



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE MIF EN EL CÁNCER DE COLON ASOCIADO A
COLITIS EXPERIMENTAL MURINA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
THALIA PACHECO FERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS
DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DRA. VILMA ARACELI MALDONADO LAGUNAS
FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO, MARZO DE 2021



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.

Agradecimientos institucionales

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y a la UNAM por la excelente educación recibida durante estos años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca recibida durante mis estudios de doctorado (Número de becario: 582551, CVU: 694650) y por la beca de movilidad otorgada para realizar una estancia de investigación en el extranjero.

Al Programa de Apoyos para Estudios de Posgrado (PAEP) por los apoyos recibidos para asistir a conferencias internacionales y permitirme presentar mi trabajo doctoral.

A mis tutoras:

Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Dra. Marcela Lizano Soberón

Dra. Vilma Araceli Maldonado Lagunas

Por su guía y sus invaluable consejos durante mis estudios de doctorado.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y a la Unidad de Biomedicina por facilitar un ambiente seguro y enriquecedor durante mi formación como Bióloga, y ahora como Doctora en Ciencias.

A los miembros de mi jurado de titulación:

Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá

Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Dra. Martha Robles Flores

Dr. Luis Enrique Arias Romero

Dr. Jorge Morales Montor

Por sus valiosos comentarios y observaciones durante la revisión de esta tesis.

Índice

1. Abreviaturas	1
2. Resumen	3
3. Abstract	3
4. Introducción	4
4.1. Cáncer	4
4.1.1. Cáncer colorrectal	4
4.1.2. Factores que predisponen al desarrollo del CCR	6
4.1.3. La inflamación en el desarrollo del cáncer	7
4.2. MIF	8
4.2.1. MIF como un posible blanco terapéutico en cáncer colorrectal	10
5. Justificación	14
6. Hipótesis	15
7. Objetivos	15
7.1. General	15
7.2. Particulares	15
8. Metodología	16
8.1. Inducción de CCR	16
8.2. Análisis macroscópico del colon y síntomas clínicos	16
8.3. Análisis histológico	17
8.3.1. H&E / Azul alcian	17
8.4. Proliferación ex – vivo de linfocitos ante antígeno tumoral	17
8.5. Inmunohistoquímica	18
8.6. Identificación del perfil de citocinas mediante PCR	18
8.7. Identificación de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo	18
8.8. Análisis estadístico	19
9. Resultados	19
<i>La producción de MIF incrementa en condiciones de CCR</i>	19
<i>La expresión de MIF incrementa en células epiteliales del intestino</i>	20
<i>Los ratones con CCR pierden peso desde el primer ciclo de DSS</i>	21
<i>La ausencia de MIF permite un mayor desarrollo tumoral</i>	22
<i>En ausencia de MIF, los ratones tuvieron un mayor crecimiento tumoral</i>	24
<i>La respuesta inmune está disminuída en los ratones Mif-/-</i>	29

	<i>En ausencia de MIF, se ve afectada la presencia de células NK en el tumor</i>	30
	<i>La deficiencia de MIF causa una menor presencia de Mφs en el tumor</i>	32
	<i>La ausencia de MIF modifica la proporción de Mφs M1/M2 en el tumor</i>	33
	<i>MIF influye en el perfil inmunológico del microambiente tumoral</i>	37
	<i>Expresión de genes</i>	37
	<i>Concentración de citocinas</i>	40
	<i>MIF es necesario para la generación de MDSC</i>	42
10.	Discusión	43
11.	Conclusión	49
12.	Perspectivas	49
13.	Bibliografía	49
14.	Anexo de técnicas	55
	Apéndice I: Técnicas histológicas	55
	13.1.1 Paraformaldehído amortiguado (PFA)	55
	13.1.2 Tren de deshidratación e Inclusión del tejido	55
	13.1.3 Hidratación de tejidos	56
	13.1.4 Tren de tinción Hematoxilina y Eosina (H&E) + Azul alcían	56
	13.1.5 Técnica de inmunohistoquímica	56
	Apéndice 2. Amplificación de los transcritos de genes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	58
	Apéndice 3. Obtención de células de <i>lamina propria</i> de colon	59
14	Artículos publicados durante los estudios de doctorado (total 9)	60
14.1	Artículos relacionados con cáncer de colon y/o MIF	60
	1. Pacheco-Fernández, T., Juárez-Avelar, I., Illescas, O., Terrazas, L. I., Hernández-Pando, R., Pérez-Plasencia, C., Gutiérrez-Cirlos, E. B., Ávila-Moreno, F., Chirino, Y. I., Reyes, J. L., Maldonado, V., & Rodríguez-Sosa, M. (2019). Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes the Interaction between the Tumor, Macrophages, and T Cells to Regulate the Progression of Chemically Induced Colitis-Associated Colorectal Cancer. <i>Mediators of inflammation</i> , 2019, 2056085. https://doi.org/10.1155/2019/2056085	60
	2. Oscar Illescas, Thalia Pacheco-Fernández, Juan P. Laclette, Tonathiu Rodriguez, Miriam Rodriguez-Sosa (2020). Immune modulation by the macrophage migration inhibitory factor (MIF) family: D-dopachrome tautomerase (DDT) is not (always) a backup system. <i>Cytokine</i> , 2020, 155121. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155121	60
	3. Olguín, J. E., Medina-Andrade, I., Molina, E., Vázquez, A., Pacheco-Fernández, T., Saavedra, R., Pérez-Plasencia, C., Chirino, Y. I., Vaca-Paniagua, F., Arias-Romero, L. E., Gutiérrez-Cirlos, E. B., León-Cabrera, S. A., Rodríguez-Sosa, M., & Terrazas, L. I. (2018). Early and Partial Reduction in CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells during Colitis-Associated Colon	

Cancer Induces CD4+ and CD8+ T Cell Activation Inhibiting Tumorigenesis. <i>Journal of Cancer</i> , 9(2), 239–249. https://doi.org/10.7150/jca.21336	60
4. Rodríguez-Sosa, M., Cabellos-Avelar, T., Sanchez-Zamora, Y., Juárez-Avelar, I., García-Reyes, E., Lira-León, A., Benítez-Flores, J., Pacheco-Fernández, T., Hiriart, M., & Gutiérrez-Cirlos, E. B. (2017). Proinflammatory cytokine MIF plays a role in the pathogenesis of type-2 diabetes mellitus, but does not affect hepatic mitochondrial function. <i>Cytokine</i> , 99,214–224. doi.org/10.1016/j.cyto.2017.07.012	60
14.2 Artículos relacionados con otros tipos de cáncer	60
5. Muñoz-Galindo, L., Melendez-Zajgla, J., Pacheco-Fernández, T., Rodríguez-Sosa, M., Mandujano-Tinoco, E. A., Vazquez-Santillan, K., Castro-Oropeza, R., Lizarraga, F., Sanchez-Lopez, J. M., & Maldonado, V. (2019). Changes in the transcriptome profile of breast cancer cells grown as spheroids. <i>Biochemical and biophysical research communications</i> , 516(4), 1258–1264. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.155	61
14.3 Artículos relacionados con la respuesta inmune ante parásitos	61
7. Rodríguez, T., Pacheco-Fernández, T., Vázquez-Mendoza, A., Nieto-Yañez, O., Juárez- M Avelar, I., Reyes, J. L., Terrazas, L. I., & Rodríguez-Sosa, M. (2020). MGL1 Receptor Plays a Key Role in the Control of <i>T. cruzi</i> Infection by Increasing Macrophage Activation through Modulation of ERK1/2, c-Jun, NF-κB and NLRP3 Pathways. <i>Cells</i> , 9(1), 108. https://doi.org/10.3390/cells9010108	61
8. Thalia Pacheco-Fernandez, Greta Volpedo, Chaitenya Verma and Abhay R Satoskar (2021). Understanding the immune responses involved in mediating protection or immunopathology during Leishmaniasis. <i>Biochem Soc Trans.</i> 2021 Feb 26;49(1):297-311. doi: 10.1042/BST20200606.	61
9. Thalia Pacheco Fernandez, Greta Volpedo, Sreenivas Gannavaram, Parna Bhattacharya, Ranadhir Dey, Abhay Satoskar, Greg Matlashewski, Hira L Nakhasi (2021). Revival of Leishmanization and Leishmanin. <i>Front. Cell. Infect. Microbiol.</i> , 17 March 2021 https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.639801	61

Índice de figuras

<i>Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer colorrectal estimadas en el mundo en 2018.</i>	<i>5</i>
<i>Figura 2. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más comunes en México estimadas en el 2018.</i>	<i>6</i>
<i>Figura 3 El receptor de MIF, CD74.</i>	<i>10</i>
<i>Figura 4. Esquema del modelo de carcinogénesis colorrectal murina.</i>	<i>16</i>
<i>Figura 5. La presencia de MIF a través del desarrollo del CCR.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 6. Las células epiteliales intestinales son la principal fuente de MIF en el tumor.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 7. Porcentaje de ganancia de peso</i>	<i>22</i>
<i>Figura 8. La ausencia de MIF permite un mayor desarrollo tumoral.</i>	<i>24</i>
<i>Figura 9. A los 34 d.p.i. se observan tumores tempranos en ambos grupos.</i>	<i>26</i>
<i>Figura 10. Los ratones deficientes de MIF desarrollan tumores más agresivos después de 68 días p.i.</i>	<i>29</i>
<i>Figura 11. Respuesta ex vivo de los linfocitos ante antígeno tumoral.</i>	<i>30</i>
<i>Figura 12. Identificación de células NK a los 34 d.p.i.</i>	<i>31</i>
<i>Figura 13. Identificación de Mφs en pólipos tempranos.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 14. Identificación de Mφs a los a los 34 d.p.i.</i>	<i>35</i>
<i>Figura 15. Identificación de Mφs a los a los 68 d.p.i.</i>	<i>36</i>
<i>Figura 16. Expresión de genes relacionados con la respuesta inmune a los 34 d.p.i.</i>	<i>38</i>
<i>Figura 17. Expresión de genes relacionados con la respuesta inmune a los 68 d.p.i.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 18. Concentración de moléculas relacionadas con el perfil Th17.</i>	<i>41</i>
<i>Figura 19. Poblaciones de MDSC en el tumor a los 68 d.p.i.</i>	<i>43</i>

1. Abreviaturas

DNA	ácido desoxirribonucleico
AOM	azoximetano
ATP	adenosín trifosfato
b-FGF	factor de crecimiento fibroblástico básico
CCR	cáncer colorrectal
CD	clúster de diferenciación
CEA	antígeno carcinoembriónico
COX-2	ciclooxigenasa 2
CTLA-4	antígeno 4 del linfocito T citotóxico
DAMPS	patrones moleculares asociados a daño
DC	células dendríticas
DSS	dextrán sulfato de sodio
EGF	factor de crecimiento epidermal
ERK	quinasa de regulación extracelular
HMGB1	<i>high mobility group box</i>
IBD	enfermedad inflamatoria intestinal
IDO	indoleamina 2,3-dioxygenasa
IL	interleucina
MAPK	proteína quinasas activadas por mitógenos
MDSC	células supresoras derivadas de mieloides
MHC	complejo principal de histocompatibilidad
MIF	factor inhibidor de la migración de macrófagos
MIP-3a	proteína inflamatoria de macrófagos

M ϕ	macrófago
NF- κ B	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B
NK	células <i>natural killers</i>
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PD-L1	ligando de muerte programada 1
PLA	fosfolipasa A
R-MIF	receptor de MIF
ROS	especies reactivas de oxígeno
siRNA	ARN pequeño de interferencia
TGF- β	factor de crecimiento transformante β
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
WT	silvestre (del inglés <i>wild type</i>)

2. Resumen

El Factor inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) es una citocina pro inflamatoria altamente expresada en el microambiente tumoral. La expresión anormal del receptor de MIF (CD74) en células tumorales del colon favorece la proliferación, supervivencia y metástasis de estas células; además, potencia la angiogénesis dentro del tumor. A pesar de ser un blanco terapéutico muy prometedor, algunos antecedentes indican que MIF podría ser favorecedor para el hospedero. Nuestra hipótesis es que se debe a su capacidad de atraer células del sistema inmune hacia el sitio del tumor. Para demostrarlo, utilizamos un modelo murino de carcinogénesis química en ratones deficientes de MIF (*Mif*^{-/-}), donde todas las células del tumor y del hospedero carecen de dicha citocina. Identificamos a las células epiteliales transformadas como la principal fuente de MIF dentro del tumor, cuya expresión incrementó tanto *in situ* como en circulación sanguínea. Los ratones *Mif*^{-/-} desarrollaron más tumores y de mayor agresividad que los ratones WT. Dentro de los tumores *Mif*^{-/-} hay una menor cantidad de macrófagos, los cuales en su mayoría tienen un perfil de tipo M2 (anti-inflamatorio). La incapacidad de respuesta de los linfocitos T de los ratones *Mif*^{-/-} ante la reexposición con su antígeno, sumado con al incremento en la transcripción de *il-17A* y la falta de producción de IL-21 y MIP-3A en relación con los ratones WT, demuestra la desregulación de la respuesta inmune. Finalmente observamos que en los tumores *Mif*^{-/-} hay una menor generación de MDSC, aunque también la ausencia de una población definida de Macrófagos GR1⁻. La conclusión de este trabajo es que MIF es necesario para el inicio de la respuesta inmune anti-tumoral en etapas tempranas del desarrollo tumoral.

3. Abstract

Macrophage Migration Inhibitor Factor (MIF) is a pro-inflammatory cytokine highly expressed in the tumor microenvironment. The abnormal expression of MIF's receptor (CD74) by tumor cells favors cell proliferation, survival and metastasis; also, increases angiogenesis in the tumor. Despite of being a promising therapeutic target, some references point out that MIF might be beneficial for the host. Our hypothesis is that this is due to its chemotactic potential on immune cells towards the tumor site. To demonstrate it, we used a colitis associated chemical carcinogenesis murine model in *Mif*^{-/-} mice, where all the cells, both in the tumor and the rest of the host, lack this cytokine. We identified that epithelial transformed cells were the major source of MIF within the tumor, and its concentration increased both *in situ* and in peripheral blood serum. *Mif*^{-/-} mice developed more tumors with a more aggressive phenotype, compared to the WT. Within the *Mif*^{-/-} tumor, there were less macrophages, and most of them with an anti-inflammatory M2 phenotype. The lack of response of T cells in *Mif*^{-/-}, together with the increase of *il-17A* transcript and the low production of IL-21 and MIP-3A, compared to WT, shows the dysregulation of immune response. Finally, we observed that within *Mif*^{-/-} tumors, there was a diminished generation of MDSC and a less defined Gr1⁻ Macrophages population. We conclude that MIF is necessary for the initiation of a correct anti-immune response in early stages of tumor development.

4. Introducción

4.1. Cáncer

Cáncer se denomina al conjunto de enfermedades relacionadas entre sí, que tienen como característica en común la proliferación descontrolada de células; estas células pueden adquirir la capacidad de migrar e invadir otros tejidos [1]. La organización mundial de la salud (OMS) estima 8.8 millones de defunciones en el 2015 a nivel mundial a causa de diferentes cánceres, siendo los de pulmón, hígado, estómago y colon los que causaron más muertes, y esperan que en 20 años esta cifra incremente 70% [2].

4.1.1. Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera neoplasia con mayor incidencia (1,849,518 casos) en el mundo. La mayor incidencia de CCR se reporta en Oceanía y Europa. Sin embargo, son las regiones menos desarrolladas, como África y Latinoamérica, donde la mortalidad es mayor en relación a la incidencia (Figura 1) [3]. En el caso de México, el CCR es el tercero en cuanto incidencia (14,900 casos reportados en 2018), con una mortalidad de 7,084 personas (Figura 2) [4]. Los datos anteriores demuestran que el CCR es un problema de salud pública prioritario a nivel mundial, por lo que se deben desarrollar terapias que permitan el tratamiento de esta enfermedad.

Durante su desarrollo y patogenia el CCR disminuye progresivamente la calidad de vida de los pacientes debido a que los principales síntomas son debilidad y cansancio, pérdida súbita de peso, cólicos y dolor abdominal, sumado a periodos de diarrea y estreñimiento, reducción del diámetro de las heces fecales, las cuales van acompañadas de sangre (fresca y visible o sólo cambia la coloración de las heces); razón por la cual, con el paso del tiempo el paciente desarrolla anemia [5].

Los métodos de diagnóstico varían. La colonoscopia y la sigmoidoscopia flexible tienen la ventaja de permitir ver directamente la presencia de pólipos o tumores y extraerlos (de ser posible) durante la prueba. Pese a que son pruebas muy invasivas, la tasa de prevención del cáncer (al identificar pólipos tempranos) es de hasta el 30% [6]. Existen pruebas visuales como el enema de bario de doble contraste y la colonografía por tomografía computarizada que son moderadamente invasivas pues requieren insertar aire en el colon y pueden pasar por alto la presencia de pólipos pequeños [7].

Existen también las pruebas no invasivas realizadas mediante el análisis de las heces fecales: la identificación de sangre en las heces fecales, la inmunoquímica fecal y la identificación de DNA en las heces, que aunque sólo son efectivas en *sugerir* pólipos

adenomatosos avanzados y tumores más agresivos, pueden disminuir 16% la mortalidad de los pacientes por CCR [6,7].

Una de las pruebas de diagnóstico más utilizadas es la identificación del antígeno carcinoembrionario en sangre, presente únicamente durante el desarrollo embrionario y en pacientes con CCR. A pesar de que esta prueba es 90% específica, se observa presente en el 29.5% de los pacientes con CCR [8]. Actualmente, la búsqueda de marcadores moleculares que puedan facilitar el diagnóstico del CCR y que sean, a la vez, poco o no-invasivos y de bajo costo para el paciente, ha cobrado relevancia [6]. Para ello, el conocimiento de la patogenia y biología del CCR, puede facilitar la identificación de dichos marcadores moleculares.

La *American Cancer Society* recomienda la cirugía como primer tratamiento. Dependiendo del tamaño, los tumores pueden ser escindidos con un colonoscopio o se puede realizar una colectomía dependiendo del tamaño de los tumores. Adicionalmente, puede usarse quimioterapia como tratamiento adjuvante si el tumor ha invadido órganos linfáticos u otros órganos, o si el tumor es clasificado en un estadio avanzado [9]. Sin embargo, las terapias utilizadas recientemente son invasivas y disminuyen la calidad de vida del paciente, además de que sólo el 12% de los pacientes con CCR metastático sobreviven a 5 años de ser diagnosticados [10].

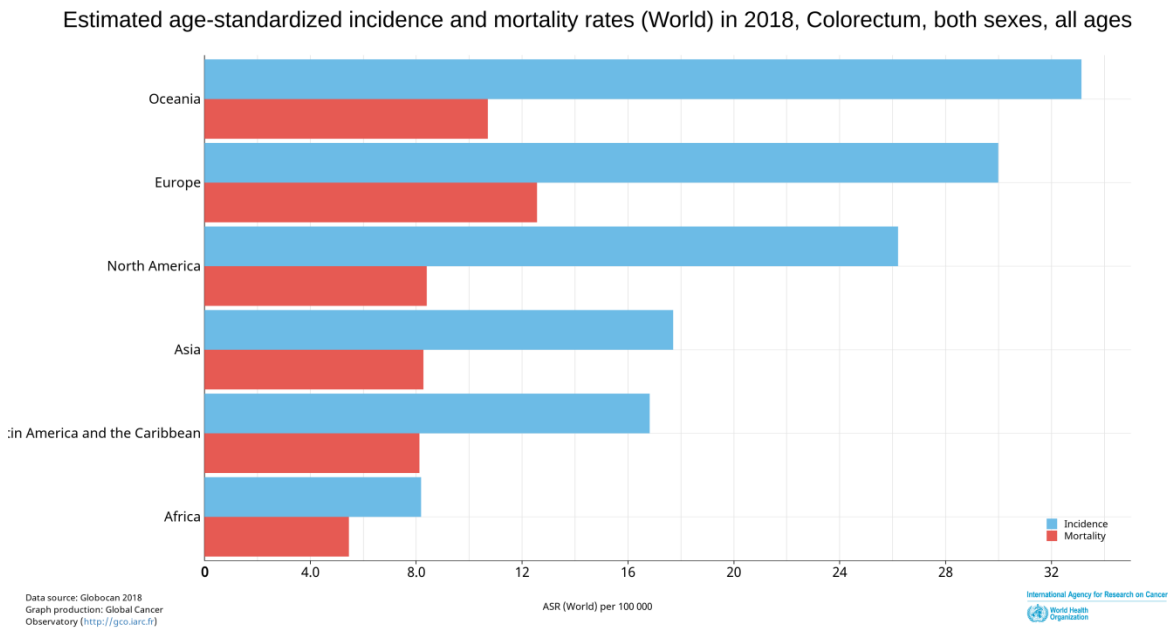


Figura 1. Incidencia y mortalidad de cáncer colorrectal estimadas en el mundo en 2018.

Se observan los números totales reportados por GLOBOCAN en 2018 de la incidencia (barras azules) y mortalidad (barras rojas) de cáncer colorrectal en el mundo, separados por continentes, para ambos sexos y considerando todas las edades.

Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, Mexico, both sexes, all ages

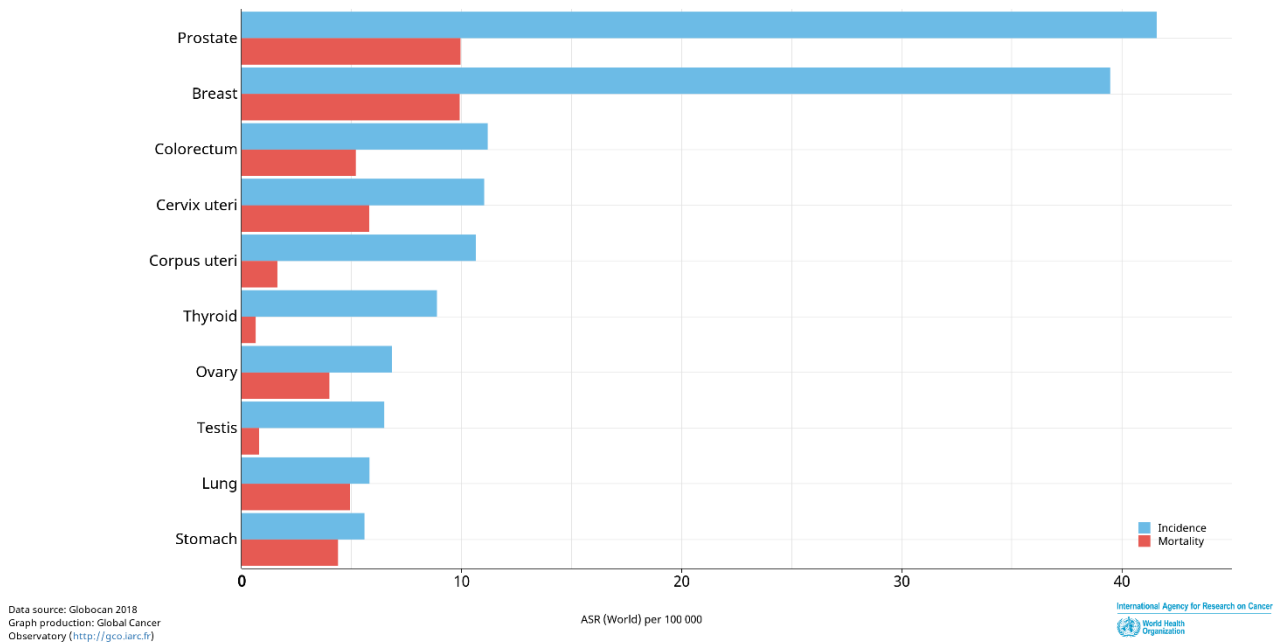


Figura 2. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más comunes en México estimadas en el 2018.

Se observan los números totales de casos reportados por GLOBOCAN, 2018 de la incidencia (barras azules) y mortalidad (barras rojas) de los tipos de cáncer más comunes en México para ambos sexos y considerando todas las edades

4.1.2. Factores que predisponen al desarrollo del CCR

El cáncer colorrectal puede derivar de enfermedades hereditarias o desarrollarse como consecuencia de inflamación crónica, en ambos casos los factores de riesgo son distintos [11,12].

El CCR hereditario está asociado a mutaciones de alta penetrancia; en este grupo se incluyen enfermedades hereditarias como la Enfermedad de Lynch y la Poliposis Adenomatosa Familiar, que están asociados a la inestabilidad cromosómica y a la presencia de microsatélites, respectivamente [11]. Sin embargo, el factor genético como desencadenante de CCR, sólo se asocia con el 20-25% de los pacientes [13,14].

Pese a que en todos los casos de CCR hay un panel de mutaciones bien identificadas, la inflamación crónica descontrolada es uno de los principales factores desencadenantes del desarrollo de CCR [15]. El principal factor de riesgo para el desarrollo del CCR asociado a inflamación crónica son las enfermedades inflamatorias intestinales (*inflammatory bowel disease* –IBD- por sus siglas en inglés). Las IBD comprenden dos padecimientos: La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa; ambas enfermedades tienen en común la inflamación de la mucosa crónica y descontrolada [16].

Los factores de riesgo que favorecen el desarrollo de la IBD son: el consumo excesivo de alcohol, carnes rojas y grasas saturadas, el sedentarismo, la obesidad y recientemente se ha asociado la pérdida de la tolerancia a bacterias del microbioma intestinal. En conjunto, estas conductas de riesgo llevan a la inflamación del intestino, si esos comportamientos no se corrigen, la inflamación se vuelve crónica y favorece la inestabilidad genética de las células intestinales [11].

4.1.3. La inflamación en el desarrollo del cáncer

La inflamación es una reacción del tejido vascularizado a la infección o daño que implica la acumulación extravascular de proteínas plasmáticas y leucocitos [17]. Cuando la inflamación aguda no se resuelve, como en pacientes con IBD, actúa como un facilitador del cáncer [18]. Incrementa el infiltrado de macrófagos y linfocitos, moléculas formadoras de matriz extracelular, factores angiogénicos y de crecimiento. Las citocinas secretadas por las células infiltradas amplifican la inflamación, por lo que hay un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno [19].

Las ROS en bajas concentraciones pueden funcionar como mitógenos, favoreciendo la proliferación y supervivencia de las células epiteliales, mientras que en altas concentraciones causan daño oxidativo en el DNA provocando mutaciones que podrían llevar al desarrollo del cáncer. Además del daño oxidativo a las enzimas, donde las ROS causan cambios alostéricos en las proteínas [20].

La inestabilidad del DNA causada por las ROS, genera la transformación de células epiteliales del intestino, las cuales son reconocidas por el sistema inmune innato. Los mecanismos que se conocen mediante los cuales el sistema inmune es capaz de identificar la presencia de células aberrantes son las señales de daño y los ligandos de estrés asociados a MHC [21]. Los DAMPS (Patrones moleculares asociados a daño) pueden provenir de las propias células tumorales (HMGB1), del cambio metabólico de estas células (incremento de ATP) o de la degradación de la matriz extracelular resultado del exceso de proliferación celular (hialuronano); y activar la respuesta efectora de los linfocitos citotóxicos [22]. Además se ha identificado la producción de interferones de tipo I desde etapas tempranas, los cuales pueden activar a las células dendríticas para desencadenar la respuesta de los linfocitos T [23]. Entonces, si la respuesta mediada por linfocitos T CD8+,

CD4+, NKs, macrófagos (M ϕ) y dendríticas es exitosa se reconocen y eliminan las células aberrantes [21].

El proceso de *eliminación* puede no ser completamente exitoso, en ese caso el sistema inmune sigue siendo estimulado por las clonas inmunogénicas que mantienen a las células tumorales en un estado de dormancia denominado *equilibrio*. En este punto la actividad de células citotóxicas, cooperadoras y M ϕ s impide que el tumor siga creciendo, pero también ejerce presión de selección en las células tumorales [24]. Las células no inmunogénicas, aquellas que tienen mecanismos de supresión del sistema inmune o las más resistentes a los mecanismos de eliminación son seleccionadas, sobreviven y proliferan; es decir que el sistema inmune puede modelar el tumor [21,24]. Se piensa que las células tumorales pueden permanecer latentes por años hasta que algún factor desencadenante (inmunosupresión, factores de crecimiento, estímulos físicos o inflamación) les permite *escapar* al sistema inmune [24].

Posteriormente, las células tumorales montan una respuesta inmunosupresora; por ejemplo, producen altas concentraciones de TGF- β que favorece la polarización de los linfocitos T reguladores (T-regs) [25] y suprime la actividad de los linfocitos CD8+ [26]. Además, inducen la expresión de PD-L1 en células estromales [27], inhibiendo así la respuesta anti-tumoral y permitiendo el desarrollo de cáncer.

El sistema inmune, entonces, cumple diferentes funciones durante la evolución del tumor: detecta y elimina las células transformadas, ejerce presión de selección sobre las clonas transformadas, mantiene en estado de latencia aquellas que no pudo eliminar y finalmente suprime la respuesta anti-tumoral permitiendo el desarrollo de cáncer [21].

El entendimiento del papel del sistema inmune en el desarrollo del CCR es un campo emergente en el desarrollo de nuevas terapias, más efectivas y seguras contra esta enfermedad. Ejemplo de ello son los anticuerpos dirigidos contra moléculas inmunomoduladoras como PD-1, CTLA-4, OX-40 eIDO que reactivan la respuesta anti-tumoral [28].

MIF es una molécula del sistema inmune que favorece la inflamación y la quimiotaxis de células del sistema inmune pero puede favorecer el desarrollo del cáncer. Estas características han resultado en que MIF se considere un posible blanco terapéutico.

4.2. MIF

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF, por sus siglas en inglés), una proteína de 12.4 KDa en su forma trimérica, es una molécula del sistema inmune que favorece la inflamación y la quimiotaxis de células del sistema inmune. Su nombre proviene de los experimentos realizados en 1960, donde se demostró que MIF es capaz de retener a los

macrófagos in vitro [29] y posteriormente se reportó su capacidad de atraer a linfocitos y monocitos hacia el sitio de inflamación de una manera similar a las quimiocinas [30]. Se ha demostrado su expresión por células del sistema inmune como linfocitos T, B, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos, basófilos y dendríticas) [31]; por células epiteliales como las del tracto gastrointestinal [32]; en células corticotrópicas y tirotrópicas de la glándula pituitaria [33] siendo identificada en la mayoría de los órganos en humanos. MIF se expresa constitutivamente y se almacena en *pools* intracelulares [31] lo que le permite ser liberado al medio extracelular rápidamente en respuesta al daño mecánico, infección bacteriana (o estímulos con LPS) y estrés oxidativo [34]. MIF permite la síntesis y secreción de citocinas inflamatorias, y el incremento en la capacidad fagocítica de los Mφs al unirse a su receptor CD74 [34].

CD74 es también conocido como la cadena invariable del complejo de histocompatibilidad (MHC) de tipo II y por lo tanto su expresión se encuentra limitada a células presentadoras de antígeno (Mφs, células dendríticas y linfocitos B) y ausente en linfocitos T [35,36]. CD74 funciona como chaperona que acompaña al MHC-II del retículo endoplásmico al fagolisosoma y mantiene la estructura proteica del MHC-II; de esta manera permite la presentación de antígeno (Figura 3A) y posteriormente se queda anclada en la membrana celular formando un homotrímero [37,38], independientemente si se está expresando MHC-II en ella [39,40]. CD74, como receptor de MIF, se encuentra anclado a la membrana celular; sin embargo, se ha observado que por sí mismo no es capaz de desencadenar las cascadas de señalización [40]. Entonces, CD74 se asocia a la molécula CD44 (Figura 3B), la cual cuenta con un dominio citoplasmático necesario para la fosforilación de la Src-cinasa en la tirosina 416 y consecuentemente la activación de la vía de las MAPK (vía RAS-RAF-MEK-ERK) [37,40]. La activación de ERK1/2 permite la progresión del ciclo celular de G1 a S [37]. La unión MIF-CD74-CD44 favorece la supervivencia celular al inhibir la apoptosis mediada por p53 (Figura 3C); disminuyendo la fosforilación de su serina 15, pero no la concentración del p53 total [37]; y en linfocitos B induce la fosforilación de AKT y la translocación de NF-κB [41,42]. Lo que finalmente resulta en la transcripción de genes codificantes para moléculas relacionadas con la respuesta inflamatoria como IL-2, TNF-α, IL-8, IL-4, COX2 y TGF-β [31,43].

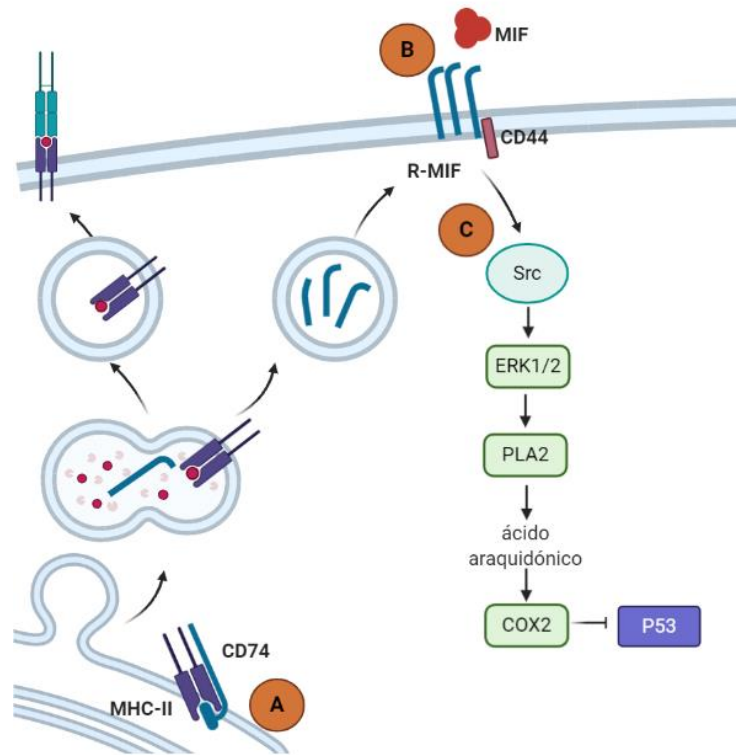


Figura 3 El receptor de MIF, CD74.

CD74 es una molécula chaperona que transporta al MHC-II al retículo endoplásmico **(A)**. En el fagolisosoma, este complejo se desarma permitiendo que el antígeno se cargue en el MHC-II y se exprese en la membrana. El CD74 liberado forma homotrimeros que se expresan en la membrana; al extremo citoplasmático se une la molécula CD44 **(B)**. El conjunto de CD74 trimérico y CD44 conforma al receptor de MIF (R-MIF) capaz de transducir señales. Estas señales pueden incluir la fosforilación sostenida de ERK1 y ERK2, la activación de la vía de la fosfolipasa A (PLA), la vía del ácido araquidónico y la inhibición de la apoptosis vía p53 **(C)**. Figura realizada con BioRender [44].

Además, CD74 puede formar un complejo con los receptores CXCR2 en monocitos y neutrófilos y CXCR4 en linfocitos T [45], los cuales fueron identificados como receptores no canónicos de MIF [30]; con mayor afinidad hacia CXCR4 [45]. Como consecuencia se activa la vía de Rho-GTPasa, la remodelación del citoesqueleto de actina y la migración de los Mφs al sitio de inflamación [40]. En conjunto, MIF favorece la respuesta inflamatoria de los Mφs, no sólo al incrementar la producción de citocinas pro-inflamatorias, también su supervivencia y la migración de las células presentadoras de antígeno.

4.2.1. MIF como un posible blanco terapéutico en cáncer colorrectal

MIF puede incidir directamente sobre las células tumorales confiriéndoles una ventaja sobre la proliferación y diseminación, por lo que se ha propuesto como un posible blanco terapéutico contra algunos tipos de cáncer. Se ha demostrado la expresión anormal de CD74 en células tumorales de cáncer gástrico [46–48], pulmón [49], páncreas [50], próstata [51], hepático [48], leucemia [52], mieloma [53] y cáncer de colon [46,48,54,55]. La unión de MIF-CD74 lleva a la activación de las mismas vías de señalización que en las células inmunes, sin embargo, al activarse en células tumorales desencadena inflamación, angiogénesis, supervivencia, proliferación celular y migración (consecuentemente metástasis) [56–59].

MIF es de particular interés en cáncer colorrectal (CCR) pues, como se menciona anteriormente, promueve la respuesta inflamatoria, crucial favorecedora del desarrollo de CCR. En modelos murinos y en pacientes humanos se ha demostrado que el incremento en la concentración de MIF es indispensable para el desarrollo de la IBD y que el tratamiento anti-MIF disminuye la patología [60–63]. Incluso, en diversas poblaciones humanas, los polimorfismos en el gen de *mif* que correlacionan con un incremento en la expresión de MIF también se asocian al desarrollo de IBD [64–71].

Dada sus propiedades promotoras del cáncer, el papel de MIF ha sido estudiado como posible blanco terapéutico contra el CCR. Desde 1987 se demostró la producción de MIF por linfocitos expuestos a extractos de cáncer de colon, donde además se propuso como un posible marcador diagnóstico para la identificación del CCR pues se observó la presencia de altas concentraciones de MIF en 76 de los 90 pacientes participantes en el estudio y su ausencia en las muestras de tejido sano [72]. La identificación de MIF en suero de pacientes con CCR, sugiere que podría ser un marcador más sensible (47.3% de sensibilidad) que el antígeno carcinoembrionario (CEA) que se usa actualmente como prueba de diagnóstico y que presenta una sensibilidad de 29.5% [8]. Más recientemente, se demostró que MIF puede ser usado como una segunda opción para el diagnóstico; en pacientes con CCR esporádico que no presentaban concentraciones de CEA suficientes para dar un diagnóstico definitivo se evaluaron los niveles de MIF y Alfa-enolasa mediante RT-Q-PCR e *immunoblotting*. Ambas moléculas estuvieron presentes en todos los pacientes y se sugieren en conjunto como marcadores de CCR [73]. El uso de MIF como un biomarcador no invasivo aún no se ha establecido ya que su presencia en suero puede estar relacionada a otras enfermedades no neoplásicas intestinales que pueden confundir el diagnóstico, sin embargo en conjunto con los marcadores CEA, transferrina1, osteopontina y CA242 pueden tener una sensibilidad entre el 50-90% [74].

En tejido colorrectal tumoral MIF incrementa de 20-40 veces en comparación al tejido sano, y este incremento puede llegar a ser similar en órganos con metástasis como el hígado [75]. Estudios con pacientes han demostrado la correlación entre el polimorfismo MIF-173G/C y la susceptibilidad y agresividad de los tumores colorrectales, especialmente en pacientes

jóvenes [76]. Su papel en el desarrollo de CCR fue sugerido en 1998, donde se demostró las células de CCR (colon-26) expuestas a factores de crecimiento como TGF- β , bFGF y PDGF incrementan la producción de MIF y que al transfectar plásmidos anti-sentido de MIF disminuye la proliferación celular [77]. En modelos de ratón, al implantar la línea celular CT-26 y administrar inhibidores de MIF, disminuyó la carga tumoral [75]. Experimentos *in vitro* mostraron que al exponer las células CT-26 a MIF incrementa la expresión de MMP-9 y el factor de crecimiento epidermal (EGF) [75]. El tratamiento con anticuerpos anti-MIF en células HUVEC redujo la incorporación de timidina tritiada, y en el modelo murino de implantación de colon-26 disminuyó la angiogénesis en el tumor [75]. El papel de MIF en la proliferación celular es una consecuencia de la unión a CD74 y la activación de las mismas vías que en los M ϕ s ya que al utilizar el inhibidor de MIF, ISO-66, el cual se une al sitio de unión con CD74, se redujo la carga tumoral en modelos de implantación de líneas celulares de CCR al reducir la tasa de proliferación de estas [78].

La expresión anormal de CXCR4 es uno de los cambios más comunes en las células epiteliales tumorales [79], especialmente las líneas celulares invasivas sobre-expresan CXCR4.[80]. Consecuentemente, el eje MIF-CXCR4 se ha propuesto como uno de los mecanismos que utilizan las células tumorales del colon para invadir otros tejidos. En un modelo *in vitro* donde se utilizó la línea celular CT-26 en un ensayo Transwell, la desregulación de la expresión de MIF utilizando siRNA redujo la migración de las células tumorales, incluso cuando la migración fue inducida con ácido lipofosfatídico (LPA) [81]. El ácido lipofosfatídico induce la migración mediante la vía Rho y la expresión de integrina B-1 [82], por lo que se sugirió que MIF puede favorecer la migración al activar la vía de Rho. Dichas observaciones fueron confirmadas en un modelo *in vivo* donde las células colon 26 fueron tratadas con el mismo siRNA antes de ser transplantadas en ratones. La inhibición de la función de MIF redujo significativamente la metástasis hacia el hígado de dichos ratones [81]. En otro estudio, la inhibición con anticuerpos anti-MIF disminuyó el fenotipo invasivo/agresivo de líneas celulares invasivas al reducir la producción de colagenasa tipo 1 y restituir la susceptibilidad a tratamientos farmacológicos. Esto pudiera correlacionarse con la hipoxia, ya que cuando las células tumorales comienzan a expresar CXCR4 también incrementa al expresión de HIF-1 [80]. La expresión de moderada a alta de CXCR4 se reportó en 17 de 32 líneas celulares de cáncer de colon. Una de ellas fue la línea celular SW480, la cual tuvo una mayor migración en placas Transwell en presencia de MIF. La migración por MIF fue significativamente mayor a las células no tratadas, sin embargo, no incrementó tanto como en presencia del CXCL12, el ligando canónico de CXCR4. Por otro lado, cuando las células fueron tratadas con MIF, el porcentaje de células en fase G0 disminuyó y el porcentaje de células en las fases S y G2/M aumentó, de manera muy similar a las células tratadas con CXCL12. Concluyendo que MIF favorece la migración y proliferación de las células tumorales de CCR [83]. Parece ser que la secreción de MIF es un mecanismo autócrino mediante el cual las células tumorales modulan su propio

microambiente, ya que la principal fuente de MIF dentro del tumor son las células epiteliales tumorales [84].

Además de migrar, las células tumorales deben ser capaces de invadir tejidos secundarios para que la metástasis sea exitosa. La transición de mesénquima a epitelio es indispensable para ello. Como parte del trabajo de Shin *et al.* previamente mencionado, la adición *in vitro* de MIF a células SW480 incrementó su capacidad de unión a la fibronectina, un componente de la matriz extracelular. Este efecto se redujo cuando se trataron con un inhibidor de CXCR4, indicando que la adhesión a la fibronectina es dependiente de CXCR4. Resultado que fue interpretado por los autores como un mecanismo favorecedor de la invasión de órganos secundarios por las células tumorales [83]. Otros autores reportan que en un modelo de *in vitro* con células mesenquimales (fibroblastos) asociadas a tumores en el tracto gastrointestinal, la adición de MIF lleva a la pérdida del fenotipo de fibroblasto (disminuye la expresión de CD90 y Vimetina) y resulta en la expresión de marcadores celulares asociados al fenotipo epitelial como Ep-CAM y e-cadherina; además, del incremento en la expresión de la reversa transcriptasa de telómeros (TERT), que se asocia con la inmortalización celular. El fenotipo obtenido tras la administración de MIF puede la invasión [85].

Por sus propiedades pro-tumorales, MIF ha sido propuesto como un posible blanco terapéutico contra el cáncer colorrectal [86]. Incluso, la empresa *Shire Pharmaceuticals* inició un estudio clínico para utilizar un anticuerpo completamente humano anti-MIF en pacientes con adenocarcinoma metastásico de colon y/o recto. El estudio de Fase 1 se completó en octubre de 2017 sin resultados publicados hasta el momento [87].

La mayoría de los estudios acerca de la participación de MIF en el CCR están enfocados a su efecto directo sobre las células tumorales. Sin embargo, existen antecedentes que reportan su posible papel favorecedor para el paciente. Legendre *et al.* observaron que aquellos pacientes con tumores de alta agresividad y metastásicos que habían sido sometidos a colectomía tenían un mejor pronóstico en cuanto a supervivencia si presentaban concentraciones altas de MIF en tejido conectivo; este fenómeno no se repetía con aquellos con altas concentraciones de galectina-3, otra molécula reconocida por su capacidad de inducir proliferación y supervivencia celular en tumores epiteliales [88].

Una de las propuestas para explicar el papel benéfico de MIF es el restablecimiento de la apoptosis inducida por hipoxia. La exposición *in vitro* a MIF de líneas celulares resistentes a apoptosis restituye la capacidad de inducir apoptosis por esta vía. Al inhibir MIF mediante siRNA, las células vuelven a ser resistentes a la apoptosis. Las células tratadas con MIF que fueron implantadas en ratones desnudos eran más susceptibles a la eliminación con oxaliplatino [89].

Por otro lado, se ha propuesto que MIF regula el tráfico de linfocitos hacia el tumor, incluyendo los linfocitos citotóxicos T CD8+. Esto se realizó mediante la implantación de la línea celular CT26 en ratones *Mif*^{-/-} y WT, donde se observó que el tamaño tumoral en los ratones *Mif*^{-/-} disminuía. La reducción se debe a que las líneas celulares de cáncer de colon son altamente productoras de MIF, al ser la única fuente de MIF en el cuerpo del ratón, atraen a los linfocitos T. Ya en el tumor, los linfocitos reguladores y citotóxicos (CD8+) eliminaron las células tumorales eficientemente [90]. Este podría ser un efecto observado en otros estudios previos, ya que las líneas celulares de cáncer de colon implantadas en diversos estudios son altamente productoras de MIF, lo que podría estar creando un sesgo en la interpretación de los resultados.

Pensamos que al enfocar nuestro estudio al papel de MIF sobre el sistema inmune, durante la génesis y desarrollo de CCR, podremos observar el papel en el control de esta enfermedad, a diferencia de los estudios que se han enfocado en cómo MIF es utilizado por las células cancerosas a su favor.

5. Justificación

MIF es una molécula crucial para el inicio de la inflamación. Además, diversos estudios han demostrado su papel favorecedor del cáncer. Específicamente en el CCR, MIF parece favorecer características de invasión y metástasis que pueden ayudar al establecimiento de cánceres más agresivos al actuar directamente sobre las células tumorales. Los estudios previos han mostrado el potencial de MIF como un blanco terapéutico muy prometedor. Sin embargo, algunos trabajos difieren con estas observaciones y sugieren un posible impacto positivo de MIF hacia el hospedero. Ninguno de los modelos utilizados previamente demuestra el papel de MIF sobre el sistema inmune a lo largo del desarrollo del CCR; ya que se enfocan en su acción directa sobre las células tumorales y poco se habla de cómo modula el sistema inmune durante el CCR. Además, que no se han reportado modelos completamente deficientes de MIF. En los modelos descritos previamente, las líneas celulares de CCR implantadas son altamente productoras de MIF, lo que causa que incluso en los modelos en ratones *Mif*^{-/-} haya una producción localizada de esta citocina.

El presente trabajo plantea resolver dicha controversia de la siguiente manera:

1) Implementar por primera vez un modelo murino completamente deficiente de MIF, desde la carcinogénesis hasta el desarrollo de CCR. Esto mediante un modelo de carcinogénesis colorrectal química asociada a inflamación en ratones *Mif*^{-/-}. Así, es posible definir el papel de MIF en todas etapas tempranas y avanzadas del desarrollo de CCR. Dicho modelo, además, asemeja al proceso de carcinogénesis en humanos derivado de la cronicidad de IBD.

2) Analizar de manera paralela la presencia y polarización de células del sistema inmune, y el desarrollo tumoral. Con esto, determinar no sólo el papel de MIF en el sistema inmune,

también correlacionar con la efectividad de la respuesta antitumoral y las consecuencias en el hospedero.

El conocimiento generado sobre el mecanismo de acción de MIF durante el desarrollo del CCR y su influencia en el microambiente inmunológico tumoral, puede ser utilizado para predecir la efectividad del tratamiento basado en MIF y a planear responsablemente el uso de la terapia anti-MIF a nivel clínico.

6. Hipótesis

El Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos limita el desarrollo de tumores asociados a la inflamación al favorecer la quimiotaxis de células inmunes hacia el colon, en un modelo murino de CCR asociado a colitis.

7. Objetivos

7.1. General

Establecer la participación de MIF en la tumorigénesis asociada a colitis en un modelo de CCR inducido con el cancerígeno azoximetano (AOM) y dextrán sulfato de sodio (DSS) en ratones con fondo genético BALB/cAnN.

7.2. Particulares

1. Establecer un modelo de CCR asociado a inflamación crónica con AOM y DSS en ratones WT y *Mif*^{-/-}.
2. Caracterizar el perfil de citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias en el CCR en etapas tempranas (día 34 p.i) y tardías (día 68 p.i) en ratones WT y *Mif*^{-/-}.
3. Identificar la progresión del CCR mediante el análisis histológico en etapas tempranas (día 34 p.i) y tardías (día 68 p.i) en ratones WT y *Mif*^{-/-}.
4. Comparar el porcentaje de células T CD4⁺, T CD8⁺, T reguladoras (Tregs), NKs, células dendríticas (DC), macrófagos (M ϕ) y células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) en etapas tempranas (día 34 p.i) y tardías (día 68 p.i) del CCR en ratones WT y *Mif*^{-/-}.
5. Identificar la ubicación de los M ϕ en el colon en etapas tempranas (día 34 p.i) y tardías (día 68 p.i) en ratones WT y *Mif*^{-/-}.
6. Determinar la polarización de los M ϕ presentes en el CCR en etapas tempranas (día 34 p.i) y tardías (día 68 p.i) en ratones WT y *Mif*^{-/-}.

8. Metodología

8.1. Inducción de CCR

Se desarrolló un modelo murino de cáncer colorrectal asociado a inflamación crónica (Figura 4), con una variación al descrito por Neufert en 2007 [91]. Para ello se utilizaron ratones BALB/cAnN hembras de 7 semanas de edad tanto *wild type* (WT) como *knock-out* de *MIF* (*Mif*^{-/-}); la homocigocidad de ambos genotipos se verificó previo a su inducción mediante la amplificación del gen de *mif* o el *cassette* insertado de resistencia a la *neomicina* por PCR [92]. Los ratones recibieron una inyección única de azoximetano (AOM) (12mg/kg peso del ratón) vía intraperitoneal para favorecer la mutagénesis en los genes en las células epiteliales del colon [93]. Posteriormente fueron administrados 3 ciclos de dextrán sulfato de sodio (DSS) al 2% disuelto en el agua para beber durante 7 días para generar inflamación crónica de la mucosa intestinal. Cada ciclo de DSS 2% fue seguido por 15 días de descanso donde el agua para beber estaba libre de DSS. Los datos presentados en este trabajo se refieren al día 68, al final del modelo cuando observamos tumores bien establecidos, y en el día 34, inmediatamente después del segundo ciclo de administración de DSS, donde encontramos pólipos menos desarrollados.



Figura 4. Esquema del modelo de carcinogénesis colorrectal murina.

Se administró una inyección única de 12 mg/kg de peso de azoximetano (AOM) vía intraperitoneal, seguido de 3 ciclos de dextrán sulfato de sodio (DSS) al 2% disuelto en agua para beber. El sacrificio de los ratones se realizó en los días 34 (etapas tempranas) y 68 (etapas avanzadas) post-inducción (p.i.).

8.2. Análisis macroscópico del colon y síntomas clínicos

Semanalmente se registró el peso de los ratones y la presencia (o no) de los síntomas clínicos diarrea y sangrado rectal que reflejan, en conjunto, la progresión de la enfermedad. Una vez sacrificados los ratones se lavó el intestino haciendo pasar PBS frío para remover las heces fecales. Se midió la longitud del intestino con un vernier electrónico y se registró en centímetros. Posteriormente el intestino se cortó longitudinalmente para exponer la luz intestinal y observar los tumores desarrollados. Se registró el número y las dimensiones (largo y ancho) de los tumores con un vernier electrónico, dichos datos fueron utilizados para

determinar el volumen de cada tumor con la fórmula: $V_t = (l \cdot a^2)/2$ donde: V_t = volumen tumoral obtenido en milímetros cúbicos; l = largo en milímetros; a = ancho en milímetros. Con esos mismos datos se determinó la carga tumoral, que se explica como la sumatoria del volumen de todos los datos de V_t por intestino: ΣV_t .

8.3. Análisis histológico

Para realizar el análisis histológico se obtuvieron muestras de tejido (0.5 cm) tumoral o sano de cada intestino, las cuales fueron fijadas con paraformaldehído amortiguado 4% (Anexo 1). Posteriormente, las muestras fueron lavadas con agua corriente, sometidas a deshidratación mediante un tren de alcoholes ascendentes y finalmente a alcohol amílico de 20 minutos cada uno. Después de tres incubaciones de una hora en parafina, las muestras fueron incluidas en parafina de inclusión de tejidos Paraplast (Leica). Se realizaron cortes transversales de los tumores o tejido sano de 0.5 μ m cada uno, se colocaron en portaobjetos 1 mm de grosor (PEARL) marcados y se realizaron las respectivas tinciones (descritas más adelante). Las laminillas fueron analizadas por un histopatólogo a doble ciego.

8.3.1. H&E / Azul alcian

Para determinar la morfología de las criptas, el tipo de pólipo, el grado de displasia y la infiltración celular se realizó una tinción con hematoxilina y eosina (H&E). Esta técnica se realizó con la adaptación de incorporar el colorante azul alcian, el cual tiene una carga positiva que hace que sea afín a las moléculas aniónicas de la mucosa; al teñir de azul las mucinas ácidas se determinó la pérdida o incremento en la producción de estas. Brevemente, la técnica consiste en la incubación de las laminillas en xilol para disolver y remover la parafina del tejido, posteriormente en un tren de alcoholes de concentración descendente hasta llegar a agua para hidratar el tejido y permitir la difusión de los colorantes al interior de los tejidos. La hematoxilina se utiliza para teñir de color morado los componentes ácidos de la célula y la Eosina para teñir de rosa los componentes básicos de las células. La técnica completa se incluye en el Anexo 1.

8.4. Proliferación *ex-vivo* de linfocitos ante antígeno tumoral

La proliferación de linfocitos T al re-encontrarse con su antígeno es indicativo de la activación y capacidad de respuesta. Para identificar posibles diferencias en la respuesta inmune anti-tumoral, se realizó un ensayo *ex-vivo* donde se cargaron células presentadoras de antígeno (APCs) con antígenos tumorales; posteriormente se cultivaron con linfocitos provenientes de ratones sanos o con CCR para evaluar su proliferación.

Se extrajeron M ϕ s peritoneales que se utilizaron como APCs, se cultivaron 1×10^5 células/pozo en placas de 96 pozos, se dejaron adherir al fondo de la placa incubando durante 24 horas. Posteriormente, se agregaron 1×10^6 esplenocitos de ratones sanos o con

CCR obtenidos mediante la perfusión del bazo. Al mismo tiempo se obtuvo antígeno tumoral mediante la sonicación de 0.5 cm de tejido tumoral disuelto en 2 ml de medio DMEM completo (10% suero fetal bovino, 5% antibiótico). Se agregaron 200 μ l de antígeno por pozo, el antígeno corresponde al mismo grupo de los linfocitos cultivados en cada pozo. Se incubaron las placas durante 72 horas a 37 °C con 5% CO₂. 18 horas antes del término de la incubación, se agregó 1 μ Ci de timidina tritiada ([³H]TdR) por pozo, el cual se incorpora en el DNA de las células en proliferación. La radiación emitida por la timidina incorporada se reporta en cuentas por minuto (CPM) y representa la proliferación de estos linfocitos.

8.5. Inmunohistoquímica

Para identificar la expresión y ubicación de los M ϕ s y MIF dentro del tejido se realizó la técnica de inmunohistoquímica con el kit Histostain-Plus IHC Kit, HRP (Thermo) siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1). Brevemente, se realizó la recuperación antigénica con un búfer de citratos para desenmascarar los antígenos que hubiesen sido cubiertos por el paraformaldehído. Posterior hidratación, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con H₂O₂, también se bloquearon las posibles uniones inespecíficas con PBS-BSA. Se incubaron las muestras con anticuerpo primario específico para cada una de las moléculas blanco: F4/80 para M ϕ s, iNOS para M1, Arginasa-1 para M2 y MIF. Después se incubó un anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa HRP, para que al agregar diaminobencidina y H₂O₂ exógeno, la ubicación de las moléculas blanco se revele en un color café. Finalmente se realizó la contra-tinción con Hematoxilina de Harris.

8.6. Identificación del perfil de citocinas mediante PCR

Para determinar el perfil de citocinas y moléculas relacionadas con el microambiente inmunológico se obtuvo muestra de colon sano o tumoral (0.5 cm aprox.). El tejido fresco se introdujo inmediatamente en nitrógeno líquido para su congelación, macerado y almacenamiento en TRIzol. Siguiendo las recomendaciones del fabricante se realizó la extracción de RNA, el cual fue purificado utilizando las columnas RNAqueous-Micro Kit y DNAsa I (Thermo). La síntesis del cDNA se realizó con Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR; a partir del cual se realizaron los PCR de punto final de los genes *tnfa*, *il-1 β* , *arginasa-1*, *muc2*, *il-18*, *il-4*, *muc-1*, *il-10*, *muc5a*, *ifn- γ* , *il-23*, *inos* e *il-12*. La amplificación de dichos transcritos (Anexo 2) se reveló mediante un gel de agarosa con bromuro de etidio y se determinó la expresión relativa al gen constitutivo β -*actina* mediante densitometría de la absorbancia cuantificada. La comparación de la expresión de los transcritos de los genes *foxp3* e *il-17* se realizó mediante q-PCR con el kit Kapa SYBR Fast qPCR kit Master Mix (2x) Universal siguiendo las recomendaciones del fabricante para analizar el cambio de expresión en comparación al gen constitutivo β -*actina*.

8.7. Identificación de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo

Para identificar el componente inmunológico de los tejidos, se obtuvieron las células de la lámina propia intestinal (Anexo 3). Para ello, se removió el epitelio mediante la incubación

del intestino en EDTA, el cuál al ser un quelante, destruye las uniones adherentes entre estas células. Después, se digirió el tejido restante (el tejido linfoide debajo de la mucosa) con colagenasa tipo IV; con ello, las células de la lámina propia quedaron libres de la matriz extracelular. Finalmente se purificaron únicamente las células vivas utilizando un gradiente 90/40 de Percoll. Se tiñó 1×10^6 células con anticuerpos específicos para la identificación de MDSC, Mφs, linfocitos T y la expresión de CXCR4.

8.8. Análisis estadístico

Ya que las poblaciones de sistemas de CCR no tienen una distribución normal, se utilizó la prueba no paramétrica de *Mann Whitney* para el análisis de las medianas. La significancia estadística se demuestra con asteriscos (*) dependiendo del valor de esta: * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

9. Resultados

La producción de MIF incrementa en condiciones de CCR

Para identificar el papel de MIF en el microambiente tumoral de cáncer colorrectal utilizamos un modelo completamente deficiente de MIF por medio de ratones *Mif*^{-/-}. Para demostrarlo, medimos la concentración de MIF en suero y en proteína obtenida de tejido intestinal. En ambos casos, no pudimos detectar la presencia de MIF mediante ELISA (Figura 5).

También monitoreamos los cambios en la concentración de MIF como consecuencia del desarrollo de CCR, obtuvimos suero de sangre periférica antes de la inyección con AOM, después de cada ciclo de DSS y al finalizar el modelo (Figura 5). La concentración de MIF en los ratones WT antes de ser inducidos era de 1487.17 ± 832.498 pg/ml; posterior a la inducción se incrementó de dos a tres veces en cada punto de medición. Tras cada ciclo de DSS (días 12, 33, 54) y al final del modelo (día 68) se cuantificaron 6235.89 ± 1781.115 pg/ml, 4258.9 ± 1253.646 pg/ml, 6204.66 ± 91.414 pg/ml y 4748 pg/ml de MIF, respectivamente. Además, este incremento también fue detectado directamente en los tumores (Figura 5B), donde este incremento fue más significativo ($p < 0.0001$). Mientras que en un colon sano se produce 513.3 ± 9.264 pg/ml de MIF, en uno con tumores esta cantidad incrementa a 21905 ± 1855 pg/ml. Estos datos demuestran que la inducción de CCR se asocia con la sobre-expresión de MIF en el tejido tumoral, y que este incremento es tal que se ve reflejado en suero sanguíneo.

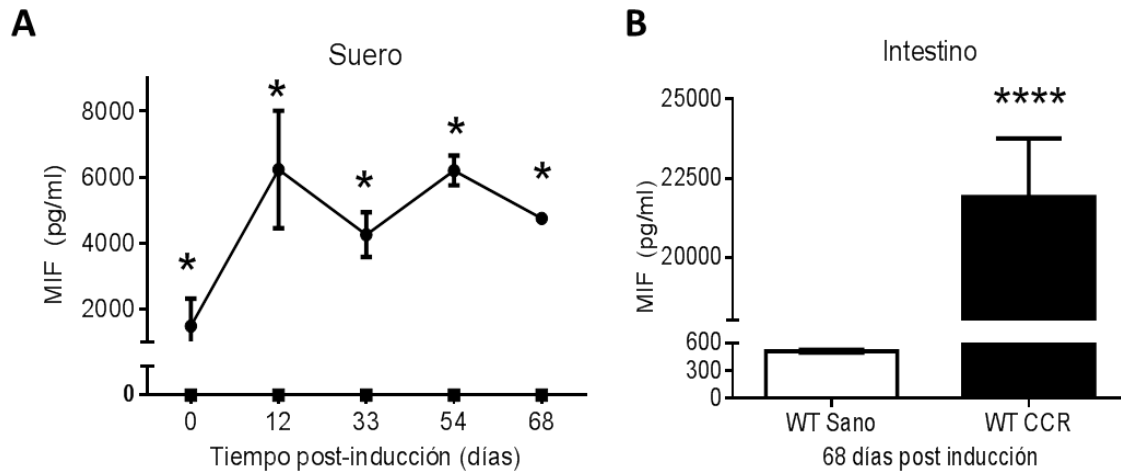


Figura 5. La presencia de MIF a través del desarrollo del CCR.

(A) Se observa la concentración de la proteína MIF en suero sanguíneo a través del tiempo en ratones WT CCR (●) y *Mif*^{-/-} CCR (■) y (B) en tejido de colon al final del modelo. * $p < 0.1$ y **** $p < 0.000$.

La expresión de MIF incrementa en células epiteliales del intestino

Para identificar la fuente del incremento de MIF dentro de los tumores se realizó una tinción de inmunohistoquímica en muestras de tejido sano y tumoral de ratones WT (Figura 6). En las muestras de colon WT sano (Figura 6A) se observó la expresión leve y homogénea en las células epiteliales. La expresión de MIF incrementa en las muestras de colon WT CRC (Figura 6B); se observa una marcada expresión de MIF en las células inflamatorias de la lámina propia y en el citoplasma de las células del epitelio regenerativo cerca de los pólipos neoplásicos, es decir, en aquellas menos diferenciadas. En cambio (Figura 6C), las células neoplásicas de los pólipos adenocarcinomatosos bien diferenciados, muestran una expresión moderada de MIF, y la expresión en las células inflamatorias (→) en estas zonas era ligeramente mayor. Es decir, que la mayor expresión de MIF se encuentra en las células del epitelio hiperplásico regenerativo y las células inflamatorias asociadas, y la expresión decremента de manera progresiva en las células mejor diferenciadas.

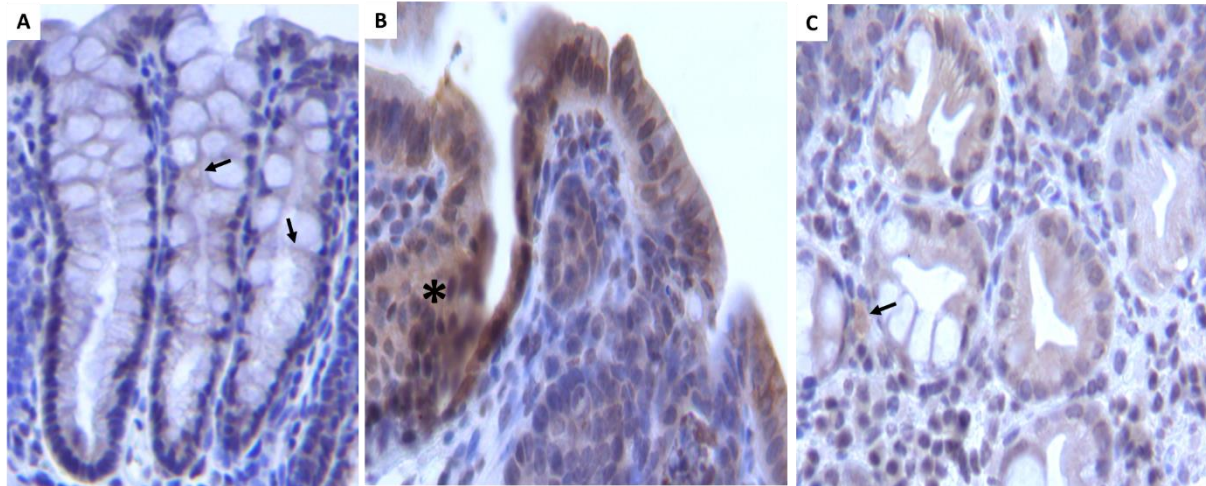


Figura 6. Las células epiteliales intestinales son la principal fuente de MIF en el tumor.

Se muestran micrografías representativas de la detección de MIF (café) tejido WT donde se observa **(A)** una expresión leve de MIF en tejido sano (→). **(B)** En los ratones WT CCR se observa una fuerte inmunotinción en el epitelio hiperplásico y regenerativo (*). **(C)** Las glándulas neoplásicas bien diferenciadas expresan MIF moderadamente, mientras que las células del infiltrado inflamatorio como los Mφs (→) muestran una mayor inmunoreactividad. (Micrografías a 400X).

Los ratones con CCR pierden peso desde el primer ciclo de DSS

La pérdida de peso (Figura 7) es uno de los síntomas clínicos del CCR, se relaciona con la falta de apetito por el dolor abdominal, la diarrea constante y la incapacidad de realizar los movimientos intestinales (peristalsis) correctamente a causa del incremento en la masa tumoral hace el lumen intestinal. Por eso registramos el peso de los ratones semanalmente durante los 68 días del modelo. Los ratones *Mif*^{-/-} mostraron una cinética de peso muy similar a la de los ratones WT, sin que haya deficiencias en el crecimiento a causa de su fondo genético. En cambio, los ratones con CCR, tanto WT como *Mif*^{-/-} mostraron su incapacidad de ganar peso; especialmente después del primer y tercer ciclo de DSS, cuando observamos un pico de decremento de peso. Paralelamente se observó la presencia de diarrea en ambos grupos a partir del segundo ciclo de DSS y de sangrado rectal a partir del tercero. Los síntomas clínicos no resultaron ser distintos entre los diferentes fondos genéticos.

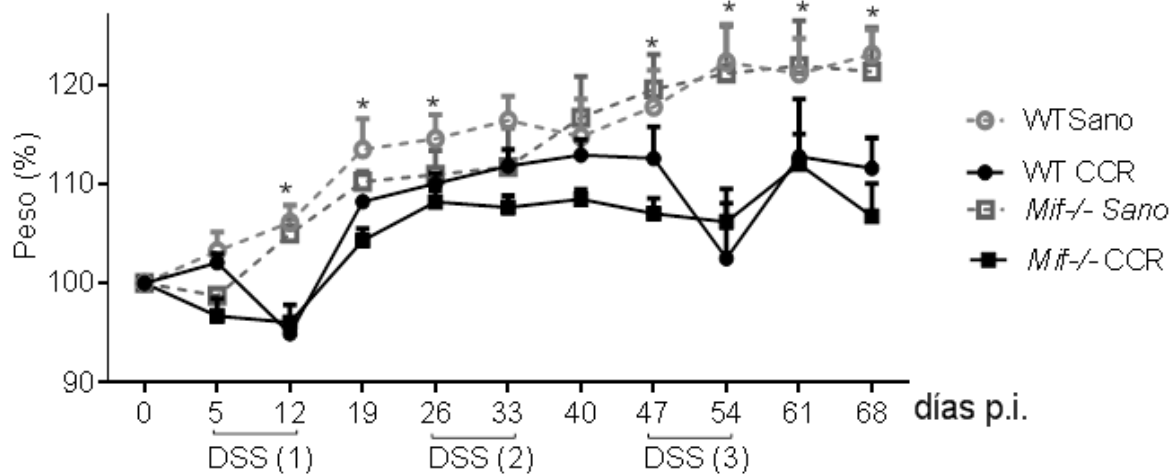


Figura 7. Porcentaje de ganancia de peso

En los cuatro grupos experimentales a diferentes días post inducción (p.i.). Se indican (*) los puntos de medición donde los grupos con CCR fueron significativamente diferentes a sus respectivos controles sanos. *p < 0.1.

La ausencia de MIF permite un mayor desarrollo tumoral

Para poder observar el desarrollo tumoral se sacrificaron los ratones en los días 34 del modelo AOM/DSS, cuando los ratones habían completado dos ciclos de 2% DSS (etapa temprana), cuando apenas aparecían los primeros pólipos visibles, y el día 68 (etapas avanzadas), al final del modelo.

Posteriormente se midió el largo de los intestinos desde el ciego hasta el ano (Figura 8A y B); una disminución en ella refleja la pérdida de la morfología de las criptas intestinales a causa del desarrollo tumoral. El acortamiento de los intestinos (Figura 8A) en etapas tempranas no se observó si comparamos los cólores con cáncer (WT CCR= 9.52 ± 1.32 cm y Mif-/- CCR= 8.97 ± 1.56 cm) con sus respectivos controles sano (WT sano= 9.012 ± 1.49 cm y Mif-/- sano). A los 68 d.p.i. el acortamiento a causa de la pérdida de la morfología intestinal fue significativo en ambos fondos genéticos (WT CCR= 6.64 ± 3.89 y Mif-/- CCR = 6.708 ± 1.098). Congruente con nuestros tiempos de medición, los 34 y 68 d.p.i. corresponden a los primeros crecimientos hacía el lumen intestinal y el desarrollo de tumores que afectan el funcionamiento del colon, respectivamente.

Posteriormente, abrimos longitudinalmente los intestinos para hacer evidente los tumores en la luz intestinal (Figura 8C). El crecimiento tumoral se reportó de tres maneras diferentes: número de tumores, el tamaño de los tumores y la carga tumoral.

El número de tumores representa cuántos sitios de transformación de células fueron exitosos por intestino y por lo tanto dieron lugar a un tumor. A los 34 d.p.i. observamos los primeros pólipos pequeños en ambos grupos CCR, tan sólo 3.4 ± 0.5099 en los WT y 3.250 ± 0.4787 en los *Mif*^{-/-}. Al parecer en etapas tempranas, la presencia de MIF no es determinante en el tiempo de aparición de tumores. Sin embargo, esta tendencia cambia a los 68 d.p.i., donde podemos observar un incremento en el número de tumores en los cólores *Mif*^{-/-} (25.38 ± 1.772 tumores por intestino) en comparación a los WT (13.00 ± 1.862 tumores por intestino) (Figura 8D). Es evidente que en ausencia de MIF, un mayor número de células transformadas logró convertirse en tumores bien desarrollados.

El tamaño del tumor representa qué tanto creció un tumor, muy probablemente, a mayor tamaño de cada tumor, refleja mayor proliferación de las células transformadas. Los ratones *Mif*^{-/-} no sólo tuvieron más tumores, si no que estos fueron de mayor tamaño comparados a los WT (Figura 8E). A los 68 d.p.i., los ratones WT habían desarrollado mayormente (70.77%) tumores menores a 2 mm de diámetro, mientras que el 24.62% de los tumores estuvieron entre 2-4 mm y tan solo el 4.62% era mayor a 4 mm de diámetro. Diferente a lo observado en los intestinos *Mif*^{-/-}, donde el tamaño predominante (70.69%) de los tumores era de 2-4 mm, seguido del 25.86% de tumores mayores a 4 mm de diámetro. Estos resultados indican que la deficiencia total de MIF, permiten a los tumores una mayor proliferación y crecimiento. Sin embargo, a los 34 d.p.i. el tamaño de los tumores era muy similar entre WT (58.82% menores a 2mm y 41.18% entre 2-4 mm) y *Mif*^{-/-} (53.85% menores a 2mm y 46.15% entre 2-4 mm). Lo que apunta a que MIF no tiene un papel en la oncogénesis, pero cobra importancia durante la progresión del tumor ya formado.

La carga tumoral resume en un solo dato el número de tumores y el tamaño de estos, haciendo evidente el volumen de masa tumoral por intestino (Figura 8F). Por lo cual, no observamos diferencias significativas a los 34 d.p.i., pero sí a los 68 d.p.i, donde la carga tumoral era significativamente mayor en los *Mif*^{-/-}, comparado con los WT. La comparación de ambos tiempos de medición nos indica que, aunque MIF no tiene un impacto en la frecuencia de la aparición de los primeros pólipos en el colon, la ausencia de esta citocina desencadena un mayor crecimiento tumoral. que se ve reflejado hasta los 68 días. Lo que nos hace pensar que MIF juega un papel favorecedor de la respuesta antitumoral, por lo cual es necesaria su presencia en algún punto del desarrollo tumoral.

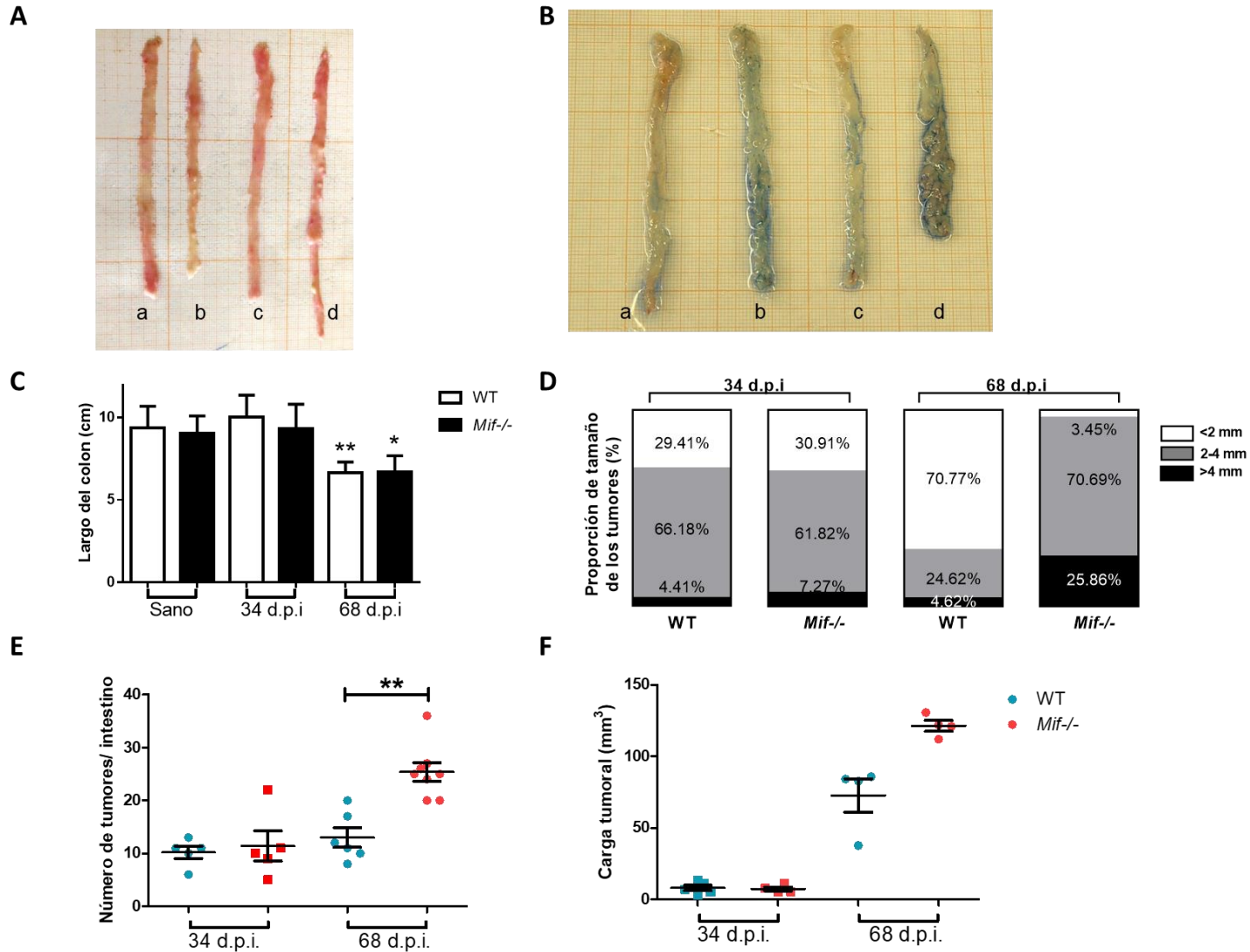


Figura 8. La ausencia de MIF permite un mayor desarrollo tumoral.

Se observan fotografías representativas comparando el largo de **(A)** los cólores a los 34 d.p.i. y **(B)** 68 d.p.i., de los grupos WT sano **(a)**, WT CCR **(b)**, *Mif*^{-/-} sano **(c)** y *Mif*^{-/-} CCR **(d)**. **(C)** Se compara el largo de los cólores (cm) (** y *) contra su respectivo control sano. Después, se abrieron los cólores longitudinalmente para exponer los tumores. Se reporta el **(D)** tamaño y **(E)** el número de tumores, con lo cual se calculó la carga tumoral **(F)**. * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$.

En ausencia de MIF, los ratones tuvieron un mayor crecimiento tumoral

Para identificar el crecimiento y patología tumoral, se obtuvieron muestras de intestino a los 34 y 68 d.p.i y se realizó la tinción de H&E + azul alcian

La morfología del tumor se relaciona con la malignidad y el pronóstico del cáncer. Por ello, se realizaron tinciones con Hematoxilina, Eosina y Azul alcian y se determinó la morfología del tumor a los 34 (Figura 9) y 68 días post inducción (Figura 10).

A los 34 d.p.i. observamos la formación de tumores tempranos en ambos grupos. En los ratones WT CCR (Figura 9A y B) observamos la pérdida de la morfología de las criptas, glándulas con ordenamiento de células caliciformes anormal y disminución de la producción de mucosa (azul), éstas glándulas conformadas por células epiteliales con bajo grado de displasia (Δ), incremento en el infiltrado inflamatorio, y en algunos tumores más grandes (Figura 9B) se observaron figuras mitóticas (\rightarrow) y células epiteliales con núcleos agrandados (*).

En los tumores *Mif*^{-/-} (Figura 9C y D) se observó también la pérdida de la morfología de las glándulas (Δ) con presencia de displasia de bajo grado, aplanamiento de los núcleos en las células epiteliales de las glándulas (*), un alto infiltrado celular en la lámina propia y la presencia de eritrocitos. En algunos tumores de mayor tamaño (Figura 9) se observó la pérdida de la producción de mucina (azul), células con displasia de alto grado (Δ) caracterizado por la total pérdida de la polaridad de los núcleos, aunque la mayoría de las células epiteliales de las glándulas presentan núcleos aplanados o de mayor tamaño (*) y la presencia de figuras mitóticas (\rightarrow). Es decir, en los tumores obtenidos a etapas tempranas, ambos grupos presentan modificaciones típicas del inicio de un proceso tumorigénico; mientras que, en aquellas muestras de tumores de mayor tamaño, los tumores *Mif*^{-/-} mostraban una mayor deformación del epitelio intestinal.

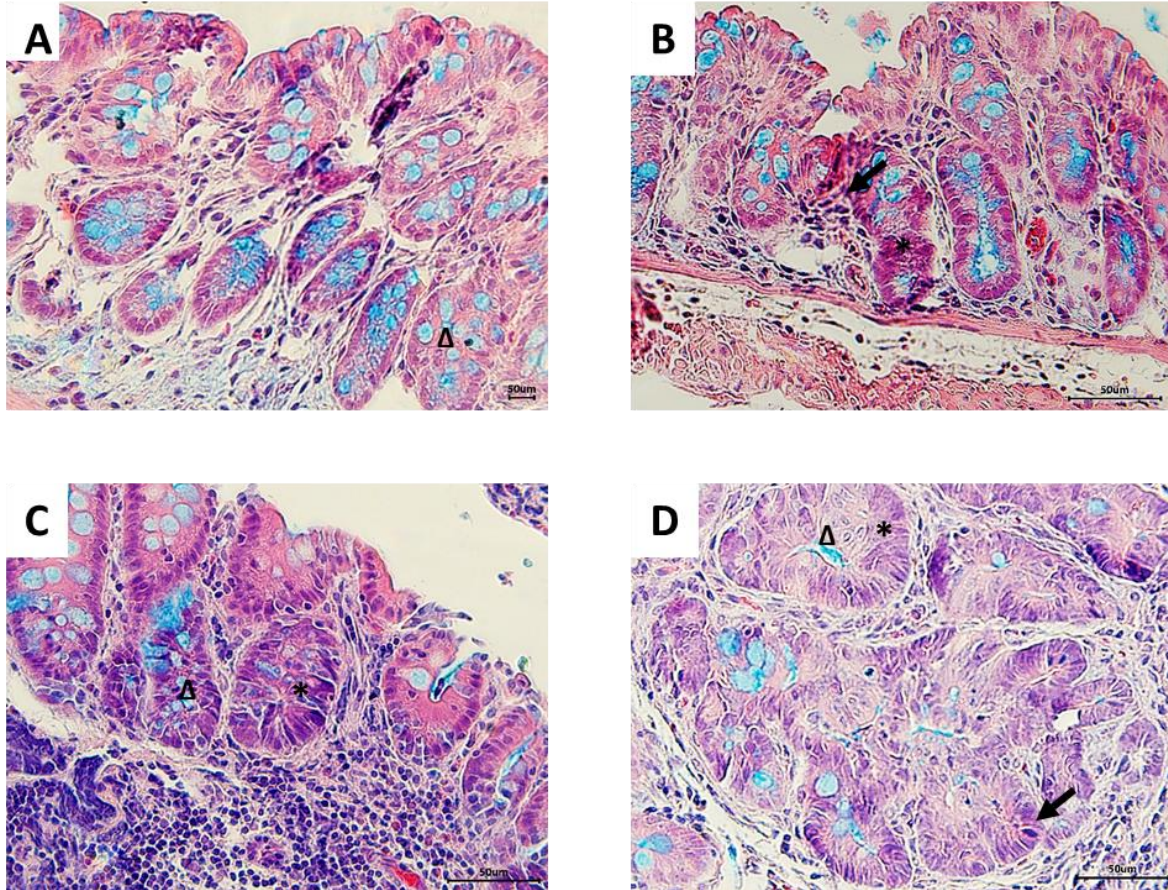


Figura 9. A los 34 d.p.i. se observan tumores tempranos en ambos grupos.

Micrografías representativas de comparativas de lesiones de tumores WT CCR (arriba) y *Mif*^{-/-} CCR (abajo). En ambos casos (A y C) se observa la pérdida de la morfología de las criptas y de las glándulas (Δ), con una menor producción de mucina (azul) y el aplanamiento de los núcleos en las células epiteliales (*). En el caso de los tumores más grandes en los WT (B), hay presencia de figuras mitóticas (\rightarrow) y núcleos agrandados (*). Mientras que en los *Mif*^{-/-} (D) además de figuras mitóticas, hay displasia de alto grado (Δ) y pérdida casi total de la producción de mucinas. Fotografías 40X.

El análisis se realizó a los 68 d.p.i. en comparación con los ratones WT Sanos (Figura 10A), los ratones *Mif*^{-/-} sanos (Figura 10B) presentan criptas de la mucosa del colon más cortas. Tanto los grupos WT CCR (Figura 10C) como *Mif*^{-/-} CCR (Figura 10D) presentan acortamiento en las criptas formadas por células epiteliales cuboidales más pequeñas que en los grupos sanos, siendo más cortas en los *Mif*^{-/-}. Las muestras provenientes de ratones *Mif*^{-/-} CCR (Figura 10D) mostraron tumores más grandes con menor diferenciación glandular (Figura 10C y D). El infiltrado celular era mayor en el grupo WT CCR que en los *Mif*^{-/-} CCR, con mayor abundancia de neutrófilos y M ϕ s en el tumor (Figura 10E y F).

Ambos grupos con CCR (Figura 10E y F) muestran adenocarcinomas polipoides bien diferenciados, con glándulas bien diferenciadas revestidas por epitelio cilíndrico estratificado

con núcleos atípicos heterocromáticos, figuras mitóticas, y algunas células necróticas libres en el lumen glandular. El epitelio no-neoplásico cerca de los tumores polipoides mostró hiperplasia y actividad regenerativa con abundantes células inflamatorias en la lámina propia. Los tumores de *Mif*^{-/-} CCR mostraron una reducción en la producción de mucina, en comparación con los WT CCR. Comparados con los ratones WT CCR (Figura 10E), los ratones *Mif*^{-/-} CCR (Figura 10F y H) mostraron tumores más grandes con glándulas menos diferenciadas y epitelio más estratificado que mostraban núcleos más grandes y figuras mitóticas más numerosas con una frecuencia atípica. En la base de estos tumores (Figura 10G), había nódulos de células poligonales no-diferenciadas que invadían la sangre y vasos sanguíneos, lo que denota mayor grado de malignidad en los tumores *Mif*^{-/-} que los tumores observados en WT CCR (Figura 10H), los cuales no exhibían estas anomalías histológicas. El infiltrado de células inflamatorias fue mayor en los tumores WT CCR, en especial de neutrófilos y Mφs que en los *Mif*^{-/-} (Figura 10G y H).

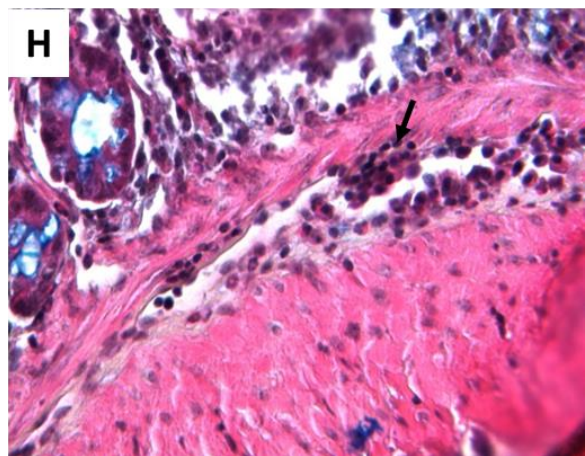
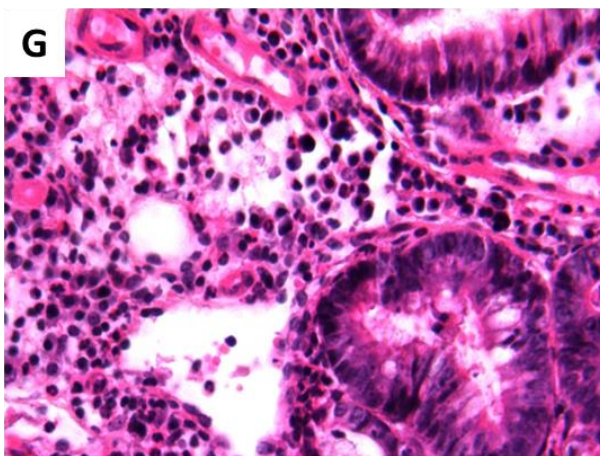
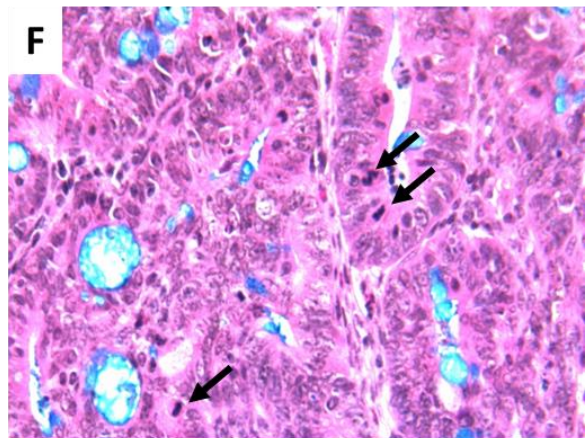
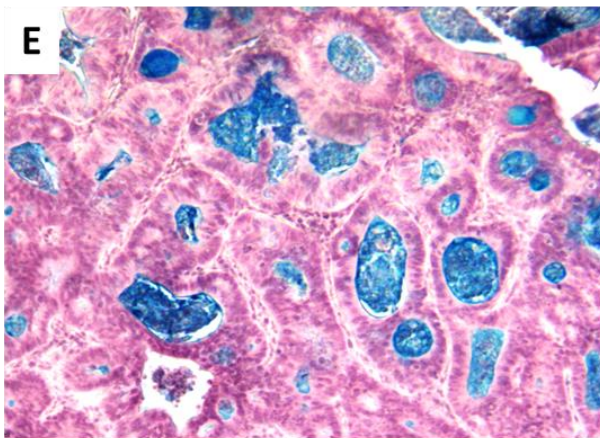
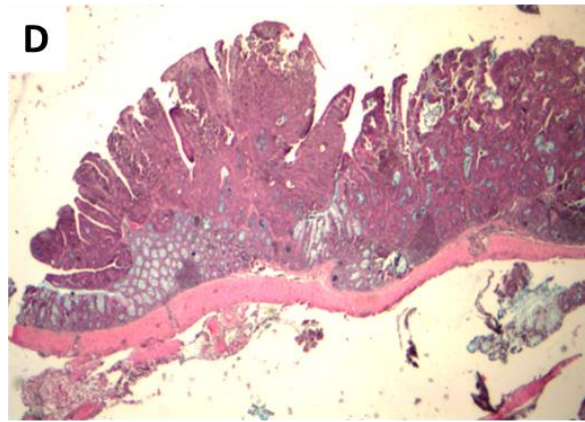
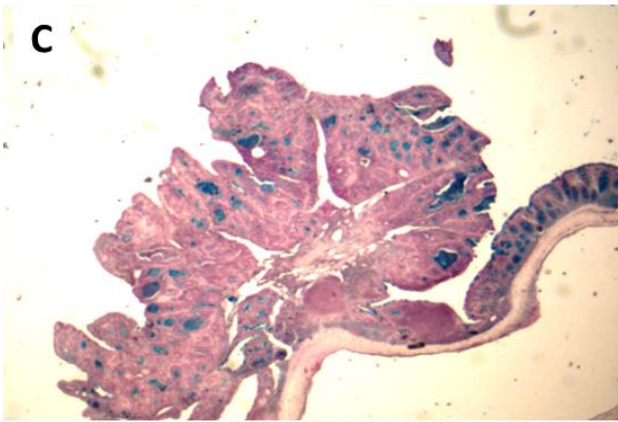
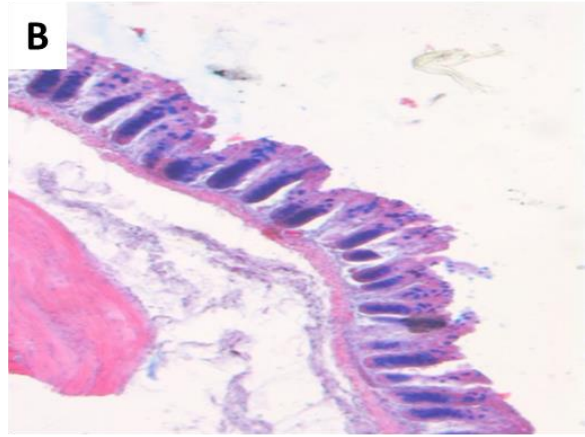
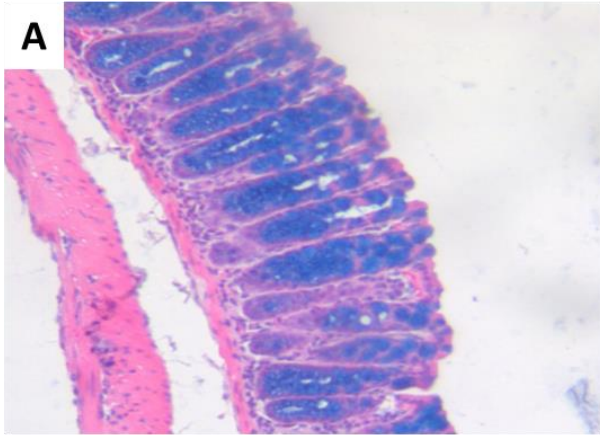


Figura 10. Los ratones deficientes de MIF desarrollan tumores menos diferenciados y de mayor tamaño después de 68 días p.i.

Micrografías representativas comparativas de lesiones en ratones WT (panel izquierdo) y *Mif*^{-/-} (panel derecho) a los 68 días después de la inyección con azoximetano. **(A)** Estructura histológica normal de la mucosa del colon de ratones WT y **(B)** *Mif*^{-/-}. **(C)** Se muestran pólipos bien diferenciados en los ratones WT y de mayor tamaño en los *Mif*^{-/-} **(D)**. **(E)** Los tumores en los ratones WT están constituidos por células neoplásicas organizadas en glándulas bien diferenciadas, en algunas se observan células necróticas separadas y abundante mucina (azul), lo que denota un adenoma bien diferenciado. **(F)** En contraste, los ratones *Mif*^{-/-} mostraron glándulas neoplásicas con un epitelio más estratificado, menor producción de mucinas y numerosas figuras mitóticas (flechas) que denotan menor grado de diferenciación. **(G)** Micrografía de la base del tumor desarrollado en WT, se muestran glándulas bien diferenciadas revestidas de células neoplásicas epiteliales que exhiben núcleos hipercrómicos, el estroma circundante muestra numerosas células inflamatorias y vasos sanguíneos distendidos. **(H)** En contraste, la base del tumor desarrollado por los ratones *Mif*^{-/-} muestra glándulas más pequeñas y menos desarrolladas, el tejido circundante (músculo liso) muestra escaso infiltrado inflamatorio y células neoplásicas cuboides, algunas de estas células están en el lumen de los vasos sanguíneos denotando invasión hematogena (flechas). Fotografías 40X.

La respuesta inmune está disminuída en los ratones Mif^{-/-}

Una de las posibles causas en la diferencia del desarrollo tumoral, es que los ratones *Mif*^{-/-} tengan una respuesta anti-tumoral disminuida, por lo tanto el sistema inmune permitiría la proliferación de las células tumorales, sin oponer tanta resistencia como en los ratones WT. Entonces evaluamos la capacidad proliferativa de los linfocitos específicos para antígenos tumorales con un re-estímulo *ex-vivo* (Figura 11). Como control de proliferación se estimuló a los linfocitos T con un anticuerpo anti-CD3 que causa la activación de los linfocitos vía TCR sin necesidad de exponerlo a antígeno.

Gracias al control y a la exposición de linfocitos de ratones sanos a antígeno de colon sano, observamos que no existen diferencias en la capacidad proliferativa entre WT y *Mif*^{-/-} a causa de la deficiencia de MIF, esto valida nuestro análisis.

Al re-exponer los linfocitos a sus respectivos antígenos tumorales, observamos una disminución en la proliferación en los *Mif*^{-/-} CCR. En el caso de los linfocitos WT, al contacto con el antígeno tumoral, la proliferación incrementó a 4746.67 ± 94.667 cuentas por minuto (CPM); diferencia notoria con aquellos linfocitos que fueron expuestos a antígeno de colon sano, cuya proliferación fue de 2045 ± 35.5 CPM. Por otro lado, la exposición de linfocitos *Mif*^{-/-} no causó un incremento en la proliferación de los linfocitos; en condiciones normales

(sanos) la proliferación detectada era de 1860 ± 6 CPM, mientras que en condiciones de CCR fue de 2150 ± 17 CPM.

Las diferencias en la proliferación de linfocitos pueden ser causadas por la inmunogenicidad del tumor o la capacidad de respuesta de los linfocitos, las cuales no fueron evaluadas; sin embargo, nos permite identificar que existe una diferencia en la respuesta inmune de los linfocitos T ante antígenos tumorales, estando disminuida en los ratones *Mif*^{-/-}.

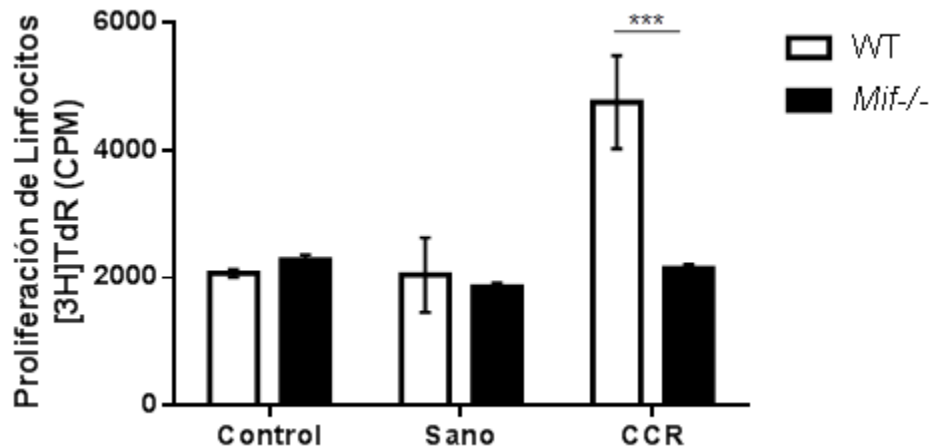


Figura 11. Respuesta ex vivo de los linfocitos ante antígeno tumoral.

Los esplenocitos de ratones WT y Mif^{-/-} fueron re expuestos a antígenos tumorales o antígenos de colon sano, provenientes del mismo grupo. Se observa la capacidad de proliferación de los linfocitos ante antígenos tumorales. La proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada ([3H] TdR se reporta en cuentas por minuto (CPM). ***p < 0.001.

En ausencia de MIF, se ve afectada la presencia de células NK en el tumor

Ya que las células NK pueden reconocer y eliminar células transformadas en las etapas iniciales del desarrollo tumoral [94] evaluamos la presencia de estas células en tumores tempranos mediante inmunohistoquímica.

A los 34 d.p.i. identificamos la presencia de células NK mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo primario anti-CD335 (Figura 12). No observamos presencia de células NK en los colonos sanos de WT (Figura 12A) ni Mif^{-/-} (Figura 12B). Identificamos una mayor presencia de células CD335+ en el epitelio de los tumores WT CCR (Figura 12C y E) en la lámina propia cercana a las zonas con presencia de células neoplásicas proliferativas

(flechas rojas) en comparación a los tumores *Mif*^{-/-} CCR (Figura 12D), incluso en zonas de alto infiltrado celular de los *Mif*^{-/-} CCR (Figura 12F).

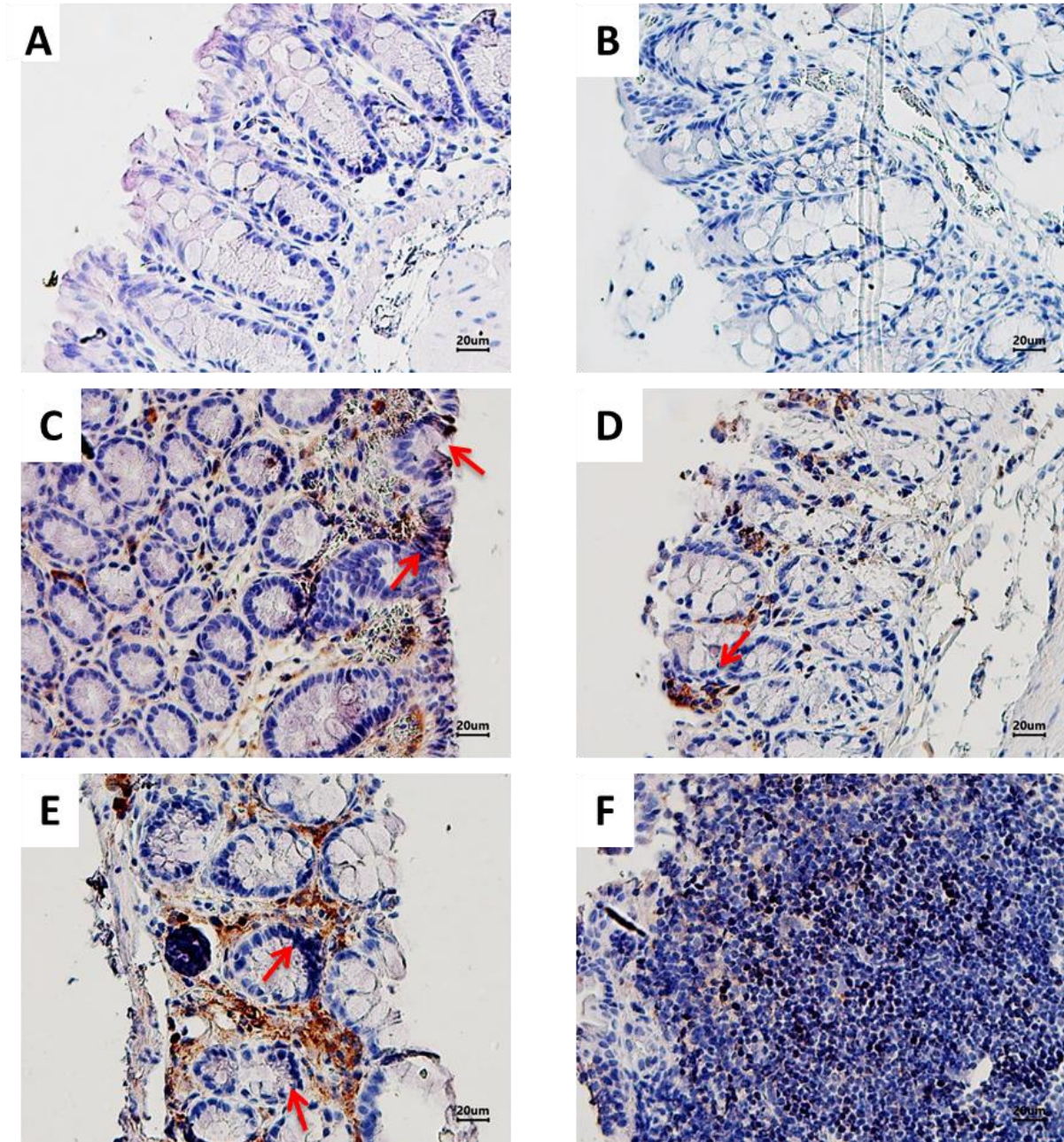


Figura 12. Identificación de células NK a los 34 d.p.i.

Micrografías representativas de cortes transversales de colon a 40X con desarrollo tumoral temprano de ratones WT (panel izquierdo) y *Mif*^{-/-} (panel derecho). Las células NK (café) se tiñeron mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo primario anti-CD335. Las muestras de tejido sano (**A y B**) no muestran presencia de células NK. En el caso de las muestras WT

CCR (C y E) y *Mif*^{-/-} CCR (D y F), se observa la acumulación de células NK en el epitelio, principalmente cerca de las zonas con presencia de células neoplásicas proliferativas. Fotografías 40X.

La deficiencia de MIF causa una menor presencia de Mφs en el tumor

Los Mφs son moduladores del microambiente tumoral y su presencia está relacionada con la deformación de las criptas del intestino en etapas tempranas. Dado que MIF es ligando de CXCR2 en Mφs, evaluamos la presencia de estos en el tumor en etapas tempranas y avanzadas mediante inmunohistoquímica, usando un anticuerpo específico para Mφs: anti-F4/80.

Los ratones sanos (Figura 13A), tanto WT como *Mif*^{-/-}, presentan una distribución uniforme de células F4/80+ en la lámina propia. Los números basales son similares entre WT y *Mif*^{-/-}, (Figura 13B y C), lo que demuestra que no hay diferencias en la presencia de estas células de manera inicial. A los 34 d.p.i. (Figura 13A) se comparó la presencia de Mφs en el área de la mucosa intestinal en zonas con lesiones tempranas. Observamos que en etapas tempranas la presencia de Mφs es mayor en ambos grupos con CCR pero no entre WT y *Mif*^{-/-} (Figura 13B). A los 68 d.p.i (Figura 13A y C) se observó un mayor número de células F4/80+ en el estroma de los tumores WT en comparación de los *Mif*^{-/-}, sin embargo, este número fue similar en el margen tumoral y en las zonas de tejido no neoplásico (sano). Demostrando que en los ratones *Mif*^{-/-} hay un menor número de Mφs en el estroma tumoral, pero no en el margen o el tejido sano.

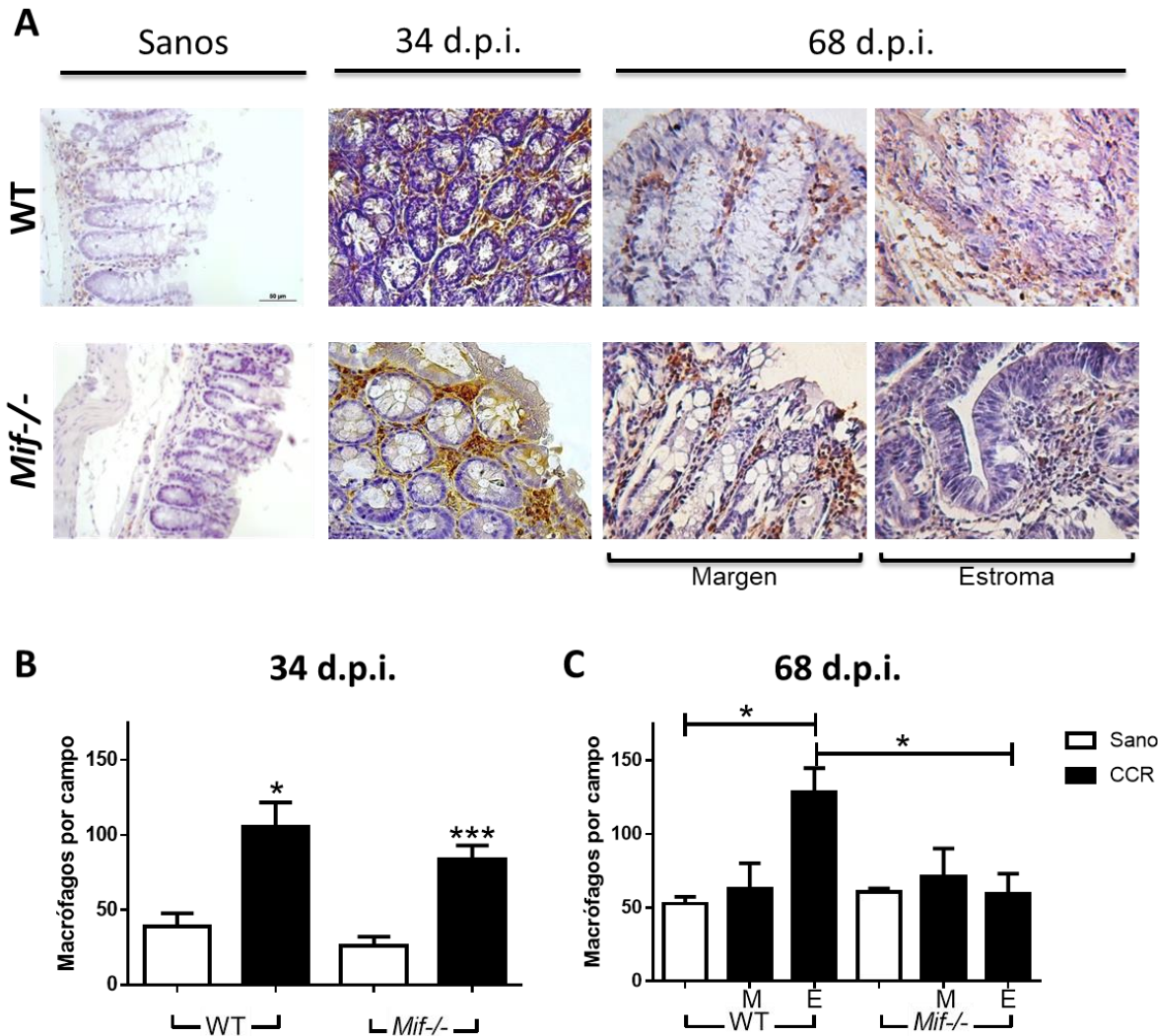


Figura 13. Identificación de Mφs en pólipos tempranos.

Se observan **(A)** fotografías representativas de cortes histológicos transversales 40X de colon sano o a los **(B)** 34 d.p.i. y **(C)** 68 d.p.i. donde se identificaron los Mφs (café) con un anticuerpo primario anti-F4/80. Se realizó un conteo de células positivas por campo a 40X, en **(B)** las lesiones tempranas y **(C)** tejido sano, el margen tumoral (M) y el estroma tumoral (E). *p < 0.1 y ***p < 0.001.

La ausencia de MIF modifica la proporción de Mφs M1/M2 en el tumor

La modulación del microambiente tumoral por parte de los Mφs no solo depende de su abundancia y localización, también de su polarización. Para ello se identificaron las células positivas para iNOS, característica del perfil M1, y para arginasa-1, característico de M2. En

conjunto, ambos marcadores permiten determinar el perfil de polarización de M ϕ s prevalente en el tumor. En los grupos sanos (Figura 14A, B, E y F) se observan algunas células aisladas que expresan iNOS o arginasa-1, sin mostrar ninguna polarización del microambiente del colon. En los ratones WT CCR (Figura 14C-D) se observó una mayor cantidad de células que expresan iNOS cercanas a las células del epitelio glandular y una menor cantidad de células que expresan arginasa-1 dispersas en la lámina propia. Es decir, en los ratones WT la polarización de los M ϕ s es principalmente M1. En los ratones *Mif*^{-/-} CCR (Figura 14G-H) la proporción y distribución de las células que expresan iNOS y arginasa-1 fue similar, demostrando la presencia de M ϕ s M1 y M2 en el microambiente intestinal.

A los 68 d.p.i. se observó que en las lesiones de WT CCR, con células displásicas y proliferativas hay una expresión abundante de iNOS (Figura 15A) y arginasa-1 (Figura 15B), principalmente en las células de la lámina propia. En las zonas con tumores más desarrollados, los ratones WT expresaban mayormente iNOS (Figura 15C), en particular en zonas cercanas al epitelio proliferativo, cercano a los márgenes tumorales, y una baja expresión de arginasa-1 (Figura 15D), asociado a zonas de infiltrado inflamatorio. Mientras que en las muestras *Mif*^{-/-} se observaba lo contrario, la expresión de iNOS (Figura 15E) fue menor en comparación a la de arginasa-1 (Figura 15F), la cual se observa en células infiltradas dentro de las glándulas y cercanas al epitelio proliferativo. Esta distribución se repite aún en las muestras con mayor grado de displasia o mayor deformación glandular (Figura 15G y H), donde además se observa una alta expresión de arginasa-1 en las células infiltradas en el epitelio y en la lámina propia.

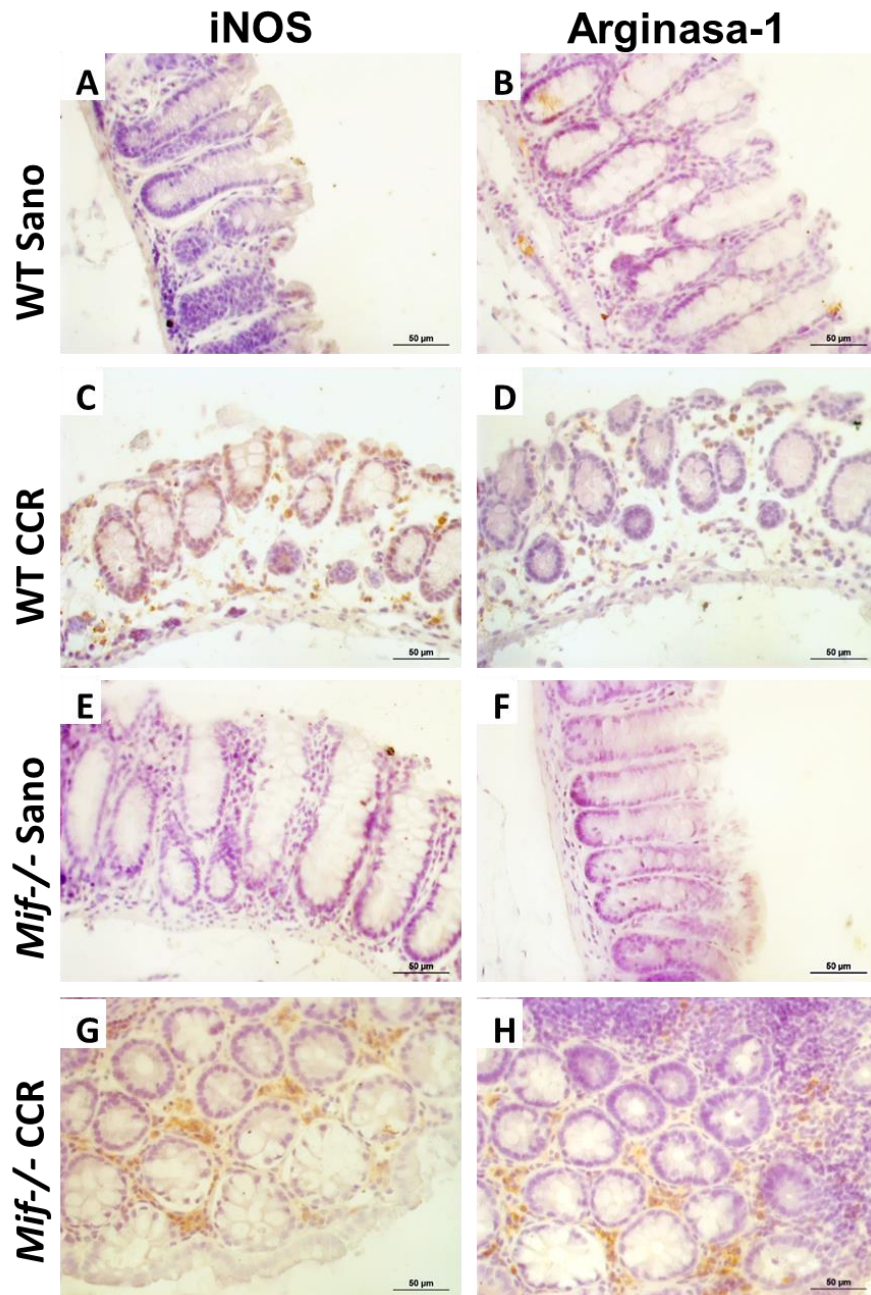


Figura 14. Identificación de Mφs a los a los 34 d.p.i.

Micrografías representativas de cortes transversales de colon a 40X con desarrollo tumoral temprano de ratones WT y *Mif*^{-/-}. Mediante inmunohistoquímica se identificaron las células positivas (café) para iNOS (panel izquierdo) y arginasa-1 (panel derecho). Las muestras de tejido sano, tanto WT (A y B) como *Mif*^{-/-} (E y F) presentan poca inmunoreacción para ambas moléculas. Las muestras WT CCR tienen una mayor expresión de iNOS (C) que de Arginasa-1. Por el contrario, en las muestras *Mif*^{-/-} se observan células reactivas tanto para iNOS (G), como para arginasa-1 (H). Fotografías 40X.

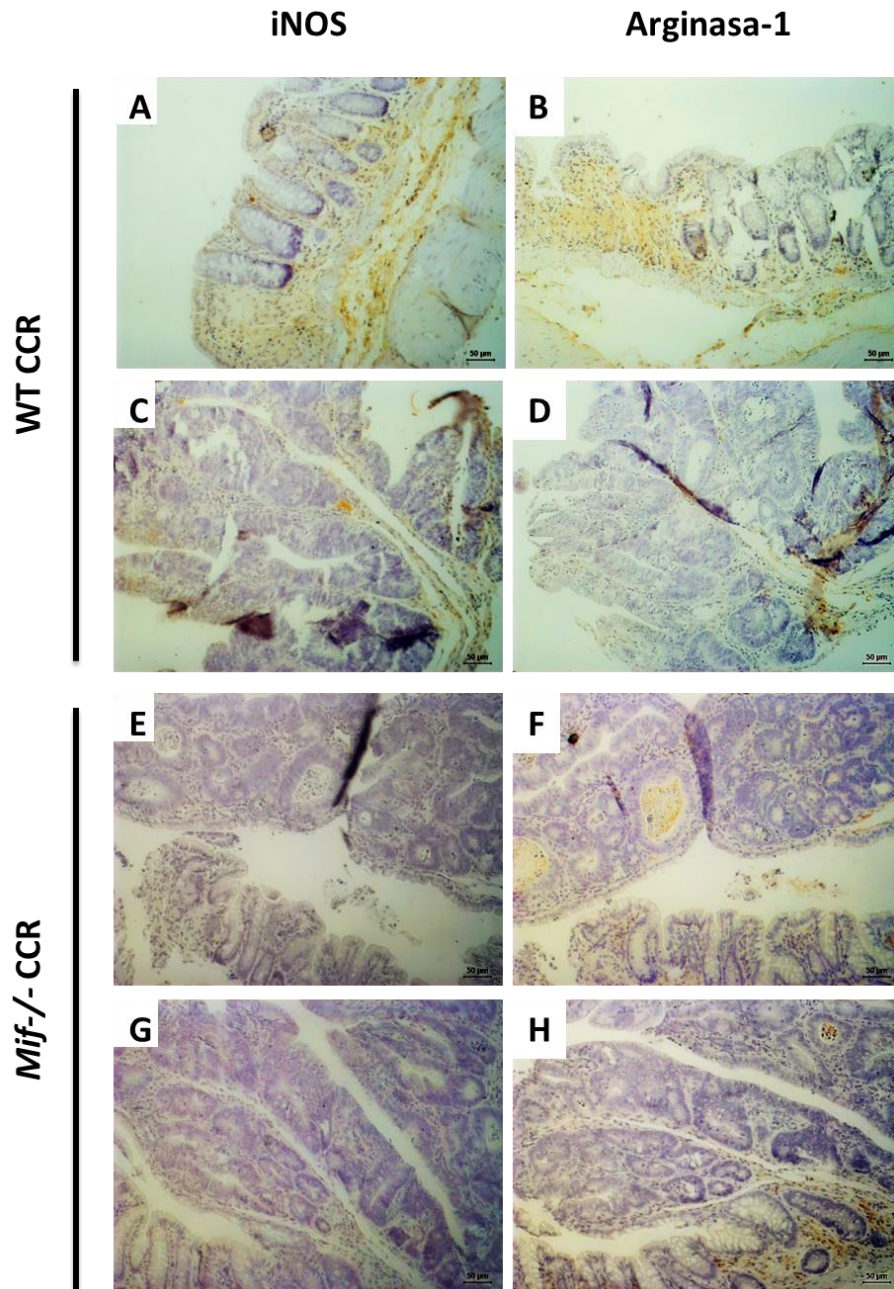


Figura 15. Identificación de Mφs a los a los 68 d.p.i.

Micrografías representativas de cortes transversales de colon a 40Xc de tumores bien desarrollados en ratones WT y *Mif*^{-/-}. Mediante inmunohistoquímica se identificaron las células positivas (café) para iNOS (panel izquierdo) y arginasa-1 (panel derecho). Las muestras WT CCR (A y C) presentan abundantes células iNOS⁺ en la lámina propia del intestino y cercanas a las células del epitelio glandular, y una menor expresión de arginasa-1 (B), principalmente localizada en el infiltrado celular y en la lámina propia (D). Mientras que en los tumores *Mif*^{-/-} hay una expresión escasa de iNOS (E) y una alta expresión de arginasa-1 (F) aún en los tumores más avanzados (G y H). Fotografías 40X.

MIF influye en el perfil inmunológico del microambiente tumoral

MIF es un importante promotor de la respuesta inflamatoria, y ya que observamos que los tumores de CCR incrementan la producción de MIF, evaluamos si esto es debido a la necesidad de potencializar la respuesta inmune antitumoral.

Expresión de genes

Primero, determinamos la expresión relativa de genes relacionados con la polarización de los linfocitos T en respuesta al microambiente tumoral. Identificamos genes asociados a la respuesta de tipo inflamatoria promotora de la citotoxicidad (Th1), anti-inflamatoria (Th2), inflamatoria (Th17) y supresora de T-reguladoras (T-regs).

A los 34 d.p.i. (Figura 16) no observamos ninguna diferencia entre la expresión de genes en WT y *Mif*^{-/-} CCR mediante RT-PCR, en las citocinas inflamatorias del perfil Th1 (Figura 16A), las anti-inflamatorias del perfil Th2 (Figura 16B); tampoco en *il-17* (Figura 16C) ni *foxp3* (Figura 16D).

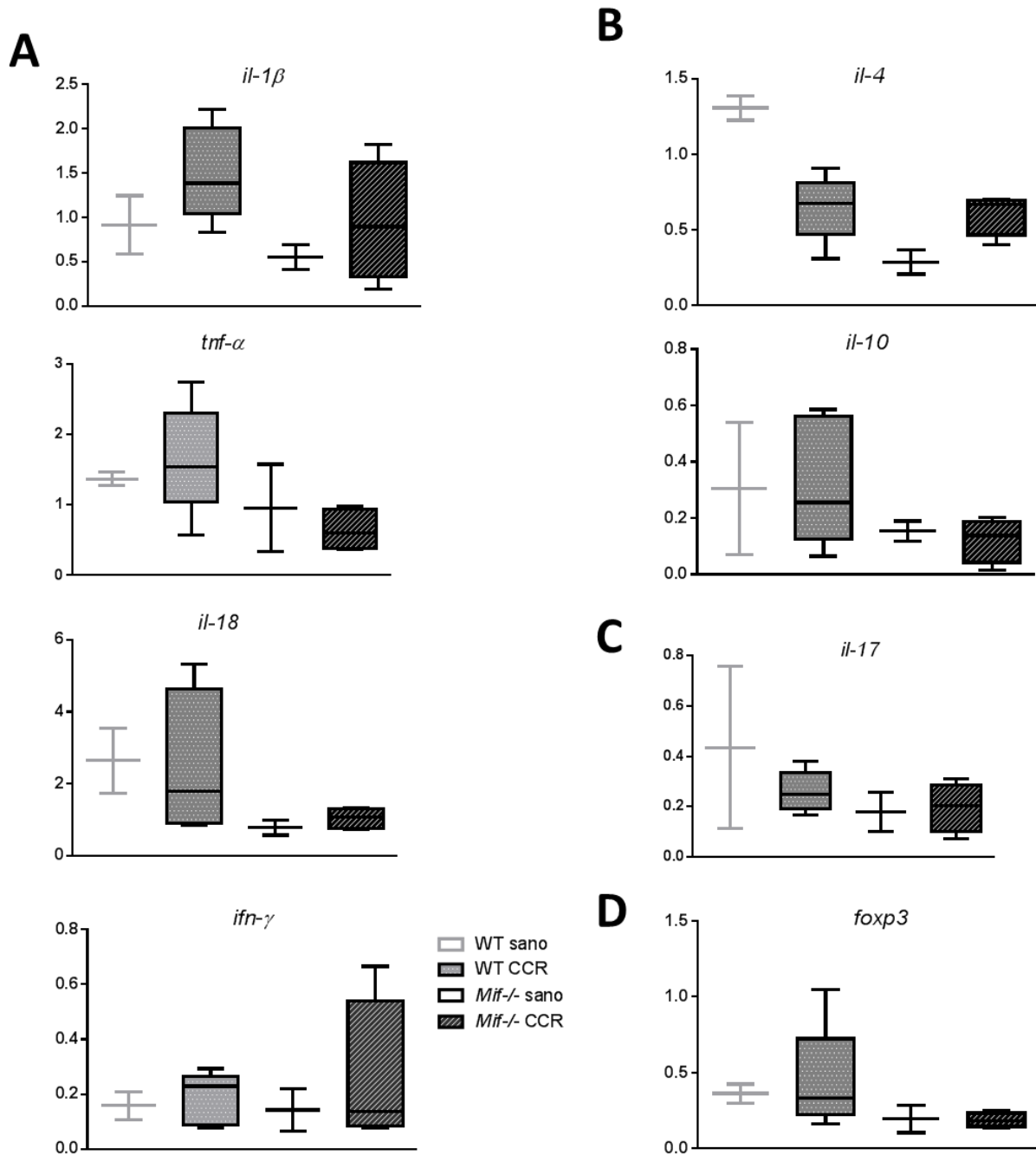


Figura 16. Expresión de genes relacionados con la respuesta inmune a los 34 d.p.i.

Se observa la expresión relativa de los genes relacionados con la respuesta Th1 (A), Th2 (B), Th17 (C) y de T-regs (D) en comparación al gen constitutivo β -actina.

A los 68 d.p.i. no se observaron diferencias significativas mediante PCR punto final en la expresión los genes que codifican para citocinas inflamatorias del perfil Th1 (Figura 17A) ni

anti-inflamatorias del perfil Th2 (Figura 17B). En el caso de las citocinas relacionadas con el perfil Th17 (Figura 17C) y T-supresor (Figura 17D), no se observaron diferencias en la expresión de *il-23*, *tgf-β* ni *foxp3*, este último analizado mediante q-PCR. Sin embargo, se observó una mayor expresión de los transcritos de *il-17* evaluada por q-PCR (Figura 17D) en el grupo de los ratones *Mif*^{-/-} CCR (*mean fold change*/ WT sano 22.864 ± 1.007), en comparación al grupo WT con CCR (*mean fold change*/ WT sano 6.226 ± 0.943).

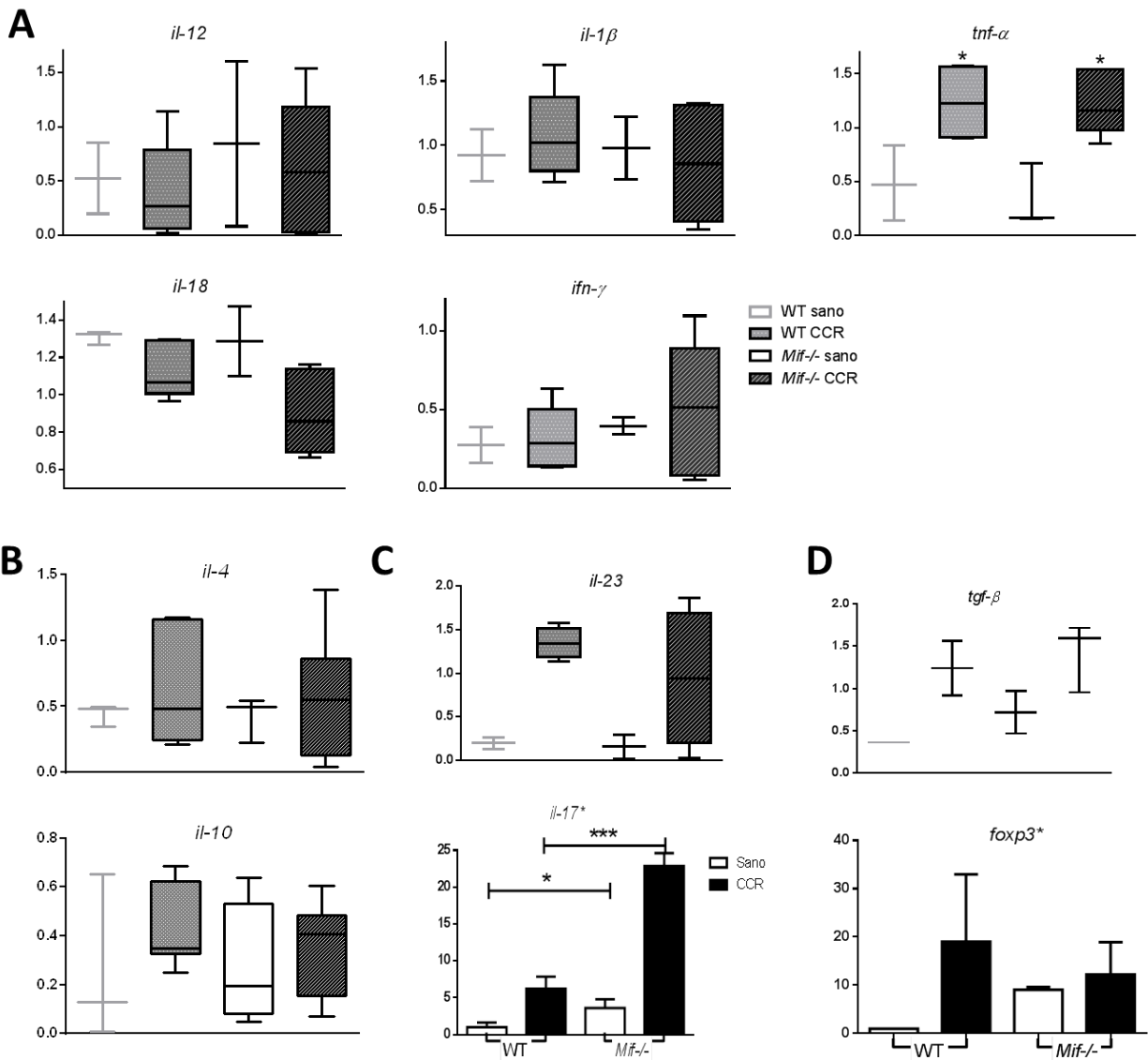


Figura 17. Expresión de genes relacionados con la respuesta inmune a los 68 d.p.i.

Se observa la expresión relativa de los genes relacionados con la respuesta Th1 (A), Th2 (B), Th17 (C) y de T-regs (D) en comparación al gen constitutivo β-actina. La expresión relativa de los genes *il-12*, *il-1β*, *tnf-α*, *il-18*, *ifn-γ*, *il-4*, *il-10*, *il-23* y *tgf-β* se midió mediante PCR

de punto final. El cambio en la expresión de los genes *il-17* y *foxp3* se evaluó mediante PCR-tiempo real. * $p < 0.1$ y *** $p < 0.001$.

Concentración de citocinas

Ya que se observó la mayor diferencia en la expresión de *il-17* a los 68 d.p.i.; se determinó la concentración de citocinas del perfil Th17 en la proteína total obtenida de colon (sano o tumoral) mediante un ensayo multiplex para detectar el panel de moléculas Th17 (Figura 18).

Observamos que no existen diferencias en la concentración de IL-17F, IL-22, IL-23, IL-31 y IL-33 entre las muestras con cáncer WT y *Mif*^{-/-} (Figura 18A). Pero sí se observó el incremento de la concentración de IL-21 en las muestras WT CCR (39.4 pg/ml), en *Mif*^{-/-} CCR (25.68 pg/ml) permaneció similar a los controles sanos. El mismo efecto se observó en la quimioquina MIP-3 α (Figura 18B), también conocida como CCL20, ya que en presencia de MIF se observa incrementada en CCR (WT= 64.19 pg/ml), mientras que la concentración en los *Mif*^{-/-} es similar (33.48 pg/ml) a los controles sanos.

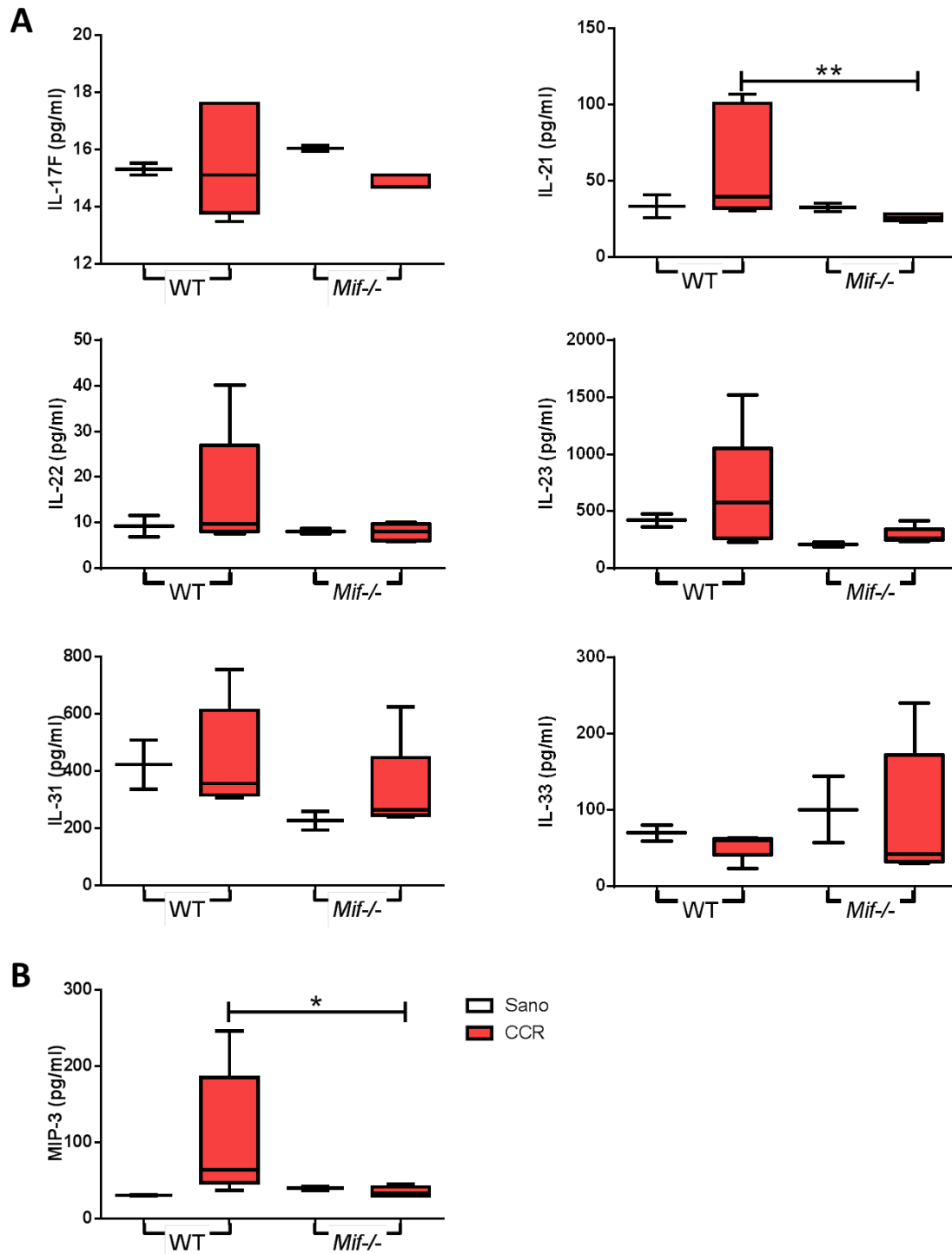


Figura 18. Concentración de moléculas relacionadas con el perfil Th17.

Se muestra la concentración de algunas (A) citocinas y (B) la quimiocina MIP-3 α (CCL-20) *in situ* relacionadas con el perfil Th17 a los 68 d.p.i. *p < 0.1 y **p < 0.01.

MIF es necesario para la generación de MDSC

Las Células Supresoras Derivadas de Mieloides (MDSC por sus siglas en inglés), son células anormalmente producidas ante la necesidad de una producción incrementada de leucocitos. Estas células generalmente son observadas en tumores avanzados, siempre con un mal pronóstico. Por ello, a los 68 d.p.i. medimos la presencia de estas células mediante citometría de flujo con el uso de los marcadores clásicos CD11b y Gr1. Identificamos tres poblaciones: células CD11b⁺ F4/80⁻ Gr1^{hi} (GR1⁺), células CD11b⁺ Gr1^{lo} F4/80⁺ (TAMs) y CD11b⁺ GR1⁻ F4/80⁺ (Macrófagos). Además, que se diferenciaron aquellos con un fenotipo similar al de Mφs con F4/80 (**Figura 19**). Observamos la ausencia de la población Gr1⁺ F4/80⁻, que se identificaron como MDSC (GR1⁺) en los tumores *Mif*^{-/-}, así como la falta de una población definida GR1⁻ F4/80⁺.

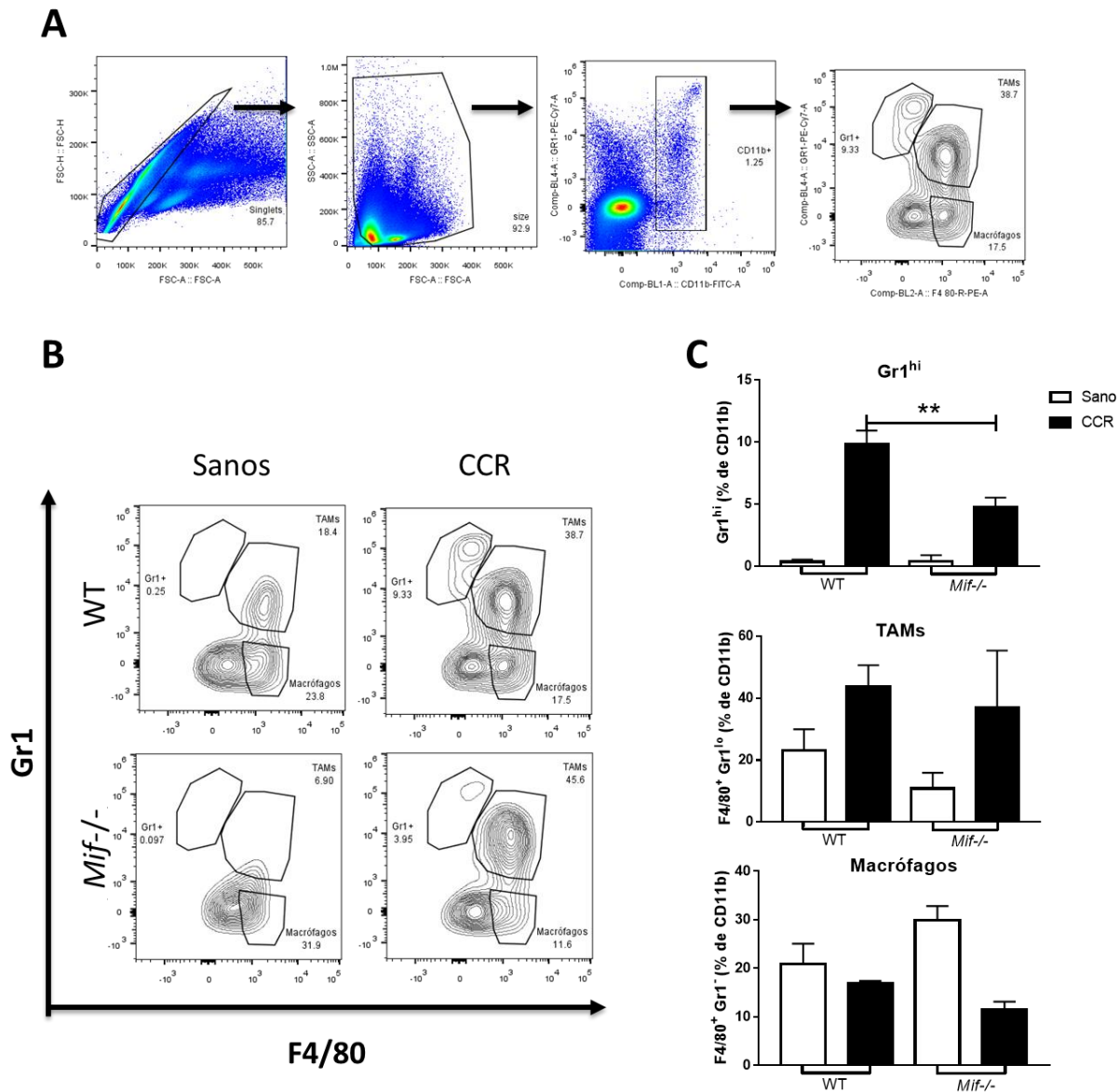


Figura 19. Poblaciones de MDSC en el tumor a los 68 d.p.i.

Se muestra la estrategia experimental (A) que se utilizó en para determinar las poblaciones celulares mediante citometría de flujo. (De izquierda a derecha) a partir de células individuales (dot plot 1: *singlets*) se eliminaron los restos celulares, analizando las células en un amplio rango de tamaños y complejidades (dot plot 2: *size*), y a partir de las células CD11b+ (dot plot 3: CD11b) se identificaron las células GR1+ F4/80- (Contour plot: GR1), GR1+ F4/80+ (Contour plot: TAMs) y GR1- F4/80+ (Contour plot: Mφs). (B) se observan contour plots representativos de cada grupo y (C) el porcentaje de cada uno con relación a la población CD11b.

10. Discusión

En el presente trabajo se estudia el papel de MIF en la respuesta inmune anti-tumoral en el desarrollo del CCR. Los estudios previos (resumidos en la sección 4.2.1) han demostrado cómo las células tumorales del colon son capaces de expresar el receptor de MIF, CD74, y usar la señalización desencadenada por esta citocina en beneficio de su supervivencia, crecimiento, proliferación y migración. Es decir, se enfocan en el efecto de MIF sobre las células tumorales. Sin embargo, este proceso es el resultado de la adaptación de las células tumorales mediante el cual “toman control” de la respuesta inmune del hospedero contra ellas. Esta tesis explica esa respuesta anti-tumoral mediada por MIF.

El modelo de CCR químico fue elegido por asemejar el proceso inflamatorio, que se observa en humanos, a través de la administración oral de DSS; además de la alta reproducibilidad y relativo bajo costo del modelo [95] . Esto nos permitió analizar la influencia del sistema inmune en el desarrollo tumoral. Otra ventaja de nuestro modelo es que los ratones *Mif*^{-/-} son completamente deficientes de MIF, aún en condiciones de cáncer. En otros modelos de CCR (resumidos en la sección 4.2.1) en ratones *Mif*^{-/-} se han implantado líneas celulares de CCR, donde al no ser líneas deficientes de MIF, producen altas concentraciones de esta citocina y por lo tanto no es posible analizar el microambiente tumoral en ausencia total de MIF. Al realizar nuestro modelo de carcinogénesis química en ratones *Mif*^{-/-}, las células tumorales comparten este genotipo; así que reportamos por primera vez las características histológicas e inmunológicas de tumores colorrectales en un sistema completamente libre de MIF.

El incremento significativo de la concentración de MIF en el suero de ratones WT CCR denota la importancia de esta citocina. Al cuantificar la concentración de MIF en suero sanguíneo durante el desarrollo de CCR pudimos observar cambios a lo largo del tiempo, posiblemente correlacione con la severidad de la enfermedad ya que el patrón de cambio es similar al del porcentaje de peso. Otros estudios como los de Legendre y Chen [73,88] sugieren esta correlación, y señalan que MIF podría ser un marcador sensible para el diagnóstico de CCR. A pesar de que no se reportan cambios en la concentración en suero de otras citocinas en

este modelo [2], es interesante el incremento significativo de MIF en sangre periférica. Posiblemente, porque MIF debe ser secretado a torrente sanguíneo para atraer a los monocitos hacia el tumor actuando como una quimioquina.

La concentración y localización de MIF dentro del tumor refleja la importancia biológica de esta citocina en el modelamiento del microambiente tumoral. En el tejido tumoral de ratones WT CCR, la concentración de MIF fue 42 veces mayor a la detectada en el tejido sano del grupo WT Sano, esto es similar a lo reportado por He en 2009, quien observó un incremento de MIF de 20-40 veces en muestras de CCR y órganos con metástasis proveniente del colon, en comparación con el tejido sano [75]. La fuente de MIF en nuestras muestras fueron las células epiteliales del tejido tumoral. Es posible observar un gradiente de expresión de MIF que correlaciona con la des-diferenciación celular, también las glándulas neoplásicas y las células del infiltrado inflamatorio, como los Mφs. Es decir, MIF se expresa mayormente en las células cercanas a los pólipos neoplásicos, posiblemente como una señal de daño que permita atraer células inflamatorias y activarlas hacia un perfil que favorezca la destrucción del tumor. Esta misma producción elevada de MIF, será utilizada de manera autócrina y parácrina por las células tumorales para favorecer su malignidad, posteriormente.

A los 34 y 68 d.p.i. se cuantificó el número y tamaño de los tumores. A los 34 d.p.i. no se observaron diferencias en la carga tumoral entre los ratones WT y *Mif*^{-/-}; mientras que a los 68 d.p.i observamos que la deficiencia total de MIF, permitió a los tumores una mayor proliferación y crecimiento. Esto sugiere que MIF no está involucrado en la tumorigénesis, si no que favorece directamente la proliferación de células tumorales como se ha reportado previamente [75,77,78]. La comparación de etapas tempranas con etapas avanzadas sugiere que el papel favorecedor del tumor sucede después de que el tumor se ha formado. Además, los tumores desarrollados por los ratones *Mif*^{-/-} son menos diferenciados y de mayor tamaño que aquellos en los ratones WT. Por otro lado, en los ratones *Mif*^{-/-} se observó una mayor pérdida de las mucinas. Las mucinas son glicoproteínas secretadas por las células caliciformes que protegen el colon y forman moco de alta densidad que recubre la mucosa. La pérdida de este moco se relaciona con el desarrollo de adenocarcinoma en el colon [95]. Esto corresponde al mayor grado de displasia, des-diferenciación celular y pérdida de la estructura de las glándulas en los ratones *Mif*^{-/-}. Como se discute previamente, MIF favorece el crecimiento tumoral, al parecer después de que el tumor se ha formado; nosotros observamos que los ratones *Mif*^{-/-} desarrollan tumores menos diferenciados y grandes. Una posible explicación es que durante las etapas tempranas la secreción de MIF atraiga células de la inmunovigilancia y favorezca el establecimiento de un microambiente tumoral que propicie la destrucción tumoral.

Para determinar si la respuesta anti-tumoral era deficiente en los ratones *Mif*^{-/-} se realizó un experimento *in vitro* donde co-cultivamos Mφs WT expuestos a antígeno tumoral (WT o *Mif*^{-/-}) junto a esplenocitos obtenidos de ratones con CCR 68 d.p.i. La proliferación rápida (24 horas) de los linfocitos al re-encontrarse con su antígeno refleja su activación y capacidad

de respuesta. Observamos que los linfocitos provenientes de ratones *Mif*^{-/-} CCR fueron incapaces de responder a antígeno tumoral proveniente de los tumores *Mif*^{-/-} como consecuencia de una respuesta inmune adaptativa anti-tumoral deficiente. Los tumores sólidos tienen mecanismos de evasión del sistema inmune [21] que pueden ser clasificados en dos grupos: la inmunomodulación del sistema inmune por las células tumorales y la pérdida de inmunogenicidad de las células tumorales [96]. En este caso, es posible que la ausencia de MIF genere un microambiente permisivo para el crecimiento tumoral. En Mφs, MIF puede activar la vía de las MAP-quinasas mediante la fosforilación de ERK1/2, la traslocación del factor de transcripción NF-κB y consecuentemente la producción de citocinas pro-inflamatorias que favorecen la proliferación y activación de los linfocitos [97]. Probablemente, ante la ