por activar al factor de transcripción NF- κ B, lo que induce la producción de diferentes citocinas pro-inflamatorias [52].

Por otro lado, MIF puede regular el ambiente microbiano a través de la expresión de otras citocinas como son Interleucina 2 (IL-2) o interferón gamma (IFN- γ), que aumentan la capacidad fagocitaria y participan en la defensa contra diferentes bacterias, incluyendo las gram-positivas (+) [53].

JUSTIFICACIÓN

Las diferentes investigaciones en la actualidad nos han demostrado la relevancia que posee la microbiota con relación al desarrollo de enfermedades como el CCR y de cómo la alteración de esta puede inducir o detener la progresión de la enfermedad.

MIF aumenta la expresión de TLR-4 y la secreción de citocinas pro-inflamatorias, por lo tanto es posible que tenga un papel en el desarrollo de la tolerancia inmune y por lo tanto en la presencia de las diferentes bacterias intestinales.

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 (CCR). Sin embargo, no es claro si la presencia de MIF es capaz de generar disbiosis en el intestino. Determinar la influencia de MIF en las poblaciones bacterianas del intestino antes y durante el desarrollo de CCR nos ayudará a determinar el papel de MIF en la transición de CU a CCR.

HIPÓTESIS

En ausencia de MIF se modificará la microbiota intestinal en el modelo inflamatorio experimental, favoreciendo el crecimiento de los tumores asociados al CCR.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la deficiencia de MIF en la composición de la microbiota intestinal y su impacto en el desarrollo de CCR experimental murino.

Objetivos particulares

1. Implementar el modelo de CCR mediante el uso de azoximetano (AOM) y dextrán sulfato de sodio (DSS).
2. Realizar transferencias de microbiota de ratones *mif*^{-/-} y WT a receptores WT.
3. Monitorear los signos clínicos (peso corporal de los ratones, diarrea, sangrado rectal y prolapso rectal), a lo largo del desarrollo del modelo.
4. Obtener muestras de heces de los ratones en los días 0, 40, 68 del desarrollo del modelo de inducción a CCR y su posterior almacenamiento.
5. Comparar tamaño y carga tumoral de tumores del intestino grueso en los grupos experimentales, al final del desarrollo del modelo.
6. Conocer el grado de daño histopatológico.
7. Analizar la expresión de los transcritos de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias en tejido intestinal mediante RT-PCR.
8. Cuantificar la concentración de MIF en tejido tumoral por medio de la técnica ELISA.

9. Caracterización de las poblaciones bacterianas por medio de la secuenciación de la porción 16S del ribosoma bacteriano.
10. Realizar el análisis metagenómico de las poblaciones bacterianas de la microbiota intestinal provenientes de ratones WT o *mif*^{-/-} mediante la secuenciación masiva en paralelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento del modelo experimental de CCR

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) hembras de la cepa BALB/c, libres de patógenos de 7 semanas de edad al momento de la estandarización del modelo, procedentes de Harlan Laboratories, Inc (Harlan-WT) los cuales sirvieron como receptores de microbiota. También se utilizaron ratones WT hembra BALB/c y *mif*^{-/-}, de 7 semanas de edad al momento de la implementación del modelo, provenientes del bioterio de la FES-Iztacala. Los ratones *mif*^{-/-} fueron originalmente donados por el Dr. Satoskar Abhay, de la Universidad de Ohio en Estados Unidos, y que se mantienen en las instalaciones del bioterio de la Facultad donde se preserva la colonia.

Todos los animales se mantuvieron en un ambiente aislado y libre de patógenos, con acceso libre a comida y agua durante todo el experimento.

Se formaron 3 grupos experimentales (Tabla 1), con ratones libres de patógenos (Harlan-WT). Al cumplir las 7 semanas de edad (día 0), 2 grupos recibieron una mezcla de antibióticos por vía oral. La mezcla de antibióticos consistía en sulfato de Colistina (10 mg/ml), sulfato de Gentamicina (50 mg/ml) sulfato de Kanamicina (20 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis), los cuales fueron administrados de acuerdo al peso de los ratones en el agua para beber durante 2 días, posteriormente se inyectó a cada ratón clorhidrato de vancomicina (4.5/kg) solubilizado en solución salina (Sigma-Aldrich) por vía intraperitoneal.

En el día 5 se realizaron las transferencias de microbiota a partir de ratones provenientes del bioterio de la FES-Iztacala (WT y *mif*^{-/-}) de 6-7 semanas de edad, hacia ratones Harlan-WT. Se realizaron tres transferencias por vía oral cada tercer día. Para ello se utilizaron 2 pellets fecales (25 mg aproximadamente) diluidos en agua para beber y transferidos por medio de una cánula (Tecmed) por ratón por vía oral. El primer grupo recibió transferencia de microbiota por parte de los ratones WT (WT con microbiota WT), el segundo por parte de ratones *mif*^{-/-} (WT con microbiota *mif*^{-/-}). Además, al mismo tiempo se formó un grupo al que no se administraron antibióticos ni transferencias de microbiota, pero si la inducción al modelo de CCR (WT CCR).

Tabla 1. Grupos experimentales.

Organización de los diferentes grupos de ratones BALB/c que se formaron para el desarrollo del modelo experimental. Todos recibieron el tratamiento con AOM/DSS.

Grupo	Descripción
WT con micro WT	Ratones BALB/c con microbiota procedente de ratones WT
WT con micro <i>mif</i> ^{-/-}	Ratones BALB/c con microbiota procedente de ratones <i>mif</i> ^{-/-}
WT CCR	Ratones BALB/c que no recibieron tratamiento de antibióticos ni transferencias de microbiota, pertenecientes al bioterio de Harlan

Método de inducción de cáncer colorrectal.

Al término de las transferencias de microbiota se desarrolló el modelo de cáncer de colon derivado de colitis crónica (CAC) descrito por Neufert *et al.*, 2007. Este consiste en una única inyección de azoximetano (AOM) (Sigma-Aldrich) y un tratamiento con dextrán sulfato de sodio (DSS) (Alfa Aesar, Canadá). Se inyectó por vía intraperitoneal a cada ratón con 12 mg / kg de AOM, este fue considerado el día 0 de la inducción y representa el día 12 del experimento. Entre los días 7 y 14 de la inducción se administró una solución de DSS al 2%. Al término se retiró la solución de DSS y se volvió a administrar agua para beber estéril durante 14 días. Se realizaron 2 experimentos de este modelo con mismas condiciones de aislamiento. En uno se realizó un total de 3 ciclos de 7 días con el tratamiento de DSS seguidos de la administración de agua para beber durante 14 días, mientras que en el otro se realizaron únicamente 2 ciclos. El procedimiento culminó en los días 40 y 68 post-inducción, con el sacrificio de los animales (Figura 6).



Figura 6. Modelo de cáncer colorrectal inducido por AOM

Se muestra cronograma para desarrollar el modelo inflamatorio de cáncer colorrectal. Además se muestran de igual manera los periodos de administración de antibióticos y la transferencia de microbiota

Se determinó el peso de cada ratón de forma semanal, y se obtuvieron muestras de sangre de 0.5 ml por corte de la vena caudal antes de la inducción con AOM y al término de cada ciclo de DSS. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos, posteriormente se separó el suero sanguíneo a un nuevo tubo y se guardó a -20°C hasta su uso. También se registró la existencia de

sangrado rectal en caso de presentarse. Además, se colectaron y almacenaron diferentes muestras de heces a -70 °C en distintos puntos del modelo: Antes de las transferencias de microbiota, después de las transferencias, al día 40 y 68 post-inducción con AOM.

Final del modelo experimental y sacrificio de los ratones

Al término del modelo (día 40 y 68 post inducción) se sacrificó a los animales por inhalación de CO₂ y se disectó el intestino grueso. Se registró la longitud de los mismos con un vernier digital (Mitutoyo), y posteriormente fueron lavados con PBS y cortados longitudinalmente. Una vez expuesta la luz intestinal, se registró el número de tumores y el volumen de los mismos. El volumen se determinó utilizando la formula $Volumen = (Largo \times ancho^2)/2$. Se realizaron pruebas de *t*-student independiente en el programa GraphPad Prism 6 para comparar los resultados obtenidos.

Posterior al sacrificio de los ratones, los intestinos fueron cortados en secciones de 0.5 cm de largo. Para el análisis histopatológico, una sección del intestino se preservó en paraformaldehído al 4%. Otra sección se congeló con nitrógeno líquido, se trituró con un mortero y se guardó en TRIzol (Invitrogen) a -70°C para la posterior extracción de RNA. Una tercera sección del intestino se preservó en buffer RIPA (BioWest) con inhibidores de proteasas PhosSTOP EASA pack (Roche) a -70°C, para la posterior obtención de extractos proteicos

Análisis histopatológicos

Las muestras de tejido fijadas en paraformaldehído se deshidrataron usando concentraciones crecientes de alcoholes (desde 50% hasta alcohol absoluto) (Anexo 2), y se incluyeron en parafina, para después realizar cortes histológicos de 5 µm en láminas seriadas con un micrótopo (Leica). Se realizaron tinciones con Hematoxilina y Eosina en las laminillas de los intestinos de la parte media y distal (Anexo 3). El grado de deformación presente en los tejidos de cada grupo fue determinado con un microscopio de luz.

Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para la realización de la técnica de ELISA se utilizaron las muestras de tejido tumoral obtenidos a partir de los intestinos disectados.

Las muestras de suero sanguíneo fueron descongeladas a temperatura ambiente y se utilizaron sin dilución. Las muestras de tejido previamente guardadas en buffer de RIPA con inhibidores de proteasas, fueron colocadas en hielo y se les dejó descongelar en agitación en un agitador automático (LabNet, Rocker 25). Una vez descongeladas, se centrifugaron durante 5 minutos a 8000 rpm y el sobrenadante fue utilizado sin diluciones para la técnica de ELISA.

Se utilizó una placa de 96 pozos (Termo Fisher, Maxisorp) y el kit DuoSet ELISA (R&D Systems) (Anexo 4). Se utilizaron anticuerpos específicos contra MIF y se procedió a cuantificar su concentración en suero y en el extracto proteico de tejido tumoral en un equipo Epoch (Biotek), cuantificando a una longitud de onda de 405 nm, extrapolando los resultados con una curva de concentraciones ya conocidas de MIF.

Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Las muestras de tejido almacenadas en TRIzol fueron descongeladas a temperatura ambiente, y se realizó la extracción de mRNA con la técnica de cloroformo e isopropanol (Anexo 5). Se cuantificó y se ajustó la concentración de las muestras a 1000 ng/μl para su posterior conversión en cDNA con el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Termo Fisher) y se utilizó el kit RNAqueous Micro Total RNA Isolation Kit (Invitrogen), en ambos casos siguiendo sin modificaciones las instrucciones del fabricante.

Una vez obtenido el cDNA se ajustaron todas las muestras a una concentración de 1000 ng/μl, antes de realizar la técnica de PCR (Anexo 7) utilizando un Termociclador (BIOER, XP cyler). Se realizó la amplificación de los transcritos de los genes β -actina, TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-1 β , IL-12, TLR2, TLR4 y MIF; con el uso de primers específicamente diseñados (Sigma) (Tabla 2).

Se usó β -actina como control de carga de un gen de mantenimiento. Las muestras se corrieron en geles de Agarosa (Clever Scientific Ltd) al 2%, junto con un marcador de peso molecular (*Fermentas SO-1333*). Los geles se analizaron por densitometría con el programa Image Lab (Bio-Rad), y se obtuvo el índice relativo de expresión utilizando el control β -actina como estándar de referencia.

Tabla 2. Secuencias de primers

Primers utilizados durante este modelo. Se muestran las secuencias así como el tamaño del producto y la temperatura optima de alineamiento

Blanco	Secuencia	Temperatura	Tamaño del producto
β -actina	F-ACTGTGCCCATCTACGAGG R-AGGGAAAATCGTGCGTGACAT	60 °C	514 pb
TNF- α	F-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC R-ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCG	59 °C	307 pb
IFN- γ	F- AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG R-GTCACAGTTTTTCAGCCTGTATAGGG	57 °C	243 pb
IL-10	F-ACCTGGTAGAAGTGATGCCCCAGGCA R-CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAA	56 °C	237 pb
IL-4	F-CGAAGAACACCACAGAGAGTGAGCT R-GACTCATTCATGGTGCAGCTTATCG	58 °C	180 pb
IL-1 β	F-GAGTGTGGATCCCAAGCAAT R-CTCAGTGCAGGCTATGACCA	59 °C	520 pb
IL-12	F-GGAGACCCTGCCATTGAACT R-CAACGTTGCATCCTAGGATCG	56 °C	421 pb
TLR2	F-GTCTCTGCGACCTAGAAGTGGA R-CGGAGGGAATAGAGGTGAAAGA	63 °C	336 pb
TLR4	F-AGCAGAGGAGAAAGCATCTATGA R-GGTTTAGGCCCCAGAGTTTTGTT	68 °C	539 pb
MIF	F-GGACCGGGTCTACATCAACT R- CTCAAAGAACAGCGGTGCAG	59 °C	109 pb
16S región V3 y V4	F- TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGA CAGCCTACGGGNGGCWGCAG R- GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAG ACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC	60°C	550 pb

Preparación de las bibliotecas para la secuenciación masiva en paralelo

Para este análisis se dividieron las muestras de heces obtenidas en distintos puntos del modelo en los grupos mostrados en la tabla 3.

Tabla 3. Asignación de nuevos grupos para la secuenciación masiva en paralelo

En la siguiente tabla se muestra la nomenclatura de las diferentes muestras para la realización de la secuenciación masiva en paralelo. Se puede ver el nuevo nombre asignado a los grupos, así como la letra asignada para facilitar la metodología. La tabla también nos señala el bioterio de procedencia de los ratones (FESI y Harlan), si los grupos recibieron tratamientos con antibióticos o no, el genotipo que presentan los ratones además del genotipo del cual procede la microbiota trasplantada y finalmente el momento en el cual se recolectaron las muestras fecales (**T0 = Antes de la inducción con AOM T1 = Después de la inducción con AOM, al día 0 T2 = Final del modelo, al día 68 de la inducción**).

Grupo	Muestra	Procedencia	Antibiótico	Genotipo	Trasplante de Microbiota	Tiempo
FES WT T0	A	FESI	No	WT	No	T0
	B	FESI	No	WT	No	T0
FES <i>mif</i>^{-/-} T0	C	FESI	No	<i>mif</i> ^{-/-}	No	T0
	D	FESI	No	<i>mif</i> ^{-/-}	No	T0
FES WT T2	E	FESI	No	WT	No	T2
	F	FESI	No	WT	No	T2
	G	FESI	No	WT	No	T2
FES <i>mif</i>^{-/-} T2	H	FESI	No	<i>mif</i> ^{-/-}	No	T2

	I	FESI	No	<i>mif</i> -/-	No	T2
	J	FESI	No	<i>mif</i> -/-	No	T2
H WT con/ant T0	K	Harlan	Si	WT	No	T0
	L	Harlan	Si	WT	No	T0
	M	Harlan	Si	WT	No	T0
H WT sin/ant T0	O	Harlan	No	WT	No	T0
H WT con micro WT T1	P	Harlan	Si	WT	WT	T1
	Q	Harlan	Si	WT	WT	T1
	R	Harlan	Si	WT	WT	T1
H WT con micro <i>mif</i> -/- T1	S	Harlan	Si	WT	<i>mif</i> -/-	T1
	T	Harlan	Si	WT	<i>mif</i> -/-	T1
	U	Harlan	Si	WT	<i>mif</i> -/-	T1
H WT con micro WT T2	V	Harlan	Si	WT	WT	T2
	W	Harlan	Si	WT	WT	T2
	X	Harlan	Si	WT	WT	T2
H WT con micro <i>mif</i> -/- T2	Y	Harlan	Si	WT	<i>mif</i> -/-	T2
	Z	Harlan	Si	WT	<i>mif</i> -/-	T2
	α	Harlan	Si	WT	<i>mif</i> -/-	T2

Se obtuvieron muestras de ADN bacteriano a partir de las heces previamente recolectadas durante el modelo. Para la extracción se utilizó un pellet fecal completo y el kit DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) (Anexo 8). Las muestras obtenidas fueron tratadas con RNAsa (Thermo Fisher) y se purificaron con la ayuda del kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). La integridad del ADN obtenido se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 0.8% observados en un fotodocumentador (Bio-Rad), en los mismos se cuantificó su concentración por densitometría utilizando el programa Image Lab, y por medio de fluorimetría con un equipo Qubit (Thermo Fisher) y el kit Qubit dsDNA HS Assay Kit.

Las muestras que lo requirieron fueron concentradas con un equipo miVac Centrifugal Concentrators (Genevac) o diluidas a la concentración de 5 ng/μl. Para la reacción de PCR se utilizaron primers degenerados dirigidos a la región hipervariable V8 de la porción 16S del ribosoma bacteriano (T4 Oligo) (tabla 4) y el kit GoTaq Green Master Mix (Promega).

Los productos de PCR fueron tratados con perlas magnéticas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) para asegurar su pureza, que se usaron en conjunto con una placa DynaMag-96 Side Magnet (ThermoFisher Scientific) (Anexo 10).

Una vez purificadas los productos de PCR, se utilizó el kit Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) junto con los adaptadores Index 1 adapters (N7XX) e Index 2 adapters (S5XX) (Illumina) y la polimerasa KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche), para la amplificación de las bibliotecas. Las muestras fueron incubadas en un termociclador con el fin de amplificar las bibliotecas. Posteriormente se limpiaron las mismas con perlas AMPure XP y etanol.

Para verificar que las bibliotecas no tuvieran residuos de primers, las muestras fueron analizadas con un chip de alta sensibilidad a DNA en el equipo y el programa de Agilent Technology 2100 Bioanalyze. Posteriormente la concentración de las bibliotecas fue normalizada a fin de obtener soluciones equimolares, esto llevado a través de cálculos basados en la concentración, el peso atómico de los nucleótido y el tamaño de los productos que fueron generados. Una vez obtenido el peso

molecular de los productos obtenidos a través del PCR, estos se transforman a nMol. A través de la fórmula $nM = (\text{concentración ng}/\mu\text{l}) (\text{mol/producto ng}) (1 \times 10^6)$ y posteriormente se llevó al volumen deseado a partir de la fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$. La secuenciación se realizó en un equipo MiSeq (Illumina).

Análisis bioinformático

Para obtener datos bioinformáticos de alta calidad y precisión, utilizamos secuencias efectivas obtenidas a partir de la secuenciación de nuestras muestras bacterianas las cuales se procesaron con el programa Qiime, versión 1.9.1 (<http://qiime.org/>) las cuales se agruparon en unidades taxonómicas operacionales (OTU) utilizando Usearch (versión 11 <http://qiime.org/>) con un criterio de mínima similitud de 97%. Las secuencias quiméricas creadas por la amplificación del PCR fueron detectadas y excluidas de los OTUs. Para la identificación taxonómica, las secuencias de OTUs representativas fueron alineadas contra una colección de secuencias de referencia asociada a un árbol taxonómico (Greengenes), específica para muestras de heces de ratón, y cuantificadas. Solo fueron considerados para el análisis los OTUs con al menos un 95% de similitud a la referencia. Además, las matrices de distancia ponderadas y no ponderadas se utilizaron para el análisis de coordenadas principales (PCoA) para visualizar la matriz transformada a partir de datos multidimensionales complejos.

RESULTADOS

La transferencia de microbiota se encuentra relacionada con el aumento de peso de los ratones durante el modelo

La pérdida de peso es un síntoma clínico bastante común durante el desarrollo del cáncer de colon, esto asociado generalmente a la mala absorción de los nutrientes, y/o a la diarrea presente. En la Figura 7 se muestra el cambio de peso de los ratones durante el desarrollo del modelo.

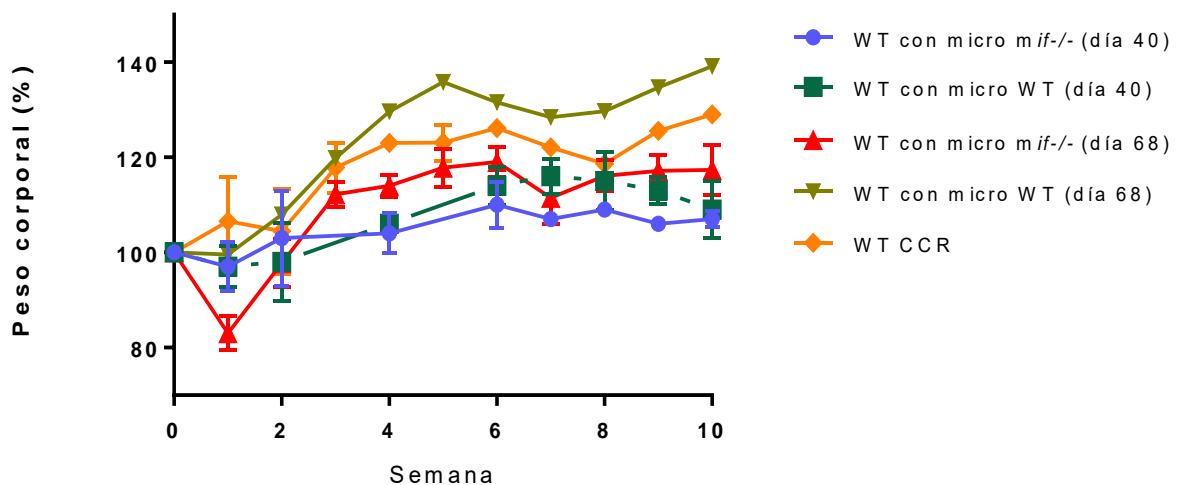


Figura 7. Comparación del porcentaje de peso

Días transcurridos del tratamiento junto con el porcentaje en el cambio de peso. Tomamos el peso inicial del día 0 como el 100%. Datos de 2 experimentos n=1-3

Los dos experimentos realizados mostraron un aumento en el peso de los ratones, esto en comparación con el valor inicial. En el modelo de 40 días, los ratones con microbiota perteneciente a WT tuvieron un aumento de peso casi constante durante las primeras semanas del modelo, que posteriormente fueron perdiendo de forma gradual a partir de la semana 8. Por su parte el grupo con microbiota perteneciente a *mif*^{-/-}, tuvo un aumento de peso hasta la semana 6, a partir de la cual se mantuvo

casi constante, con repentinos aumentos y disminuciones en el peso de los ratones durante cada semana, pero de pequeños intervalos. Casi al finalizar el experimento se observó en algunos ratones sangrado rectal y diarrea.

Los grupos del segundo experimento mostraron una mayor tendencia a subir el porcentaje de masa corporal y mantenerlos, a pesar de presentar los síntomas clínicos que se asocian generalmente a las pérdidas de peso. Se registró en alrededor de 3 ratones de los grupos WT con micro WT y WT con micro *mif*^{-/-} la aparición de prolapsos rectales a partir del día 54 posterior a la inducción, en conjunto con el aumento del sangrado rectal.

Los ratones con microbiota procedente de ratones *mif*^{-/-} presentan menor número de tumores

Al finalizar cada modelo los ratones fueron sacrificados en cámara de CO², se removió el intestino grueso de cada ratón y se registró el largo de cada uno de ellos antes de retirar el ciego gástrico.

Durante el primer experimento el tamaño de los intestinos, no mostró grandes cambios entre los grupos, donde la longitud osciló entre 8 y 9 cm aproximadamente.

Como podemos observar en la Figura 8 el largo de los intestinos entre los grupos del primer experimento fueron de aproximadamente 8.8 cm. El grupo WT con micro WT presenta una longitud de 8.87 cm al final del segundo experimento, mientras que los ratones que recibieron microbiota de los organismos *mif*^{-/-} presentaron un acortamiento de 2.2 cm en comparación con los últimos. Es importante mencionar que el grupo que únicamente recibió la inducción con AOM, tuvo una reducción en la longitud del intestino midiendo aproximadamente 5.8 cm.

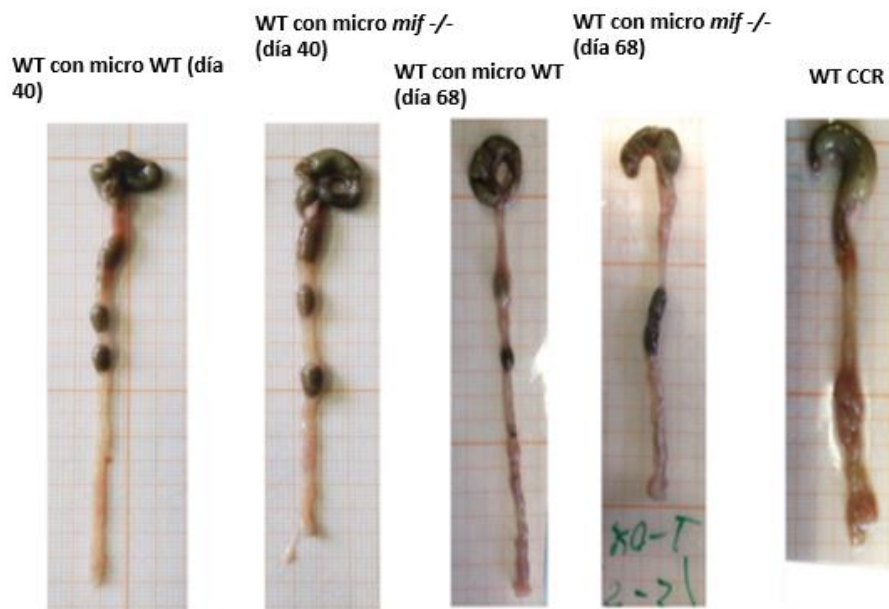
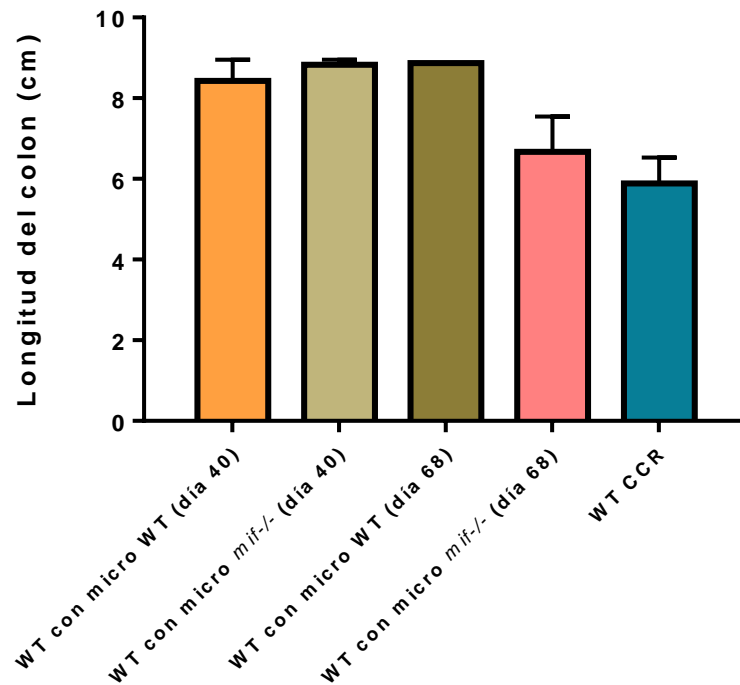


Figura 8. Longitud de los intestinos

A) Promedio y error estándar (ES) del largo de los intestinos en nuestros grupos experimentales. B) Fotografía representativa del tamaño de los intestinos. Datos de dos experimentos n=1-3

Una vez extraídos los intestinos, se cortaron longitudinalmente para realizar el conteo de tumores de cada uno. En la figura 9 (A) podemos ver el número de tumores en el intestino por grupos. También es posible observar el volumen de cada tumor por grupo (B). Finalmente también se muestra la carga tumoral obtenida a partir de cada intestino analizado (C).

El grupo WT con micro *mif*^{-/-} presentó el menor número de tumores durante los 2 experimentos, pero de mayor tamaño que los WT con micro WT, con diferencias estadísticamente significativas en el día 68 al ser comparado con el grupo WT CCR (Figura 9. C)). Respecto a la carga tumoral, donde podemos ver la distribución del volumen de todos los tumores, el grupo WT CCR al día 68 presenta un elevado crecimiento de los tumores en comparación con los demás grupos, mientras que los grupos WT con micro *mif*^{-/-} muestran un ligero aumento en la carga en comparación con los receptores de microbiota WT.

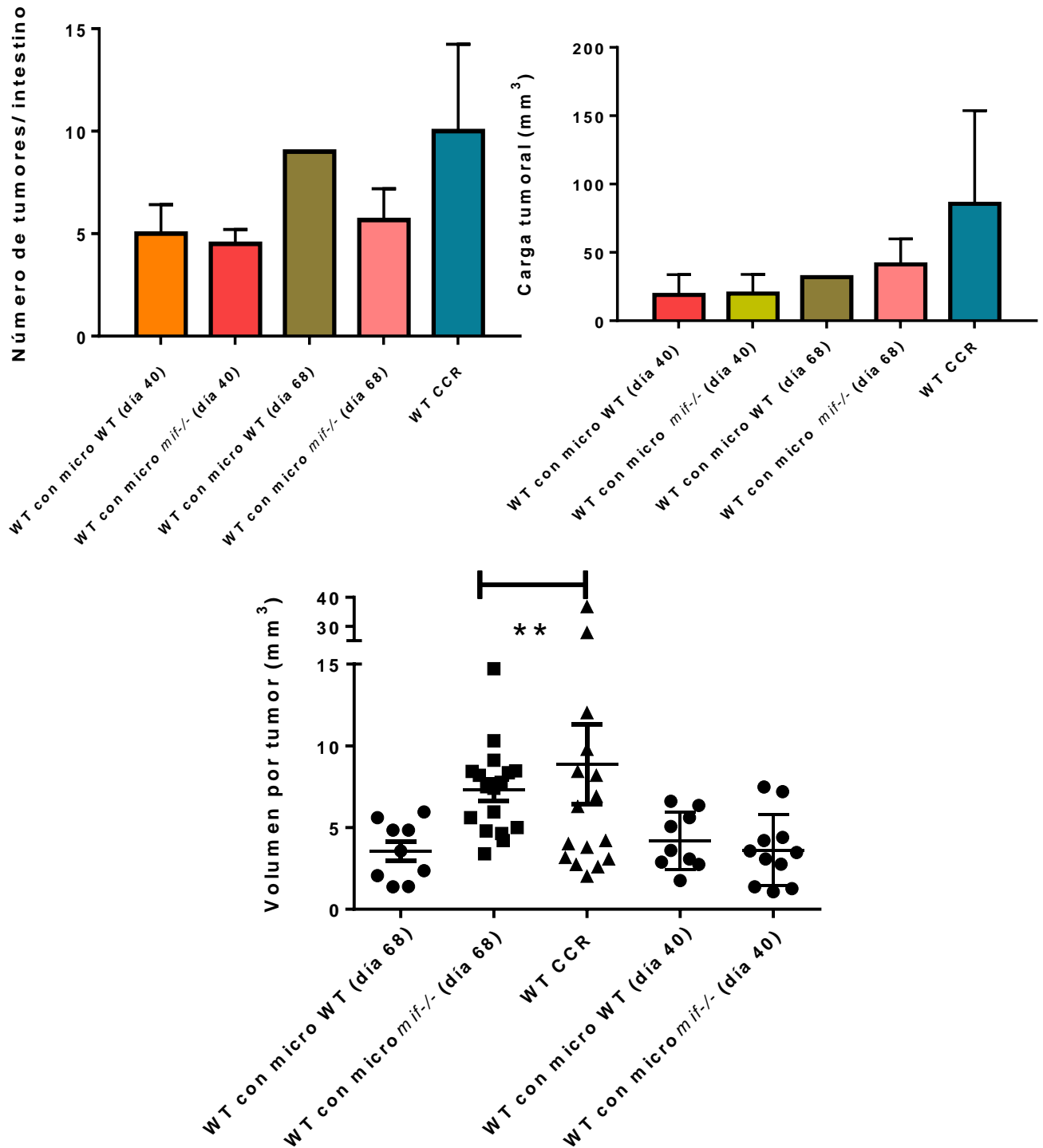


Figura 9. Carga tumoral de los ratones con microbiota procedente de ratones WT y *mif*^{-/-}

A) Promedio de número tumores formados en el intestino B) Volumen en mm³ del total de los tumores formados en los intestinos C) Volumen en mm³ de cada uno de los tumores presentes en los intestinos de los grupos inducidos *P<0.05, prueba t-student, GraphPad Prism 6. Datos de 2 experimentos n=1-3

Determinación de MIF en tejido tumoral

Se cuantificó la producción de MIF en tejido intestinal (Figura 10), se utilizaron las muestras de tumor previamente preservadas en buffer de RIPA.

La producción de MIF en tejido tumoral mostro los niveles más elevados en los grupos WT con micro *mif*^{-/-} al día 40 y 68. El valor más elevado lo presento el grupo al día 40, el cual tuvo un valor medio de 10300 pg/ml aproximadamente, mientras que los grupos WT con micro WT y WT CCR tuvieron los valores más bajos, cercanos a los 4200 pg/ml.

Los resultados nos muestran una tendencia a la disminución de los niveles de MIF, esto conforme al desarrollo del modelo.

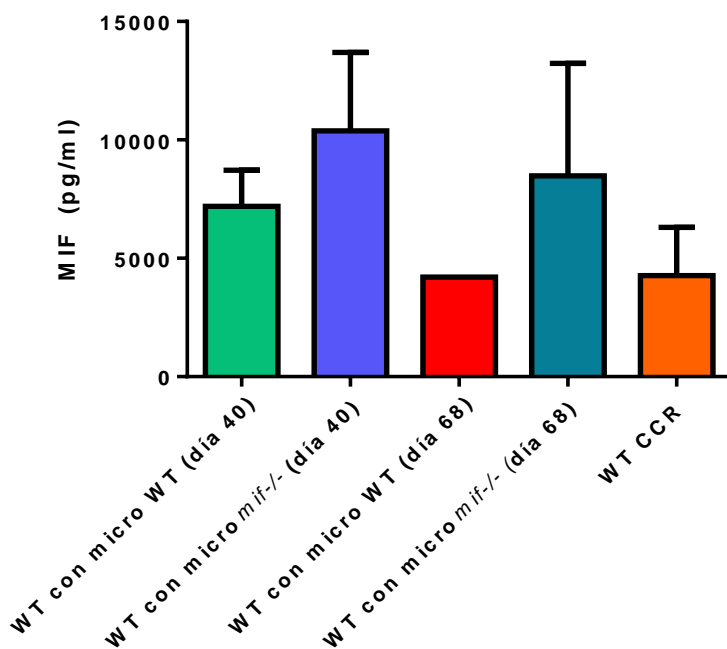


Figura 9. Producción de MIF en tejido tumoral

Niveles de MIF en pg/ml producidos en el tejido tumoral de los ratones durante los dos experimentos realizados. Se pueden observar a los grupos con microbiota procedente de ratones *mif*^{-/-} como los mayores productores de esta citocina. Datos obtenidos de 2 experimentos n=1-3

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

Se realizó la determinación de transcritos de los genes de algunas citocinas para nuestros grupos del segundo experimento, al día 68. (Figura 11 y 12) (β -actina, TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-1 β , IL-12, MIF, TLR2 y TLR4) a partir de la técnica de RT-PCR.

Estos resultados muestran una mayor sobre-expresión en los transcritos de citocinas pro-inflamatorias pertenecientes al grupo WT con micro *mif*^{-/-} en comparación con el grupo WT con micro WT, a excepción de la citocina IL-1 β la cual se observó más elevada en el grupo WT con micro WT.

En cuanto a la amplificación de transcritos de los receptores TLR2 y TLR4 en el caso del grupo WT con micro *mif*^{-/-} TLR2 se encuentra sobre-expresada en comparación con el grupo WT con micro WT, mientras que sucede justamente lo contrario para el caso de TLR4.

Sin embargo la expresión de la gran mayoría de las citocinas y de los receptores TLR2 Y TLR4 se vieron mayormente aumentadas en el grupo WT CCR, a excepción de IL-4 e IL-10 donde el grupo WT con micro *mif*^{-/-} señaló una mayor expresión de los transcritos.

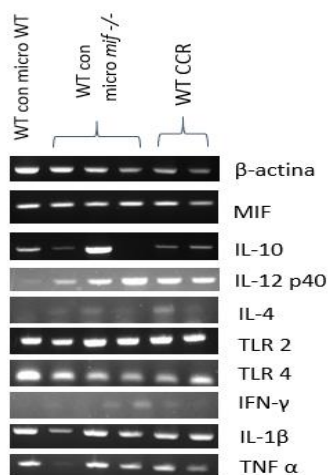
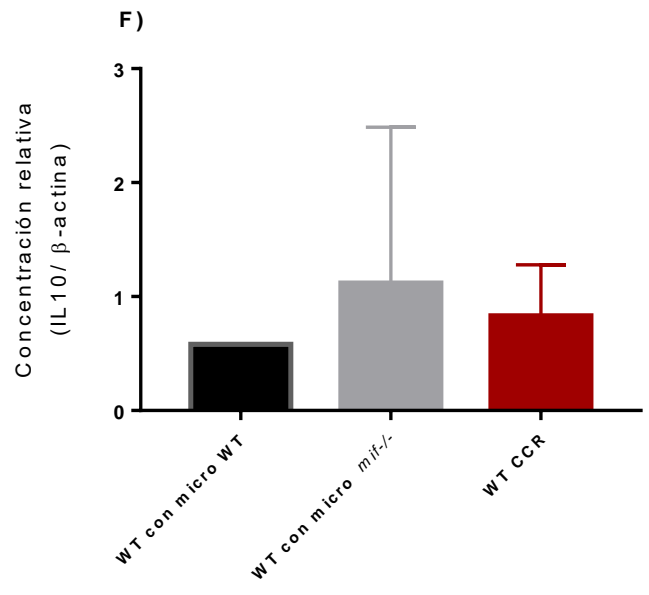
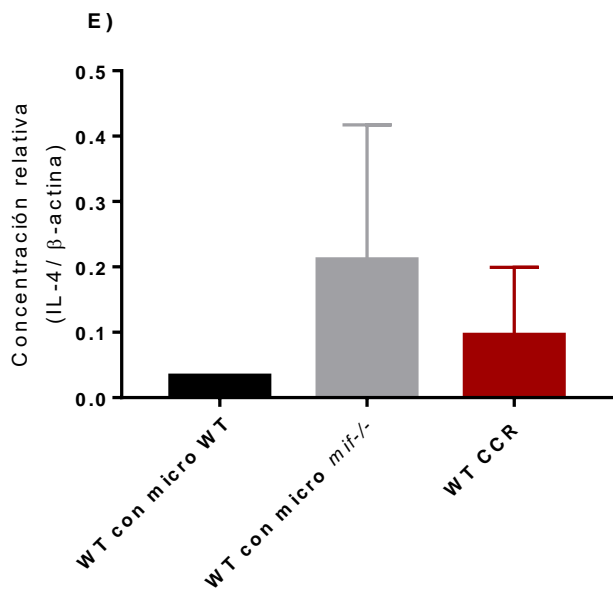
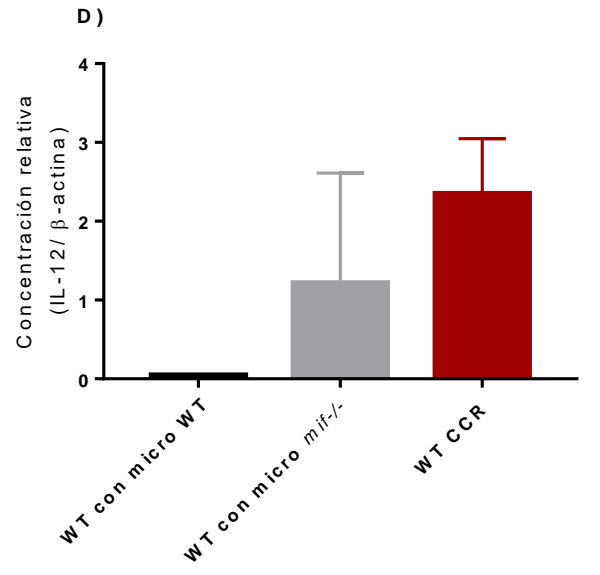
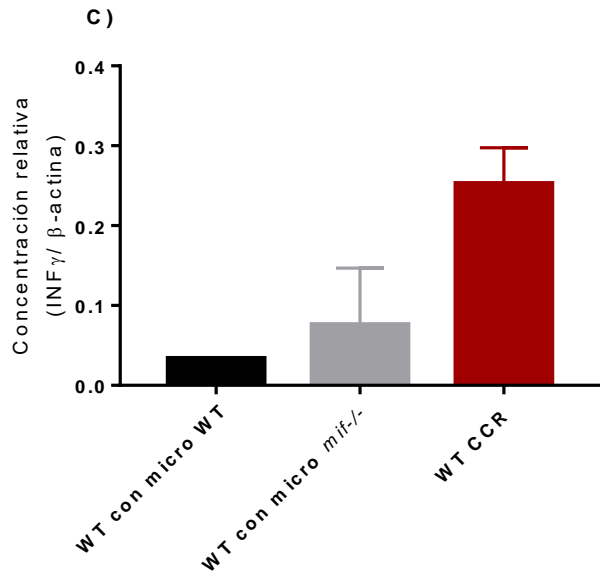
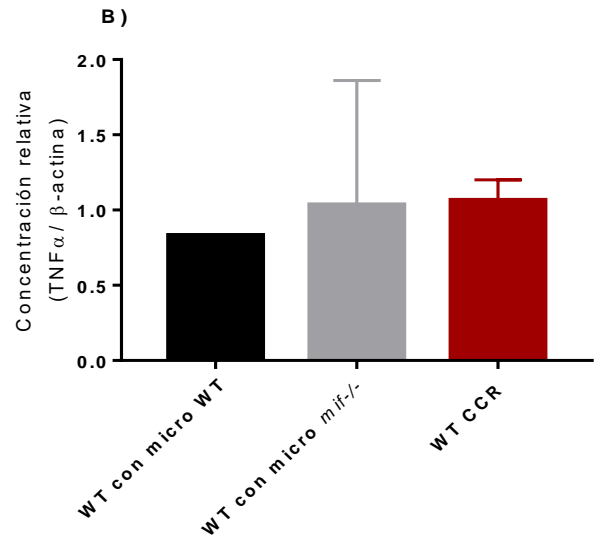
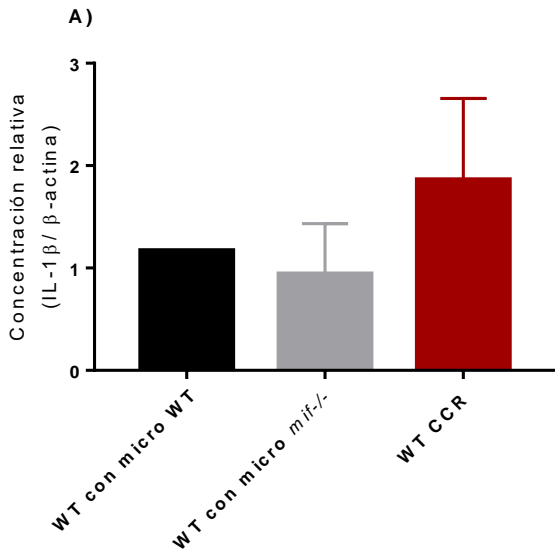


Figura 10. Transcritos de genes de citocinas

Gel de agarosa al 2% que muestra la amplificación de las bandas para cada citocina evaluada, se muestran nuestros grupos con transferencia de microbiota al día 68 al final del modelo experimental, así como nuestro grupo control el cual también fue sometido al modelo de AOM/DSS. Datos de un experimento n=1-3



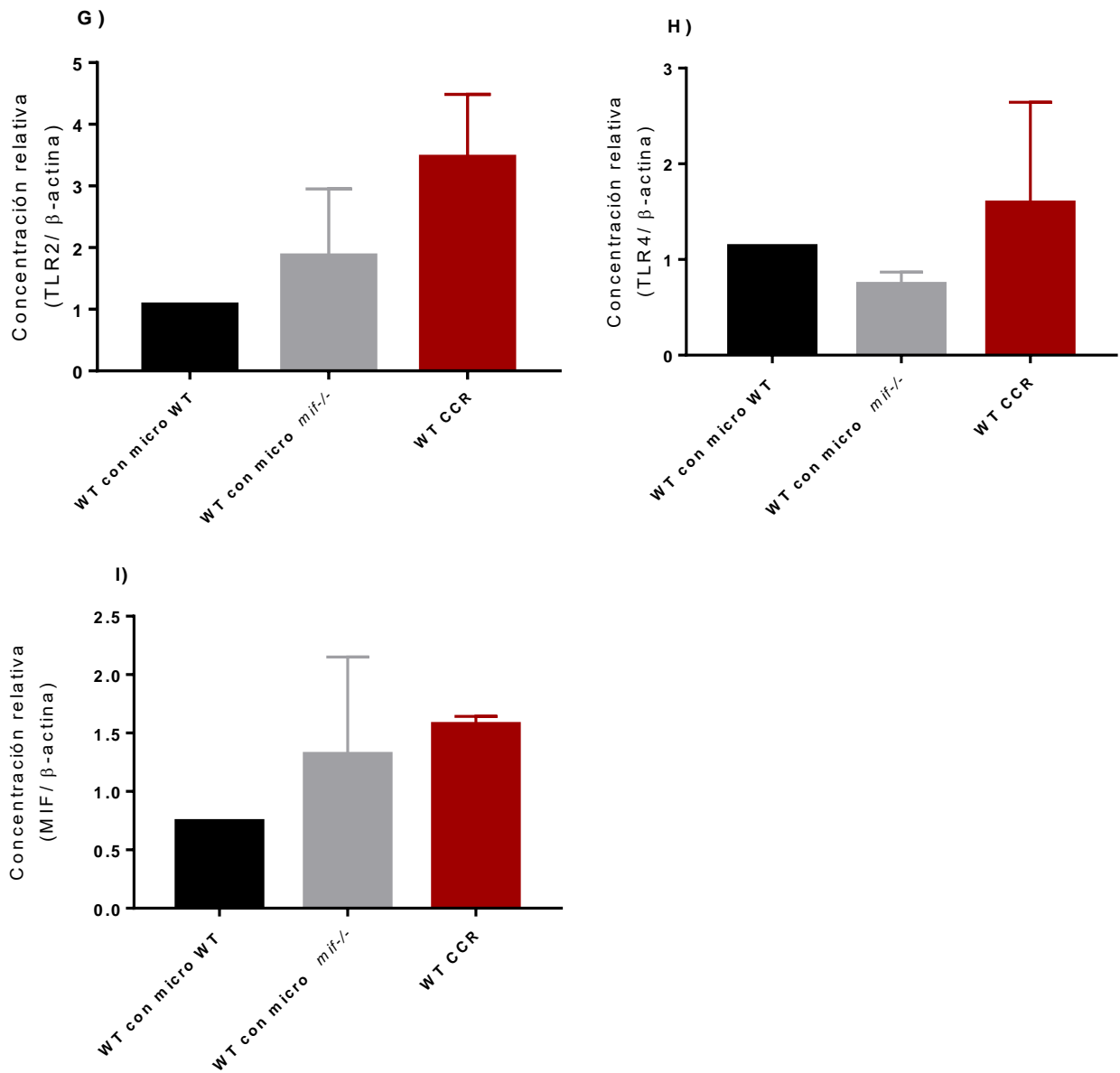


Figura 11. Expresión relativa de las citocinas, en relación a β -actina

Las columnas representan la relación de la Expresión relativa de los transcritos para; A) IL-1 β , B) TNF- α , C) IFN- γ , D) IL-12, E) IL-4, F) IL-10, G) TLR2, H) TLR4 I) MIF; comparadas contra el gen β -actina. Las muestras obtenidas provienen de nuestros grupos del segundo experimento al final del modelo (día 68). Datos de 1 experimento n=1-3

Análisis histológico de los tumores

Para conocer el daño celular a nivel morfológico se realizaron tinciones de Hematoxilina-Eosina (H&E). En ambos experimentos se evaluó la presencia del infiltrado celular, así como el daño al epitelio intestinal y las deformaciones asociadas (Figura 13).

Los ratones al término del primer experimento no mostraron alteraciones significativas a nivel tisular, si bien es posible observar infiltrado celular y atipias de bajo grado en las criptas; el musculo, la submucosa y el epitelio aún conservan la estructura morfológica normal del intestino. También es posible ver en los grupos WT con micro WT y WT con micro *mif*^{-/-}, zonas con alta concentración celular, en las criptas, donde posiblemente exista una mayor tasa de proliferación celular.

Para el día 68 post- inducción la morfología y estructura que presenta el intestino muestra un ligero aumento en cuanto a daño se refiere, encontrando mayor infiltrado y transformación en la morfología de las células. También es posible observar en ambos grupos señales de angiogénesis como son los vasos capilares, aunque al igual que en el día 48, los grupos no muestran diferencias estructurales significativas entre ellos, siendo muy similares en cuanto a morfología se refieren.

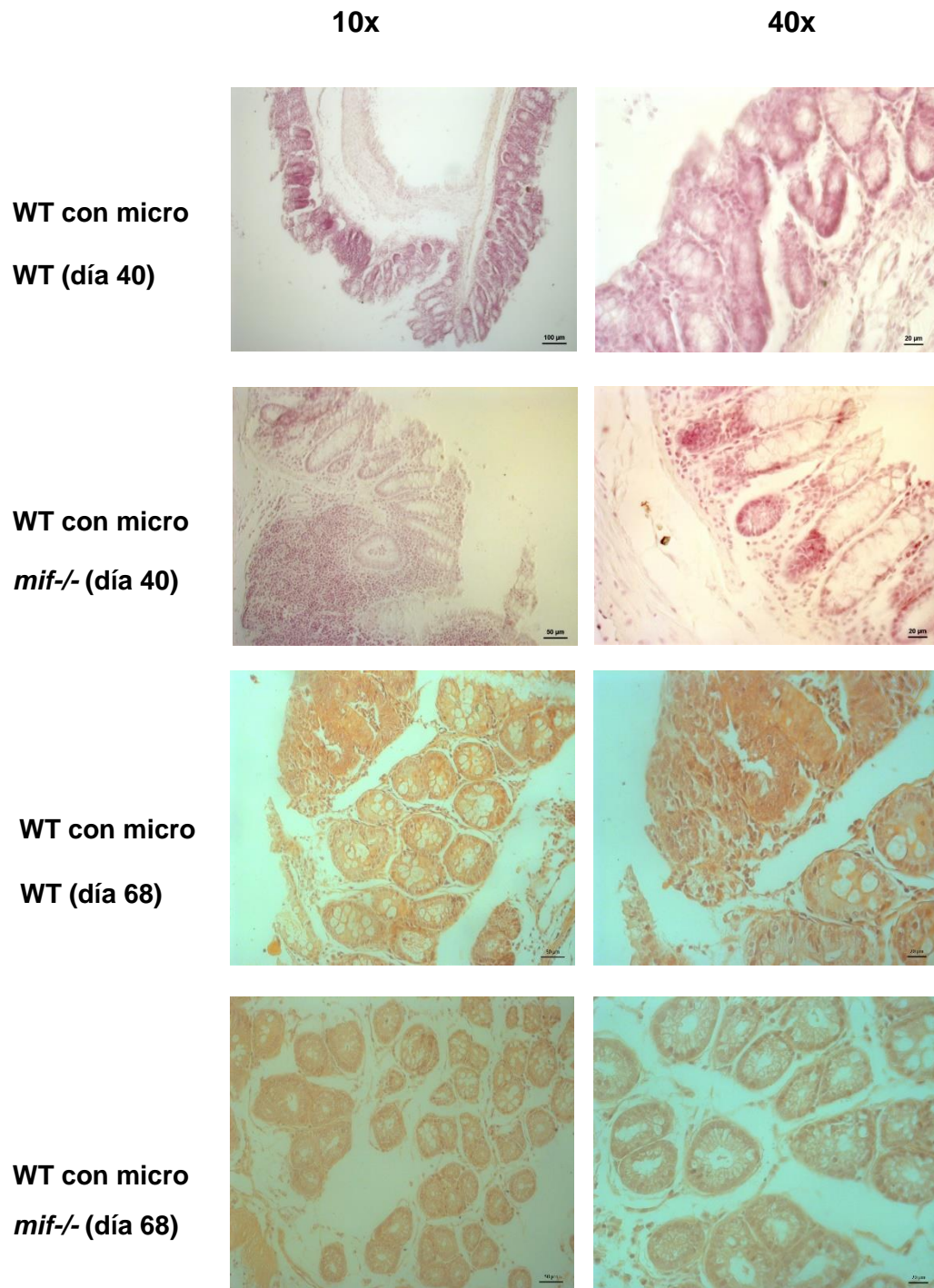


Figura 12. Cortes histológicos de los intestinos

Cortes histológicos de 5 μm en aumentos de 20x y 40x donde se observa la morfología y estratificación del intestino. Datos de 2 experimentos n=1-3

Análisis bioinformático

Se leyeron un total de 401097 unidades taxonómicas operativas (OTUs) a partir del conjunto de datos de las secuencias de alta afinidad de 12 de las bibliotecas que se procesaron. A partir de esto se lograron identificar 34 géneros, 26 familias, 16 órdenes, 14 clases y 8 phyla todos pertenecientes al dominio Bacteria, de los cuales los filos Bacteroidetes y Firmicutes fueron los más representativos y presentes en todas las muestras. Los phyla Actinobacteria y Cyanobacteria fueron los menos representativos, al presentarse en un porcentaje mayor al 0.5% en solo una muestra y con un valor cercano al 1%.

A continuación se muestran el número de secuencias totales y filtradas que se obtuvieron a partir de la alineación y procesamiento de los datos de cada muestra, así como el porcentaje en términos de abundancia de cada filo presente en dichas muestras.

Tabla 4. Número de secuencias analizadas

Total de secuencias analizadas por cada muestra y el porcentaje de la población bacteriana que representa cada filo identificado. El linaje que actualmente es considerado candidato a división también es conocido como *Saccharibacteria*

ID	Grupo	Total secuencias	Pareadas	Actinobacteria	Bacteroidetes	Cyanobacteria	Deferribacteres	Firmicutes	Proteobacteria	TM7	Tenericutes
O	HWT	34764	30644	0	60	0	0	40	0	0	0
K	HWT	35099	30034	0	87	0	0	12	1	0	0
I	FESMif	39657	34892	0	60	0	0	34	5	1	0
A	FESWT	29189	25942	0	87	0	0	13	0	0	0
E	FESWT	37825	34237	1	45	0	0	51	0	3	0
D	FESMif	46184	41220	0	65	1	0	30	2	0	2
Z	HWT	42253	39192	0	71	0	0	26	0	3	0
Q	HWT	36501	32435	0	65	0	1	30	0	4	0
Y	HWT	35658	30738	0	80	0	0	19	0	1	0
S	HWT	33942	29295	0	79	0	0	19	2	0	0
T	HWT	40284	34366	0	73	0	0	22	2	3	0
V	HWT	43055	38102	0	30	0	2	61	7	0	0

Es posible observar como los diferentes grupos que se formaron poseen una proporción de *Bacteroidetes* mayor a la de *Firmicutes* durante el desarrollo del experimento a excepción de las muestras E y V (FES-WTT2 y HWT con microWTT2) donde sucede lo contrario.

La mayor proporción de organismos se encontró en la familia de bacterias S24-7 perteneciente al orden de los *Bacteroidales*, el cual no ha sido del todo bien caracterizado, poseyendo una gran cantidad de especies bacterianas aun no clasificadas, de las cuales muchas no son cultivables.

A parte de esto, los datos generados nos permitieron realizar un análisis de coordenadas principales PCoA (Figura 17), el cual se observa en las gráficas 2D y 3D la similitud y desigualdad entre nuestras muestras. La muestra más desigual es la V perteneciente al grupo H-WT con micro WT T2 además de las muestras E, I y K pertenecientes a FES WT T2, FES *mif*^{-/-} T2 y H-WT con/ant T0 respectivamente.

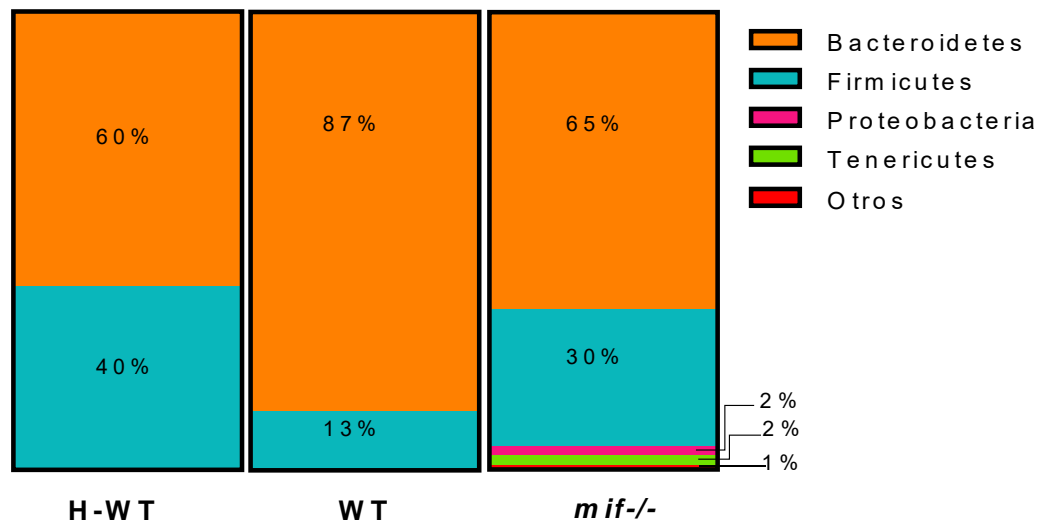


Figura 13. Microbiota intestinal no modificada

Se muestra el porcentaje de bacterias clasificada por phylum característico de cada grupo de ratones BALB/c. H-WT= Ratones *wild type* provenientes de la empresa Harlan. WT= Ratones *wild type* provenientes del bioterio de la FES-Iztacala. *mif*^{-/-} = Ratones MIF *knock out* provenientes del bioterio de la FES-Iztacala.

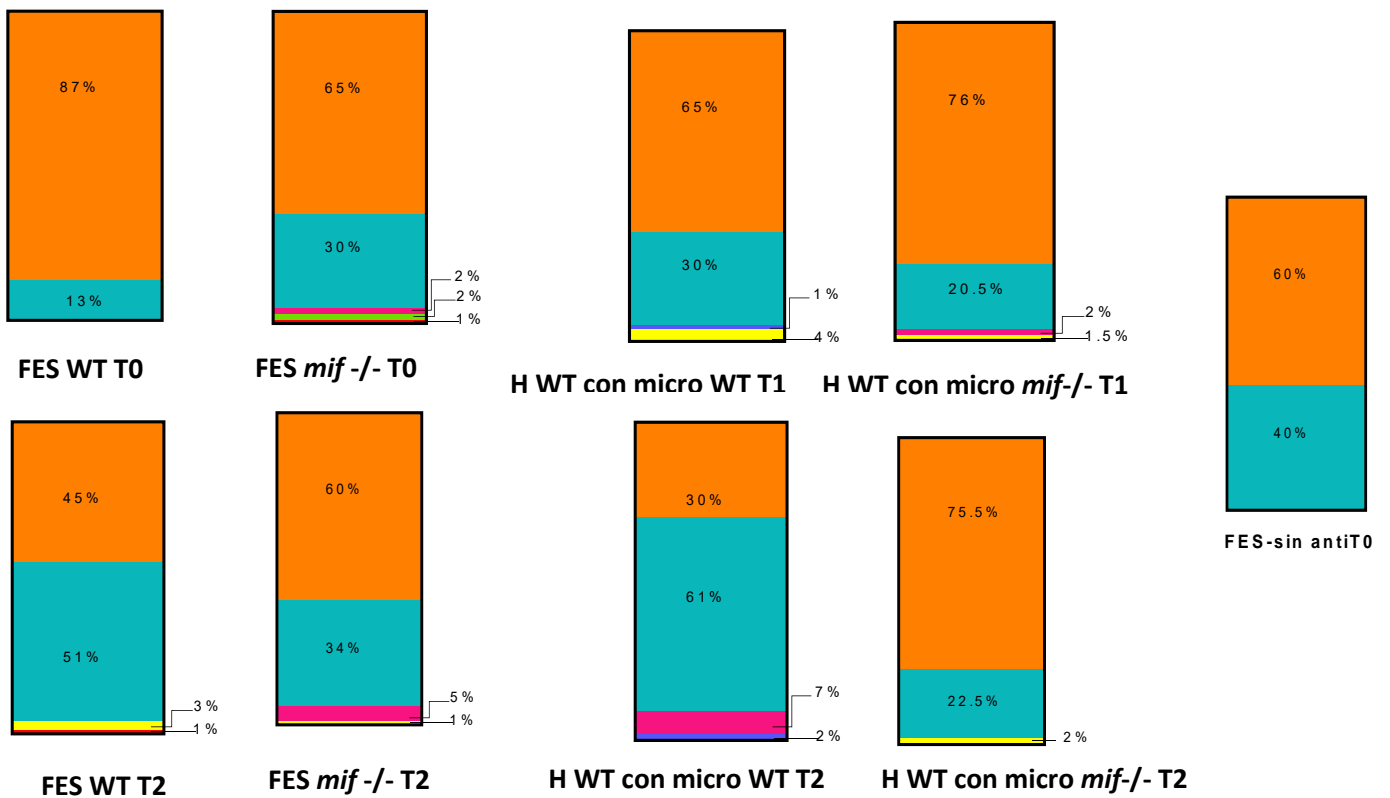
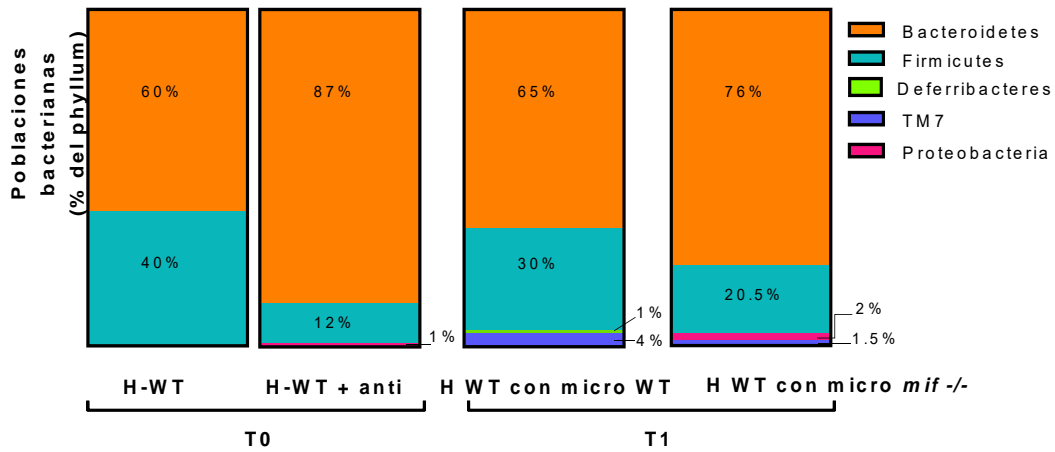
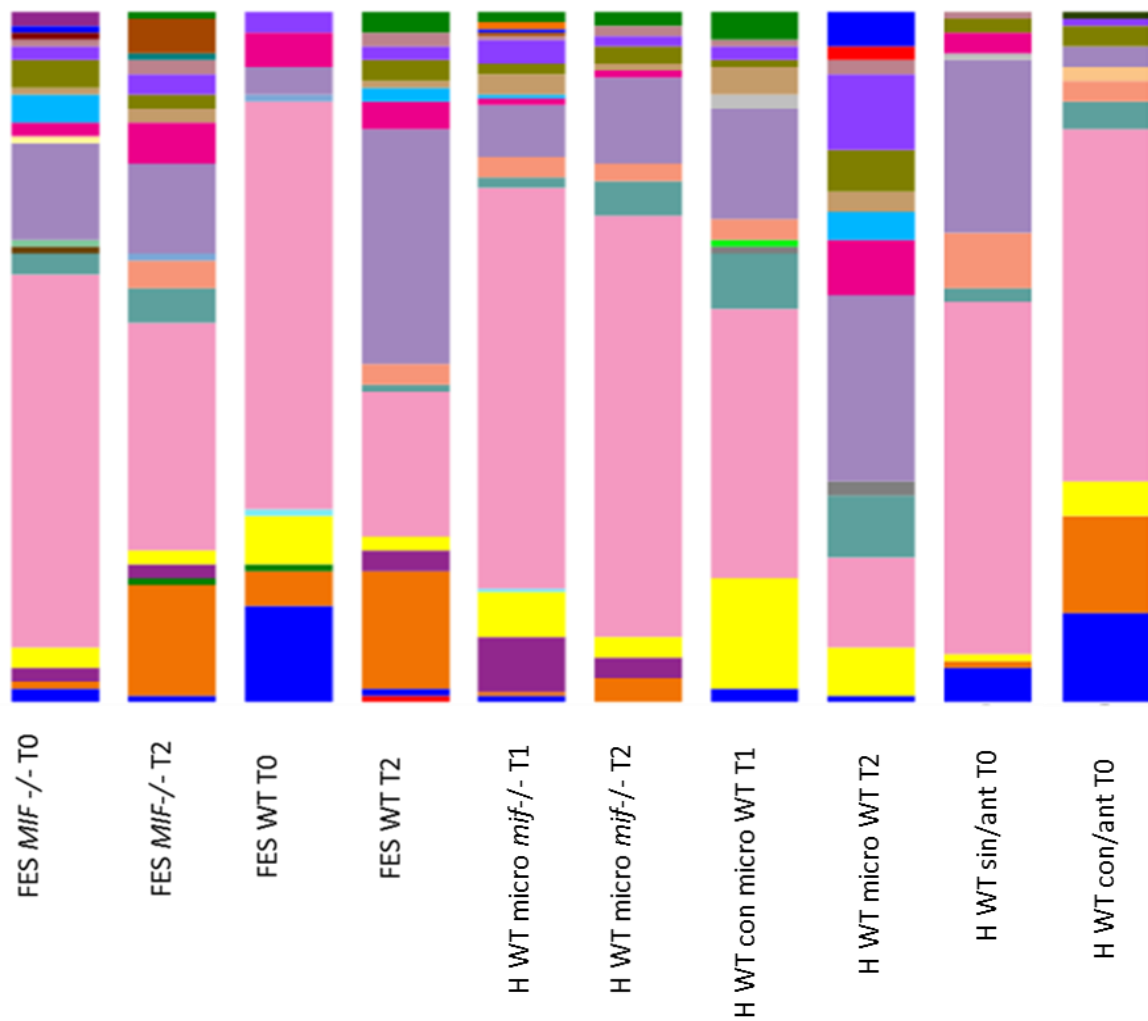


Figura 14. Microbiota intestinal modificada.

Se muestra el porcentaje de bacterias clasificada por phylum característico de cada grupo de ratones BALB/c durante diferentes periodos durante el modelo experimental

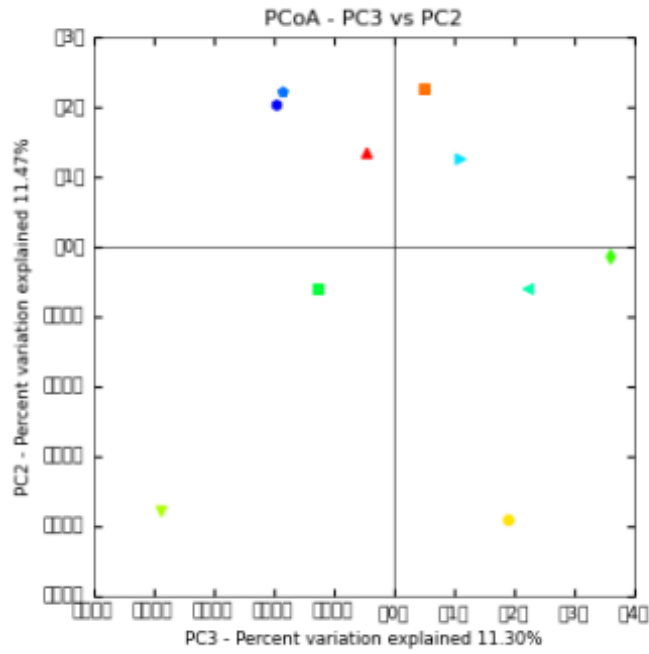


- k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Corobacteria;o_Corobacteriales;f_Corobacteriaceae;g_Adiercreutzia
- k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_;
- k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Bacteroidaceae;g_Bacteroides
- k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Porphyrionadaceae;g_Parabacteroides
- k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Prevotellaceae;g_Prevotella
- k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Rikenellaceae;g_
- k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_Rikenellaceae;g_AF12
- k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_S24-7;g_
- k_Bacteria;p_Bacteroidetes;c_Bacteroidia;o_Bacteroidales;f_[Odoribacteraceae];g_Odoribacter
- k_Bacteria;p_Cyanobacteria;c_4C0d-2;o_Y52;f_;
- k_Bacteria;p_Deferribacteres;c_Deferribacteres;o_Deferribacterales;f_Deferribacteraceae;g_Mucispinnulum
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Bacillales;f_Staphylococcaceae;g_Staphylococcus
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Lactobacillaceae;g_Lactobacillus
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Streptococcaceae;g_Lactococcus
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Lactobacillales;f_Streptococcaceae;g_Streptococcus
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Bacilli;o_Turicibacterales;f_Turicibacteraceae;g_Turicibacter
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_;
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridiaceae;g_
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Clostridium
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_Coproccoccus
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Lachnospiraceae;g_[Ruminococcus]
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Oscillospira
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Clostridia;o_Clostridiales;f_Ruminococcaceae;g_Ruminococcus
- k_Bacteria;p_Firmicutes;c_Erysipelotrichi;o_Erysipelotrichales;f_Erysipelotrichaceae;g_
- k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_RF32;f_;
- k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_Alcaligenaceae;g_Sutterella
- k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Desulfovibrionales;f_Desulfovibrionaceae;g_
- k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Deltaproteobacteria;o_Desulfovibrionales;f_Desulfovibrionaceae;g_Desulfovibrio
- k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Epsilonproteobacteria;o_Campylobacteres;f_Helicobacteraceae;g_Helicobacter
- k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Enterobacteriales;f_Enterobacteriaceae;g_
- k_Bacteria;p_TM7;c_TM7-3;o_CW040;f_F16;g
- k_Bacteria;p_Tenericutes;c_Mollicutes;o_Anaeroplasmatales;f_Anaeroplasmataceae;g_Anaeroplasma

Figura 15. Bacterias identificadas en el intestino de los ratones

Se muestra el total de bacterias clasificada por género característico de cada grupo de ratones BALB/c en diferentes periodos de tiempo durante el modelo experimental. También se muestra listado de los diferentes niveles taxonómicos a los que pertenece cada género

A)



B)

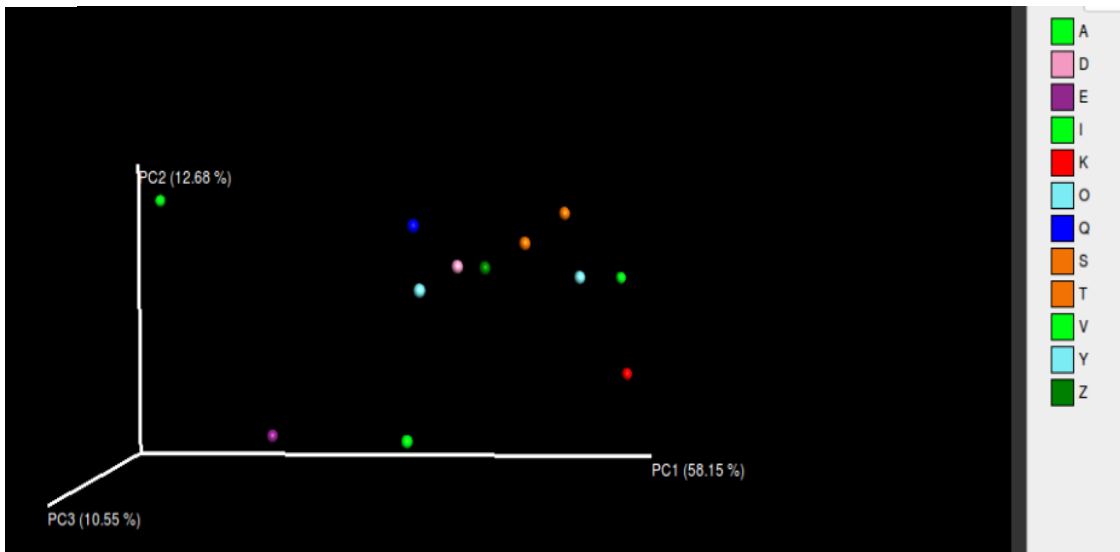


Figura 16. Análisis de coordenadas principales (PCoA)

Se muestran la semejanza y disparidad entre las muestras de microbiota de los ratones durante diferentes etapas del modelo. **A)** Imagen de una de las ventanas en 2D formadas por el análisis de PCoA. **B)** Captura de pantalla de un ángulo de la ventana en 3D generada por el análisis de PCoA

DISCUSIÓN

Al igual que muchas citocinas y moléculas de sistema inmune, el funcionamiento de MIF no ha sido completamente descrito. Mientras algunos trabajos muestran que MIF se encuentra implicado en la formación del cáncer [54] otros trabajos apuntan justamente lo contrario, y consideran a MIF una molécula necesaria para regular la respuesta del hospedero frente al cáncer [55].

Nosotros previamente ya habíamos observado la participación que tiene esta citocina en modelos de cáncer completamente deficientes de MIF, y los cuales se desarrollaron a partir de un proceso inflamatorio inducido químicamente, similar al que se desarrolla en humanos, y en los que se indujo un desarrollo de tumores exacerbado. Para determinar si el papel de MIF en el desarrollo tumoral está relacionado o tiene un efecto en la microbiota intestinal, se estableció un modelo de transferencia de microbiota a partir de ratones *mif*^{-/-}.

El primer paso fue establecer un microambiente libre de patógenos para que las nuevas poblaciones bacterianas pudieran crecer. Para esto utilizamos diferentes antibióticos (Sulfato de colistina, Sulfato de gentamicina, Sulfato de kanamicina y Clorhidrato de vancomicina), previo al trasplante de microbiota. En el caso de la colistina, esta genera una atracción electrostática entre la molécula de polimixina y los fosfatos del lípido A del LPS presente en las bacterias gram-negativa, esto permeabiliza la membrana externa de la bacteria, genera cambios en su estructura fosfolipídica y genera la pérdida de la resistencia osmótica de la bacteria [56]. En el caso de la gentamicina y la kanamicina, ambos de la familia de los aminoglucósidos-aminociclitolos, utilizados generalmente en el tratamiento contra los bacilos gramnegativos aeróbicos, inhiben la síntesis de proteínas y además, producen una lectura errónea de la información del ARN mensajero, provocando la incorporación de aminoácidos incorrectos en la cadena peptídica, lo que se cree, termina por conducir a una alteración de la permeabilidad y una entrada progresiva de moléculas de aminoglucósidos al interior de la célula bacteriana [57]. La vancomicina inhibe la biosíntesis de la pared celular de numerosas bacterias Gram positivas, esta se une al fragmento D alanina-D alanina (D-Ala-D-Ala) del

pentapéptido que genera la interconexión entre las cadenas poliméricas de la cubierta bacteriana [58].

El modelo murino que se utilizó para la formación de cáncer de colon, consistió en una inyección de azoximetano y una simulación de colitis ulcerativa. El azoximetano al ser asimilado por el organismo, se metaboliza en el hígado por acción del citocromo P450 el cual transforma la composición de este químico, que cambia el grupo metil del azoximetano en metilazoximetanol (MAM). El metilazoximetanol luego se descompone en formaldehído y en un alquilante altamente reactivo. Este químico causa alquilaciones en las guaninas del ADN. Estas mutaciones pueden inducir la tumorigénesis al presentarse en genes clave de las vías de señalización del ciclo celular, oncogenes o genes supresores de tumor [57, 58].

La Colitis ulcerativa, uno de los principales factores de riesgo para padecer CCR, que se caracteriza por la inflamación y ulceración crónica del tracto gastrointestinal y la variación en la secreción de la mucosa del colon [59]. Para simular este proceso en nuestro modelo, se utiliza DSS, el cual es un detergente que reduce la barrera de mucosa que protege el tracto del intestino, permitiendo así el contacto directo entre las bacterias y el epitelio y generando inflamación, lo que aumentan la probabilidad de una transformación eventual de las células epiteliales en células cancerígenas [60].

Durante el desarrollo de esta enfermedad algunos de los síntomas clínicos característicos son una disminución del peso del individuo y la presencia de diarrea, acompañada de sangrado [61]. En este experimento no vimos una disminución significativa de peso, esto tal vez podría ser un efecto de las transferencias de microbiota que los ratones recibieron. Diferentes estudios en modelos animales y terapias en humanos han mostrado que la microbiota nativa está sumamente ligada a padecimientos como la obesidad, e incluso esta se puede transmitir de un individuo a otro a partir de la misma transferencia de microorganismos [62]. Los ratones donadores en este caso, presentaban visiblemente un aumento considerable de peso corporal, la transferencia de microbiota podría explicar el aumento de peso que mostraron, ya que la diarrea y el sangrado rectal fueron

constantes y en aumento tal como se ha reportado. Además de que se presentaron una gran cantidad de bacterias *Firmicutes* en los ratones procedentes de Harlan, las cuales se hallaron en y relacionado con individuos que presentan obesidad, lo cual puede explicar este suceso.

De manera general los datos obtenidos en el primer experimento no presentaron síntomas clínicos severos. Durante las etapas iniciales en el desarrollo de esta enfermedad, las manifestaciones clínicas no son evidentes, se sabe que la mayoría de los diagnósticos de CCR en pacientes, se dan a partir de manifestaciones durante etapas más avanzadas [63]. Esto se ve reflejado en el largo de los intestinos, que entre los grupos era similar. Nosotros hemos observado en ratones BALB/c sanos longitudes similares a estas, además, a nivel histológico los intestinos presentan una estructura casi integra, sin notables modificaciones en su arquitectura. Los resultados del segundo experimento (día 68), al desarrollar durante un periodo de tiempo más prolongado los tumores, mostraban una arquitectura menos definida de las criptas intestinales en comparación con los intestinos de los grupos del primer experimento, aunque los grupos del día 68 no mostraban diferencias significativas entre ellos.

Los grupos del segundo experimento mostraron una mayor tendencia a subir el porcentaje de peso corporal y mantenerlos, a pesar de presentar los síntomas clínicos que se asocian generalmente a las pérdidas de peso, como son la diarrea y el sangrado rectal que se registró a partir del segundo ciclo de DSS en todos los grupos. Esto también se ve reflejado en la longitud intestinal de los grupos WT con micro *mif*^{-/-} y WT CCR. En el caso del grupo WT con micro WT, los síntomas clínicos fueron los mismos a pesar de no existir un acortamiento intestinal. El acortamiento del colon es usualmente ligado con el desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal, además la formación de una neoplasia puede potenciar dicho acortamiento.

En cuanto a los niveles de MIF, es posible observar su disminución conforme el modelo avanza y se desarrolla. Conroy y col. en 2010 [64] describen que MIF actúa como promotor directo de la tumorigénesis, inhibiendo el gen p53, que es de gran

relevancia al mediar la apoptosis y detener el ciclo celular para reparar los daños del DNA. Además múltiples trabajos señalan a MIF incrementado en diversos tipos de cáncer [54]. Sin embargo existen otros estudios que sugieren lo contrario, señalando que la inhibición de MIF promueve el desarrollo de tumores debido a que la inhibición de esta molécula repercute en la funcionalidad de células del sistema inmune y a su reclutamiento [40]. Diversos trabajos reportan el cambio que existe en los perfiles inmunológicos durante el desarrollo de esta enfermedad, llevándose a cabo una inmunoedición que permite a las células cancerígenas permanecer y proliferar en el sistema [4]. Nuestros resultados sugieren que el aumento en el número de tumores pudiera tener relación con la disminución en la concentración de esta citocina.

MIF tiene la capacidad de promover la producción de citocinas pro-inflamatorias como IFN- γ , TNF- α , IL-12 e IL-1 β [65], lo que coincide con la expresión de estos transcritos en las muestras con mayor cantidad de MIF, sin embargo se esperaría que la citocina anti-inflamatoria IL-10 se mostrara reducida en estos mismos grupos, dado que funciona contra regulando la expresión de citocinas inflamatorias, lo cual no se pudo observar de manera clara salvo en el grupo WT CCR. Algo similar ocurre en el caso de IL-4, la cual contrarregula la expresión de citocinas como IFN- γ e IL-12 y promueve la activación de macrófagos M2 [66]. Al igual que IL-10, se esperaría una proporción inversa con respecto a las citocinas inflamatorias, lo cual solo ocurre de manera evidente en el grupo WT CCR.

Estas citocinas desempeñan diversas funciones en nuestro sistema. Por ejemplo TNF- α media la adherencia de los leucocitos al endotelio vascular, para restringirlos a áreas específicas [67] Aunque se le asocian junto con IFN- γ a propiedades antitumorales debido a la capacidad que tienen para activar diferentes tipos celulares, su expresión crónica también se ha asociado con la creación de un microambiente promotor de tumores [68]. Otra citocina de gran importancia en el cáncer es IL-1 β , la cual 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 [69]. Por otro lado la administración de IL-

12 se ha propuesto en diferentes estudios como una inmuno-terapia frente a diversos tipos de cáncer, por lo cual se esperaría que en nuestros grupos el desarrollo de tumores se viera reducido debido a las altas concentraciones que obtuvimos, lo cual no sucede. Sin embargo, también se ha reportado que las altas concentraciones del monómero p40 de esta citocina (IL-12p40) está asociado a la supervivencia tumoral, y que la inhibición del mismo resulta en el atenuamiento del cáncer a través de la producción de IFN- γ [70].

MIF además promueve la expresión del receptor TLR4 el cual entre sus principales funciones al activarse es desencadenar la producción de citocinas como, TNF- α , IL-12 e IL-1 β [52], lo que también explica la expresión de estos transcritos, ya que al final del modelo se observó un aumento en la proporción de las bacterias Gram -, lo cual abordaremos más adelante.

En el caso del receptor TLR2 el cual promueve la secreción de mucina y se le asocia con el mantenimiento de un microambiente no inflamatorio [71], se observó el incremento en la expresión del transcrito en el grupo WT con micro *mif*^{-/-} junto con la reducción de TLR4, lo que contrariamente sucede en el grupo WT con micro WT donde TLR4 se eleva sobre TLR2. Esto pudiera estar relacionado con el menor número de tumores establecidos en el grupo WT con micro *mif*^{-/-}. Interesantemente, a pesar de esto en algunas muestras, la microbiota perteneciente a ratones WT mostraron un aumento en la cantidad de bacterias Gram +, lo que debería indicar un aumento en la expresión del transcrito de TLR2 lo cual no ocurre.

Se ha descrito en un gran número de estudios la predominante presencia que poseen en el intestino las bacterias de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (>90%), seguidos en menor medida de *Proteobacteria* [72]. A pesar de que no existe un perfil definido de lo que se podría considerar un microbioma sano debido a la complejidad de este, se sabe que durante el desarrollo de una patogénesis como la EII o el cáncer colorrectal la progresión de la enfermedad depende en parte del equilibrio y proporción entre las poblaciones de *Bacteroidetes* y *Firmicutes* [19, 72]. Durante nuestro estudio, estos cambios en las proporciones se ven claramente en los grupos que recibieron microbiota de ratones WT. Sin embargo en los ratones con microbiota

procedente de *mif*^{-/-} estas alteraciones fueron menores, sin importar el grado de la enfermedad, lo cual resulta muy interesante, teniendo en cuenta que de manera general el ambiente inflamatorio en el intestino de estos grupos era más elevado. Esto no significa que no exista una disbiosis en los grupos con microbiota procedente de *mif*^{-/-}, ya que al término del experimento pudimos encontrar alteraciones a niveles taxonómicos menores así como la presencia de organismos patógenos como *Helicobacter*, el cual se encuentra asociado al desarrollo del CCR y que induce respuestas inmunitarias humorales y celulares que producen o perpetúan procesos inflamatorios crónicos en el tracto gastrointestinal, así como el cambio en la expresión de genes clave como p53 o Bcl-2 [73, 74]. Otro género que se pudo localizar en las muestras con desarrollo de cáncer fue *Prevotella* el cual ha sido señalado como una posible bacteria asociada al desarrollo del CCR siendo hallada en diversos estudios metagenómicos [29, 48].

Una de las primeras moléculas que se presentan durante el proceso inflamatorio es el receptor transmembranal TLR4, el cual se activa tras la unión con el LPS de las bacterias gram negativas. Esta molécula ha sido blanco en diferentes terapias contra el cáncer, las cuales se enfocan en promover la inhibición de tal proteína. El hecho de que se conservara una gran cantidad de bacterias del phylum *Bacteroidetes* (las cuales en su gran mayoría son gram negativas) en los ratones con microbiota procedente de *mif*^{-/-} podría explicar porque en ellos se encontró un perfil inflamatorio mayor a los del grupo con microbiota procedente de ratones WT. Este proceso como ya hemos explicado desencadena la transcripción de moléculas implicadas en la reparación y proliferación celular. Esto nos podría aclarar en parte, el hecho de que los tumores formados en el intestino de los ratones con microbiota procedente de ratones *mif*^{-/-} se encontraban más desarrollados en cuanto a tamaño y volumen se refiere.

También fue posible registrar un elevado porcentaje de bacterias del género *Bacteroides* en los grupos de ratones pertenecientes al bioterio de la FES-I, tanto ratones WT como *mif*^{-/-}, al término del experimento; en comparación con el inicio del experimento en el que registraron un porcentaje bastante menor. Este cambio

puede ser directamente vinculado al desarrollo del modelo y a la evolución del cáncer. En comparación, los ratones pertenecientes a Harlan, que fueron sometidos al tratamiento con antibióticos y a la transferencia de microbiota mantuvieron un porcentaje bajo de este género durante todo el experimento. Se sabe que incluso bajo condiciones de bioterio, la microbiota intestinal puede cambiar por diversos factores como la alimentación o interacción entre individuos [75]. Existe la posibilidad de que esto, combinado con los trasplantes de microbiota y la administración de antibióticos, (tienen un efecto directo en poblaciones de distintas especies, entre estas una gran cantidad del género *Bacteroides* [76]), disminuyera algunas especies hasta el punto que no pudieran recuperarse durante el desarrollo del modelo [76, 77].

Los ratones pertenecientes a Harlan y que recibieron trasplantes de microbiota de ratones WT aumentaron su porcentaje de *Proteobacterias* al final del modelo. Este *phylum* generalmente asociado con patógenos, se encuentra sobre-expresado durante la EII y CCR. Estas bacterias producen LPS, lo que ocasionan generalmente inflamación [78]. En cuanto a los ratones pertenecientes al bioterio de la FES-I, estos mantuvieron un porcentaje similar durante el desarrollo del modelo. Curiosamente, esto es contrario en los ratones trasplantados con microbiota desarrollada en ausencia de MIF, que mantuvieron similares los porcentajes de este *phylum*, e incluso, disminuyeron la población de este al final del modelo. Aunque los reportes en ocasiones difieren entre sí, este grupo se encuentra sobre-expresado o disminuido durante el CCR [79], es muy posible que MIF juegue un papel en su desarrollo durante su establecimiento antes y durante un proceso inflamatorio crónico.

Se ha reportado que bacterias como *Ruminococcus*, las cuales son comunes en el tracto intestinal, se encuentran completamente ausentes en ratones *mif*^{-/-} [80]. Sin embargo nosotros pudimos observar este género a lo largo del modelo.

CONCLUSIONES

- El modelo utilizado en este proyecto nos permitió observar y estudiar la influencia de MIF sobre la composición de la microbiota intestinal.
- Los ratones que recibieron las transferencias de microbiota no mostraron una pérdida significativa de peso, aunque si un aumento progresivo en el sangrado rectal y la diarrea que presentaron a causa del desarrollo de CCR.
- Es probable que la realización de la transferencia de microbiota por si sola provoque alteraciones en los organismos.
- Los ratones del grupo WT con micro *mif* *-/-* presentaron un menor número de tumores, pero de mayor tamaño que los WT con micro WT.
- Parece ser que la disminución en los niveles de MIF permite la formación de nuevos tumores.
- MIF promovió la transcripción de los genes *ifn- γ* , *tnf- α* , *il-12* e *il-1 β* , además de promover la expresión del receptor *tlr-4*.
- Los ratones con microbiota procedente de ratones *mif* *-/-* presentaron un microambiente tumoral más inflamatorio.
- El grupo WT con micro *mif* *-/-* mostró una mayor expresión de *tlr-2* en comparación con *tlr-4*. A comparación del grupo WT con micro WT que mostro una mayor expresión de *tlr-4* en comparación con *tlr-2*.
- Los ratones de Harlan presentaron una mayor proporción de *Firmicutes* en comparación con los ratones procedentes del bioterio de la FESI.
- Se pudo observar al final del modelo una gran cantidad de bacterias del género *Bacteroides* en los ratones procedentes del bioterio de la FESI.
- Se hallaron una gran cantidad de bacterias de phylum *Bacteroidetes* en los ratones con microbiota procedente de ratones *mif* *-/-* al final del modelo.

Al jugar un papel en el balance y la tolerancia bacteriana en un sistema, MIF tiene una relevancia que al día de hoy aún no se comprende por completo. Nosotros comprobamos que la ausencia de MIF puede alterar el desarrollo de la microbiota

intestinal, lo que potencialmente puede afectar a un organismo de diversas maneras como al promover un microambiente apto para el desarrollo de células cancerígenas

Estos resultados nos permitirán comprender mejor la funcionalidad de MIF en el organismo y nos permitirán visualizar de mejor modo como es que esta molécula lleva a cabo sus funciones en el organismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. *Cancer Fact sheet N°297*. 2015 February, 2017 [cited 2017; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>].
2. InfoCancer. *Generalidades sobre el cáncer*. 2015 [cited 2017; Available from: <http://www.infocancer.org.mx/acerca-del-cncer-con2i0.html>].
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
4. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
5. Canceronline. *Cancer cómo se Produce*. [cited 2017; Available from: http://www.canceronline.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=72&Itemid=72].
6. CIC. *El desarrollo tumoral acumulacion de mutaciones y seleccion clonal*. [cited 2017; Available from: <http://www.cicancer.org/es/el-desarrollo-tumoral-acumulacion-de-mutaciones-y-seleccion-clonal>].
7. CIC. *El desarrollo tumoral: Acumulación de mutaciones y selección clonal*. [cited 2017; Available from: <http://www.cicancer.org/es/el-desarrollo-tumoral-acumulacion-de-mutaciones-y-seleccion-clonal>].
8. Abbas Abul K, H.L.A., and S. Pober Jordan, *Inmunología celular y molecular*. Eighth ed, ed. Elsevier. 2002.
9. DeNardo, D.G., Andreu, P., & Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(2), 309-316.
10. Qian, B.Z. and J.W. Pollard, *Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis*. Cell, 2010. **141**(1): p. 39-51.
11. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-99.
12. Jasinski, C., Tanzi, M. N., Lagomarsino, G., López, C., & Iglesias, C. (2004). Enfermedad inflamatoria intestinal. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 75(1), 74-77.
13. Rodemann, J.F., et al., *Incidence of Clostridium difficile infection in inflammatory bowel disease*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007. **5**(3): p. 339-44.
14. Best, W.R., et al., *Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study*. Gastroenterology, 1976. **70**(3): p. 439-44.
15. OPS. *Día Mundial contra el Cáncer 2016: Nosotros podemos, yo puedo*. 2016 [cited 2017; Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11616%3Aworld-cancer-day-2016&catid=9245%3Aworld-cancer-day-wdc&Itemid=42244&lang=es].
16. (INC), I.N.d.C. *Cancer Colorrectal*. [cited 2017; Available from: <http://www.msal.gov.ar/inc/acerca-del-cancer/cancer-colorrectal/>].
17. Society, A.C. *Factores de riesgo del cáncer colorrectal*. 2018; Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/causas-riesgos-prevencion/factores-de-riesgo.html>.

18. Seguros, G. *El cáncer de colon es el 4to más frecuente en México*. [cited 2017; Available from: https://www.gnp.com.mx/wps/wcm/connect/1257aaff-da9d-41ad-9bf7-3d443fa12cae/EL+CA%CC%81NCER+DE+COLON+ES+EL+4TO+MA%CC%81S+FRECUENTE+EN+ME%CC%81XICO.+UNA+ALIMENTACIO%CC%81N+SALUDABLE+PUEDE+REDUCIR+HASTA+60%25+EL+RIESGO..pdf?MOD=AJPERES&CONVERT_TO=url&CACHEID=1257aaff-da9d-41ad-9bf7-3d443fa12cae].
19. Lane, E.R., Zisman, T. L., & Suskind, D. L. (2017). The microbiota in inflammatory bowel disease: current and therapeutic insights. *Journal of inflammation research*, 10, 63.
20. Rubin, D.C., Shaker, A., & Levin, M. S. (2012). Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. *Frontiers in immunology*, 3, 107.
21. Kolligs, F.T., G. Bommer, and B. Goke, *Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis*. *Digestion*, 2002. **66**(3): p. 131-44.
22. Ochoa-Hernández, A.B., Juárez-Vázquez, C. I., Rosales-Reynoso, M. A., & Barros-Núñez, P. (2012). La vía de señalización Wnt- β -catenina y su relación con cáncer. *Cirugía y Cirujanos*, 80(4), 389-398.
23. Polakis, P., *Wnt signaling in cancer*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(5).
24. Cadigan, K.M. and M.L. Waterman, *TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(11).
25. Jacobo Velázquez P., H.L.J.G., Cravioto Quintana P. Interacciones entre el cáncer y el sistema inmunológico. *Pediatricas*. 2017; 26 (2): 56-63.
26. Matsushita, H., Vesely, M. D., Koboldt, D. C., Rickert, C. G., Uppaluri, R., Magrini, V. J., ... & Hundal, J. (2012). Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature*, 482(7385), 400.
27. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. *Science*, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
28. Barros de Oliveira CM, S.R., Machado Issy A, Gerola LR , Salomão R. Citocinas y Dolor. *Rev Bras Anestesiología*. 2011; 61: 2: 137-142.
29. Warren, R.L., et al., *Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas*. *Microbiome*, 2013. **1**(1): p. 16.
30. Sun, H.W., Bernhagen, J., Bucala, R., & Lolis, E. (1996). Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(11), 5191-5196.
31. Barnes, M.A., S. Roychowdhury, and L.E. Nagy, *Innate immunity and cell death in alcoholic liver disease: role of cytochrome P4502E1*. *Redox Biol*, 2014. **2**: p. 929-35.
32. Calandra, T. and T. Roger, *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(10): p. 791-800.
33. Nishihira, J., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth*. *J Interferon Cytokine Res*, 2000. **20**(9): p. 751-62.
34. Fingerle-Rowson, G., 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*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(7): p. 1922-32.
35. Nishihira, J. and K. Mitsuyama, *Overview of the role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in inflammatory bowel disease*. *Curr Pharm Des*, 2009. **15**(18): p. 2104-9.
36. Bucala, R. and S.C. Donnelly, *Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer*. *Immunity*, 2007. **26**(3): p. 281-5.

37. Meyer-Siegler, K.L., et al., *Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells.* J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8730-9.
38. Pearson, G., et al., *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions.* Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 153-83.
39. Xin, D., Rendon, B. E., Zhao, M., Winner, M., Coleman, A., & Mitchell, R. A. (2010). The MIF homolog, D-dopachrome tautomerase (D-DT), promotes COX-2 expression through β -catenin-dependent and independent mechanisms. Molecular Cancer Research, molcanres-0101.
40. Cuellar Bautista M.S., R.-S.M., *Estudio de la inhibición de MIF, por el compuesto sintético CPSI-156, en el desarrollo del cáncer de colon asociado a colitis.* 2016, UNAM: UBIMED.
41. Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J. L., Zerneck, A., Koenen, R. R., ... & Kooistra, T. (2007). MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. Nature medicine, 13(5), 587.
42. Rendon, B.E., et al., *Mechanisms of macrophage migration inhibitory factor (MIF)-dependent tumor microenvironmental adaptation.* Exp Mol Pathol, 2009. **86**(3): p. 180-5.
43. Jawetz, M., Adelberg, *Microbiología médica.* 25 ed, ed. McGRAW-HILL. 2010.
44. (NIH), I.N.d.C. *Factores de riesgo del cáncer.* [cited 2017; Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/germenes-infecciosos>.
45. Grasa, L., et al., *Antibiotic-Induced Depletion of Murine Microbiota Induces Mild Inflammation and Changes in Toll-Like Receptor Patterns and Intestinal Motility.* Microb Ecol, 2015. **70**(3): p. 835-48.
46. Zackular, J.P., et al., *Manipulation of the Gut Microbiota Reveals Role in Colon Tumorigenesis.* mSphere, 2016. **1**(1).
47. Khanna, S., & Tosh, P. K. (2014, January). A clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease. In Mayo clinic proceedings (Vol. 89, No. 1, pp. 107-114). Elsevier.
48. Rajagopala, S.V., et al., *The Human Microbiome and Cancer.* Cancer Prev Res (Phila), 2017. **10**(4): p. 226-234.
49. Shaw, K.A., et al., *Dysbiosis, inflammation, and response to treatment: a longitudinal study of pediatric subjects with newly diagnosed inflammatory bowel disease.* Genome Med, 2016. **8**(1): p. 75.
50. Levy, M., et al., *Dysbiosis and the immune system.* Nat Rev Immunol, 2017. **17**(4): p. 219-232.
51. Roger, T., Delaloye, J., Chanson, A. L., Giddey, M., Le Roy, D., & Calandra, T. (2012). Macrophage migration inhibitory factor deficiency is associated with impaired killing of gram-negative bacteria by macrophages and increased susceptibility to Klebsiella pneumoniae sepsis. The Journal of infectious diseases, 207(2), 331-339.
52. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway.* Cytokine, 2008. **42**(2): p. 145-151.
53. Das, R., LaRose, M. I., Hergott, C. B., Leng, L., Bucala, R., & Weiser, J. N. (2014). Macrophage migration inhibitory factor promotes clearance of pneumococcal colonization. The Journal of Immunology, 1400133.
54. He, X.X., et al., *Increased epithelial and serum expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in gastric cancer: potential role of MIF in gastric carcinogenesis.* Gut, 2006. **55**(6): p. 797-802.
55. Verjans, E., et al., *Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer.* BMC Cancer, 2009. **9**: p. 230.

56. Aguayo, A., et al., [*Colistin in the post-antibiotic era*]. Rev Chilena Infectol, 2016. **33**(2): p. 166-76.
57. Mella, M., Sepúlveda, A., González, R., Domínguez, Y., Zemelman, Z., & Ramírez, G. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. Revista chilena de infectología, 21(4), 330-338.
58. Neufert, C., Becker, C., & Neurath, M. F. (2007). An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. Nature protocols, 2(8), 1998.
59. Hanauer, S.B., *Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12 Suppl 1**: p. S3-9.
60. Triantafyllidis, J.K., G. Nasioulas, and P.A. Kosmidis, *Colorectal cancer and inflammatory bowel disease: epidemiology, risk factors, mechanisms of carcinogenesis and prevention strategies*. Anticancer Res, 2009. **29**(7): p. 2727-37.
61. cancer, A.e.c.e. *Síntomas del cáncer de colon*. 2010 [cited 2018; Available from: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-colon/sintomas-cancer-colon>].
62. Gérard, P.G.m.a.o.C.a.m.l.s., 73(1), 147-162.
63. Hardcastle, J.D., Chamberlain, J. O., Robinson, M. H., Moss, S. M., Amar, S. S., Balfour, T. W., ... & Mangham, C. M. (1996). Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. The Lancet, 348(9040), 1472-1477.
64. Conroy, H., L. Mawhinney, and S. Donnelly, *Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF)—the potential missing link*. Qjm, 2010. **103**(11): p. 831-836.
65. Rosado Jde, D. and M. Rodriguez-Sosa, *Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a key player in protozoan infections*. Int J Biol Sci, 2011. **7**(9): p. 1239-56.
66. Relloso, M., et al., *DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2634-43.
67. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
68. Weiss, J.M., et al., *Immunotherapy of cancer by IL-12-based cytokine combinations*. Expert Opin Biol Ther, 2007. **7**(11): p. 1705-21.
69. Kaler, P., Augenlicht, L., & Klampfer, L. (2009). Macrophage-derived IL-1 β stimulates Wnt signaling and growth of colon cancer cells: a crosstalk interrupted by vitamin D 3. Oncogene, 28(44), 3892.
70. Kundu, M., A. Roy, and K. Pahan, *Selective neutralization of IL-12 p40 monomer induces death in prostate cancer cells via IL-12-IFN-gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(43): p. 11482-11487.
71. Kuugbee, E.D., et al., *Structural Change in Microbiota by a Probiotic Cocktail Enhances the Gut Barrier and Reduces Cancer via TLR2 Signaling in a Rat Model of Colon Cancer*. Dig Dis Sci, 2016. **61**(10): p. 2908-2920.
72. Sun, J. and I. Kato, *Gut microbiota, inflammation and colorectal cancer*. Genes Dis, 2016. **3**(2): p. 130-143.
73. Kapetanakis, N., et al., *Helicobacter pylori infection and colorectal carcinoma: pathologic aspects*. J Gastrointest Oncol, 2012. **3**(4): p. 377-9.
74. Stofilas, A., et al., *Association of helicobacter pylori infection and colon cancer*. J Clin Med Res, 2012. **4**(3): p. 172-6.
75. Cervantes-Barragan, L., et al., *Lactobacillus reuteri induces gut intraepithelial CD4(+)CD8 α alpha(+) T cells*. Science, 2017. **357**(6353): p. 806-810.

76. Manichanh, C., et al., *Reshaping the gut microbiome with bacterial transplantation and antibiotic intake*. *Genome Res*, 2010. **20**(10): p. 1411-9.
77. Sobhani, I., et al., *Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients*. *PLoS One*, 2011. **6**(1): p. e16393.
78. Rizzatti, G., et al., *Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases*. *Biomed Res Int*, 2017. **2017**: p. 9351507.
79. Gao, Z., Guo, B., Gao, R., Zhu, Q., & Qin, H. (2015). Microbiota disbiosis is associated with colorectal cancer. *Frontiers in microbiology*, 6, 20.
80. Vujcic, M., et al., *The Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Function of Intestinal Barrier*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 6337.

ANEXO TÉCNICO

ANEXO 1. 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 en parrilla a 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.

ANEXO 2. TREN DE DESHIDRATACIÓN

Se desecha el paraformaldehído que contenía la muestra y se agregan en orden las siguientes soluciones. Las muestras deben mantenerse en agitación en todo momento.

- Agua corriente 15 minutos (2 veces)
- 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 3. 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 4. ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

- Transferir 100µl del anticuerpo de captura diluido en cada pozo de la placa de Elisa y dejar incubar toda la noche
- Retirar el anticuerpo y lavar con buffer de lavado al menos 3 veces. Invertir la placa y secarla contra toallas de papel limpias.
- Bloquear la placa utilizando 300 µL de buffer de bloqueo en cada pozo e incubar por al menos una hora.
- Lavar de la misma manera que se realizó anteriormente
- Añadir 100 µL de la muestra a cada pozo, mezclarlo suavemente y dejar incubar por 2 horas a temperatura ambiente
- Repetir el lavado de la placa
- Añadir 100 µL del anticuerpo de detección biotinilado y dejar incubar por 2 horas a temperatura ambiente
- Repetir el lavado de la placa
- Añadir 100 µL de estreptavidina-HRP a cada pozo, cubrir e incubar 20 minutos a temperatura ambiente en una zona libre de luz directa
- Agregue 50 µL de solución de Stop a cada pocillo. Golpear suavemente la placa para asegurar una mezcla completa
- Determinar la densidad óptica de la placa durante 30 min aproximadamente a 405 nm.

ANEXO 5. 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, resuspenderlo con 20 µl de agua DEPC.

ANEXO 6. 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 7. OBTENCIÓN DE cDNA

- Agregar en un mismo tubo:
 - *4 µl del Buffer de reacción del kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR
 - *2 µl del mix de la enzima Maxima
 - *500 ng-1 µl de RNA
 - Aforar a 20 µl con agua DPC
- Incubar a por 10 min a 25°C seguido de 15 min a 50°C. Finalmente 85°C durante 5 min
- refrigerar a -70°C

ANEXO 8. OBTENCIÓN DE ADN BACTERIANO EN HECES

- Recolectar con pinzas de 4-5 pellets fecales por ratón en un tubo eppendorf y dejar incubar toda la noche las muestras con 20 µl proteinasa K y 180 µl del buffer ATL
- Tratar con 1 µl de RNasa por muestra durante 15 min
- Agregar a las muestras 200 µl de buffer AL, mezclarlos y agregar 200 µl de etanol (96-100%)
- Pasar únicamente el sobrenadante a la columna y centrifugar 1min x 8000 rpm
- Descartar el residuo y agregar 500 µl del buffer AW1. Volver a centrifugar 1min x 8000 rpm
- Descartar el residuo y agregar 500 µl del buffer AW2. Centrifugar 3 min x 14000 rpm
- Transferir la columna a un tubo eppendorf y eluir con 25 µl de agua caliente. Centrifugar 1 min x 8000 rpm
- Repetir la elución

ANEXO 9. PREPARACION DE BIBLIOTECAS GENOMICAS

- Agregar a un tubo 10 µl del buffer TD y 5 µl de DNA genómico seguido de 5 µl de la solución ATM
- Centrifugar a 280 g x 1 min
- Colocar en un termociclador y correr a 55 °C durante 5 min y dejar enfriar a 10°C
- Cuando la muestra se encuentre a 10 °C agregar inmediatamente 5 µl de la solución NT
- Centrifugar a 280 g x 1 min y a 20 °C. Dejar incubar por 5 min a temperatura ambiente
- Programar en el termociclador los siguientes parámetros:

- * 72°C por 3 minutos
- *95°C por 30 segundos
- *12 cycles de:
- *95°C por 10 segundos
- *55°C por 30 segundos
- *72°C por 30 segundos
- Agregar 5 µl del adaptador Index 1 (i7) en cada columna y reemplazar la tapa de cada adaptador por una nueva
- Agregar 5 µl del adaptador Index 2 (i5) a cada fila y reemplazar la tapa de cada adaptador por una nueva
- Agregar a cada muestra 15 µl de la solución NPM
- Centrifugar 280 g a 20 °C por 1 minuto
- Colocar en el termociclador y dejar correr como se programó previamente

ANEXO 10. PURIFICACION DE MUESTRAS CON EL USO DE PERLAS MAGNETICAS

- Centrifugar 280 g a 20 °C por 1 minuto
- Transferir los 50 µl del producto de PCR a nuevos tubos para la placa magnética. Agregar 30 µl de perlas AMPure a cada pozo
- Centrifugar a 1800 rpm durante 2 minutos y dejar incubar durante 5 minutos
- Colocar en la placa magnética y esperar a que el líquido se vuelva claro
- Remover el sobrenadante y lavar 2 veces de la siguiente manera:
 - *200 µl de etanol al 80 %
 - *Colocar en la placa magnética por 30 segundos
 - *remover el sobrenadante
- Dejar secar el tubo no más de 15 minutos
- Agregar 52.5 µl de la solución RSB a cada tubo y centrifugar a 1800 rpm durante 2 minutos
- Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos
- Colocar en la placa magnética y esperar a que el líquido se vuelva claro (2 minutos aprox.)
- Transferir 50 µl del sobrenadante a nuevos tubos

ANEXO 11. NORMALIZACION DE LIBRERIAS

- Transferir 20 µl del producto de PCR a una nueva placa. Agregar en un tubo cónico vacío de 15 ml, 44 µl de la solución LNA1 por cada muestra. Calcular alrededor de 5% de muestra extra para tener en cuenta la pérdida de la muestra debido al pipeteo
- Resuspender la solución LBN1 y agregar 8 µl por muestra incluido el 5 % a considerar. Mezclar la solución LNA1 y LBN1
- Agregar 45 µl de la solución mezclada de LNA1 y LBN1 a cada muestra

- Centrifugar a 1800 rpm durante 30 min y colocar las muestras en una placa magnética y esperar a que se aclaren para retirar todo el sobrenadante
- Lavar 2 veces de la siguiente forma
 - *Agregar 45 µl de la solución LNW1 a cada muestra
 - *Centrifugar a 1800 rpm durante 5 min
 - *Colocar en la placa magnética y esperar a que se aclare
 - *Remover el sobrenadante
- Agregar a cada muestra NaOH al 0.1 N a cada muestra y centrifugar a 1800 rpm durante 5 minutos
- Etiquetar una nueva placa para PCR de 96 pozos SPG. Agregar 30 µl de la solución LNS1 a cada pozo de la placa SPG
- Después de los 5 minutos asegurarse que las muestras estén resuspendidas. De lo contrario mezclar nuevamente y centrifugar a 1800 rpm durante 5 minutos
- Colocar en una placa magnética y esperar a que el líquido este claro. Trasferir a la placa SPG. Centrifugar a 1000 g x 1 minuto

ANEXO 12. POOL DE LAS LIBRERIAS

- Permitir todos los reagentes y las muestras se adecuen a temperatura ambiente. Si las muestras en la placa SPG se congelaron previamente centrifugar 1000 g x 1 min
- Transferir 5 µl de cada librería de la placa a un tubo eppendorf. Invertir para mezclar
- Diluir las bibliotecas agrupadas a la concentración de carga para su sistema de secuenciación. Almacenar las bibliotecas no utilizadas de -25 °C a -15 °C hasta 7 días

MANEJO Y GUIA PARA EL USO DEL PROGRAMA BIOINFORMATICO

“QIIME”

Para el análisis de los datos decomplexados (proceso que consiste en asignar marcas para la identificación de los productos secuenciados por muestra) se utiliza el programa QIIME (*quantitative Insights into Microbial Ecology*) el cual corre sobre el lenguaje de programación UNIX. Nosotros utilizamos una *virtual box* que proporciona un interfaz de usuario en nuestro sistema operativo.

1. **Instalar QIIME y Virtual Box:** Se recomienda seguir el procedimiento detallado en la página qiime.org/install/virtual_box.html

El sistema UNIX es independiente del sistema Windows (PC), no comparten sus archivos. La Virtual Box crea una carpeta que los vincula de manera automática. Se encuentra dentro de “Mis documentos” y es llamada **Virtual box** (accesar con **explorador**).

2. Abrir Oracle VM Virtual box → Iniciar

Los íconos a la izquierda de la nueva ventana son (1) un **explorador** de archivos y carpetas, (2) menú de **configuración**, (3) la **terminal** (que será donde se llevará a cabo la mayor parte del trabajo), (4) acceso al explorador Google **Chrome**.



3. Trimming

Para eliminar los extremos conservados en las secuencias se utiliza la aplicación **Trimmomatic**. Esta aplicación funciona descargando el archivo desde internet y ejecutándolo desde la **Terminal**. En la computadora el archivo **trimmomatic** se encuentra en **home>trimmomatic-0.38>trimmomatic-0.38.jar**

Se deben importar las secuencias provenientes de la USM a la carpeta compartida. **QIIME** puede trabajar con archivos **.fastq** o fastq comprimidos (**.gz**)

Ejecutar el siguiente comando:

```
java -jar "dirección de trimmomatic (arrastrar)" PE -phred33  
"dirección de secuencia sentido (R1)" "dirección de secuencia antisentido (R2)"  
"nombre de nuevo archivo a crear fwd_paired.fq.gz" "nombre de nuevo archivo a  
crear fwd_unpaired.fq.gz" "nombre de nuevo archivo a crear_rev_paired.fq.gz"
```

“nombre de nuevo archivo a crear_rev_unpaired.fq.gz” **HEADCROP:18 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:5:18 MINLEN:100**

Esto significa: “Utiliza JAVA para ejecutar el archivo .jar trimmomatic.jar” “Método de PE (Extremos apareados)” “Utiliza el archivo de secuencia sentido: R1” “Utiliza el archivo de secuencias contrasentido: R2” “pon los resultados en las siguientes carpetas (el programa siempre creará primero un archivo con las secuencias forward apareadas, luego forward no apareadas, después reverse apareadas y finalmente reverse no apareadas) **HEADCROP= elimina 18 bases del inicio, LEADING, TRAILING y SLIDINGWINDOW; parámetros de calidad, NO MOVER!. MINLEN: extensión mínima de una secuencia para ser tomada en cuenta.**

Ejecutar con cada muestra y mover los nuevos archivos a su a carpeta correspondiente. Si ejecutas el comando en el mismo lugar y con los mismos nombres de archivos, se **sobreescriben**. Después de cada ejecución la terminal mostrará el **porcentaje de secuencias sobrevivientes**, este valor es un indicativo de la calidad de la muestra.

4. Unir archivos

Se unirán en un solo archivo los resultados anteriores con el siguiente comando:

```
join_paired_ends.py -f “dirección de archivo (arrastrar) _fwd_paired.fq.gz” -r “dirección de archivo (arrastrar) _rev_paired.fq.gz” -o “nombre de carpeta nueva_paired” -j 30 -p 10
```

Esto significa: “Aparea las siguientes secuencias” “Secuencias a aparear forward” “Secuencias a aparear reverse” “y “pon resultados en carpeta nueva” “sólo considera las secuencias con al menos 30 coincidencias consecutivas” “no más de 10% de diferencia”

Ejecutar para cada una de las muestras. Se generan 3 archivos, los únicos que se utilizarán en el punto siguiente son los **.join.fastq**

5. Convertir archivos y renombrarlos

Para convertir los archivos **.fastq** en **.fna**, se utiliza el siguiente comando:

```
convert_fastaqual_fastq.py -f “dirección del archivo join.fastq (del punto anterior)” -c “nombre de una carpeta nueva”
```

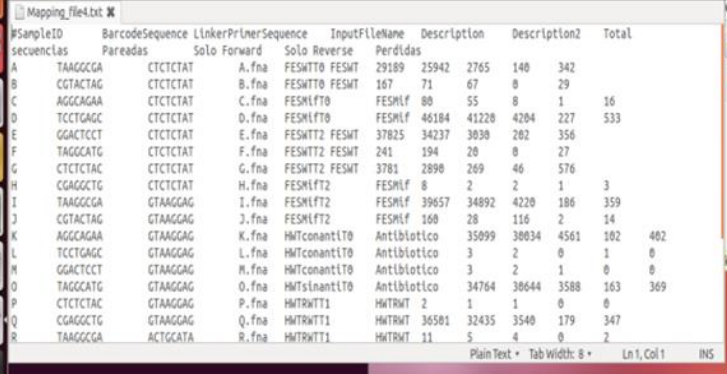
Se renombran los nuevos archivos (se recomienda el nombre de la muestra) y estos se colocan en una misma carpeta.

6. Crear un mapping file

Se necesita un archivo que sirva de guía al programa, un **MappingFile**. En Excel deben colocarse las siguientes categorías (columnas) para cada muestra: SampleID, InputFileName, Description; y se pueden agregar cualquier otra cantidad de columnas (categorías) si se requiere para el análisis. Los títulos JAMÁS LLEVAN ESPACIOS

La columna **InputFileName** se llena con los nuevos nombres dados a los archivos creados en el punto anterior (“nuevonombre.fna”). Una vez terminado, el archivo debe guardarse como “Texto delimitado por tabulaciones”.

Exportar el mapping file a la carpeta compartida y luego a una carpeta creada en UNIX.



#SampleID	BarcodeSequence	LinkerPrimerSequence	InputFileName	Description	Description2	Total	
A	TAAGCGGA	CTCTCTAT	A.fna	FESHTT0 FESMT	29189 25942	2765 140 342	
B	CGTACTAG	CTCTCTAT	B.fna	FESHTT0 FESMT	167 71 67	0 0 29	
C	AGGCAGAA	CTCTCTAT	C.fna	FESHLFT0	FESHLF 80 55	0 1 16	
D	TCCTGAGC	CTCTCTAT	D.fna	FESHLFT0	FESHLF 46184 41220	4204 227 533	
E	GGACTCCT	CTCTCTAT	E.fna	FESHTT2 FESMT	37825 34237	3030 202 356	
F	TAGGCATG	CTCTCTAT	F.fna	FESHTT2 FESMT	241 194 20	0 0 27	
G	CTCTCTAC	CTCTCTAT	G.fna	FESHTT2 FESMT	3781 2890	269 46 576	
H	CGAGGCTG	CTCTCTAT	H.fna	FESHLFT2	FESHLF 8 2	2 1 3	
I	TAAGCGGA	GTAAAGAG	I.fna	FESHLFT2	FESHLF 39657 34892	4220 186 359	
J	CGTACTAG	GTAAAGAG	J.fna	FESHLFT2	FESHLF 160 28	116 2 14	
K	AGGCAGAA	GTAAAGAG	K.fna	HMTconantIT0	Antibiotico	35099 38034	4561 102 482
L	TCCTGAGC	GTAAAGAG	L.fna	HMTconantIT0	Antibiotico	3 2	0 1 0
M	GGACTCCT	GTAAAGAG	M.fna	HMTconantIT0	Antibiotico	3 2	1 0 0
O	TAGGCATG	GTAAAGAG	O.fna	HMTsinantIT0	Antibiotico	34764 38644	3588 163 369
P	CTCTCTAC	GTAAAGAG	P.fna	HMTTRTT1	HMTTRMT 2	1 1 0 0	
Q	CGAGGCTG	GTAAAGAG	Q.fna	HMTTRTT1	HMTTRMT 36581 32435	3540 179 347	
R	TAAGCGGA	ACTGCATA	R.fna	HMTTRTT1	HMTTRMT 11	5 4 0 2	

El análisis de las muestras se hace de manera conjunta, por lo tanto, es necesario identificar (marcar) cada una de las secuencias para que el programa sepa a qué muestra corresponde. Esto con el siguiente comando:

add_qiime_labels.py -m “dirección mapping file” -i “dirección donde se encuentran las secuencias (al final del punto 5)” -c InputFileName

El comando anterior significa: “Agrega etiquetas a las secuencias” “dirección del mapping file” “dirección de las secuencias” “usa la columna **InputFileName** para marcarlas”

Esto generará un archivo **combined_seqs.fna** que probablemente aparezca en la carpeta HOME.

8. Identificar OTUs (Operational Taxonomic Unit)

El comando comparará cada secuencia contra un genoma(s) de referencia para identificar la mayor cantidad de OTUs posibles. Se realizará un análisis “cerrado” (no recomendable en análisis *de novo*) en contra de una base de datos establecida (genoma).

Para el análisis se utiliza el siguiente comando: **pick_closed_reference_otus.py -i** “Dirección del archivo *combined_seqs.fna*” **-o** “nombre de nueva carpeta”

Se generará una nueva carpeta, y dentro de ella un archivo llamado **OTUtable.biom**. También aparecerá un archivo con terminación ***.tre**, el cual corresponde al árbol filogenético utilizado durante el análisis.

9. Filtrar errores en secuenciación

Se pueden generar errores durante la secuenciación que resultan en la identificación de OTUs. Para eliminar estos errores se filtran los archivos y se eliminan los OTUs que no se encuentren en al menos tres muestras:

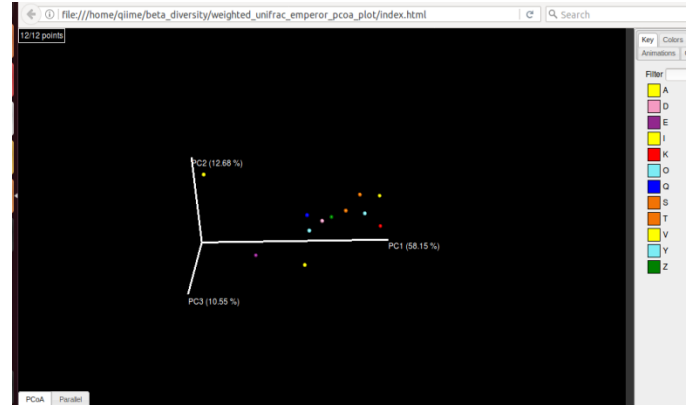
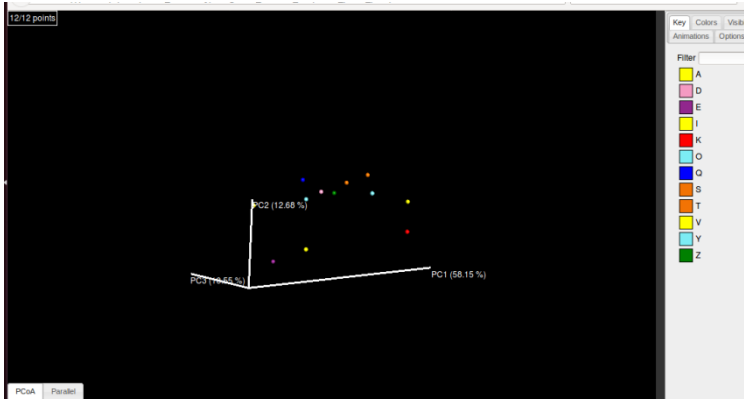
filter_otus_from_otu_table.py -i “dirección del archivo *OTUtable.biom*” **-o** “nombre de nuevo archivo (ejemplo *otusfiltrados.biom*)” **-s 3**

Diversidad BETA

La **Diversidad BETA** es la proporción entre la diversidad bacteriana en cada muestra individual y el estudio general. Esto nos permite identificar la diferencia entre grupos. Esto se realiza ejecutando el siguiente comando:

beta_diversity_through_plots.py -o “nueva carpeta” **-i** “dirección de *otusfiltrados.biom*” **-m** “dirección del *mapping file*” **-t** “dirección del archivo *.tre*” **-e 100**

Como resultado se obtendrán dos carpetas: **Weighted_unifrac_...** y **Unweighted_unifrac_...**. Dentro estarán archivos llamados *Index.html* que pueden ser visualizados al abrirse con Firefox.



Se obtendrán archivos con terminación **filtered_min3sa_even100.txt** que se utilizarán en el punto siguiente y el 11, y se generará un archivo ***min3sa_even100.biom** que se utilizará en el punto 12.

La gráfica generada como **Unweighted** toma en cuenta solo la diversidad de especies en cada una de las muestras para determinar la distancia entre una y otra. La gráfica generada como **Weighted** toma además en cuenta la abundancia de cada OTU en cada muestra. Esta abundancia se determina en el comando con el modificador **-e**; en nuestro caso indicando como máximo una abundancia de 100.

10. Boxplots de distancia entre grupos

Otra manera de ver la distancia (como medida de la diversidad) entre los distintos grupos o muestras es con el siguiente comando:

```
make_distance_boxplots.py -m "dirección del mapping file" -o "nombre de nueva carpeta" -d "dirección del archivo filtered_min3sa_even100.txt" -f "nombre de la columna del mapping file para hacer grupos de muestras, ejemplo: Description" -n 999 --save_raw_data
```

Esto generará imágenes en PDF representando la distancia entre muestras y entre grupos. También se obtendrán archivos llamados **Description_distances.txt** que son los datos numéricos que dan origen a la imagen. Se recomienda probar y utilizar los siguientes modificadores que se pueden agregar en cualquier orden al final del comando anterior:

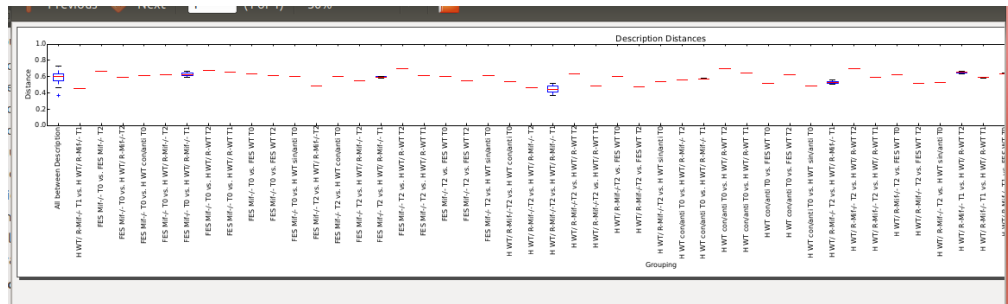
--supress_all_between

--supress_all_within

--supress_individual_within

--supress_individual_between

Estos modificadores generarán distintos tipos de gráficos al indicar al programa que no haga comparaciones entre grupos, dentro de los grupos, entre muestras de un grupo y entre todas las muestras, respectivamente.



11. Obtener datos de abundancia

Para obtener los datos de abundancia y diversidad en cada una de las muestras, se requiere el siguiente comando:

summarize_taxa.py -i "dirección del archivo even100.biom" -o "nueva carpeta"

Esto generará varios archivos dentro de la nueva carpeta con terminación **even100_#.txt** donde # = 1-7. Donde 1=reino 2=phylum 3=clase 4=orden 5=familia 6=género 7=especie.

Si se agrega el modificador **-a** al final del comando, se indicará a QIIME que presente la cuenta total de OTUs, si no se usa **-a** presentará la abundancia como porcentaje (recomendado).

12. Algunos gráficos útiles

Se utiliza el siguiente comando:

summarize_taxa_through_plots.py -i "dirección del archivo even100.biom" -o "nueva carpeta" -m "dirección mapping file" -c "columna del mapping file para hacer grupos"

Como resultado se obtendrán gráficas como las siguientes:

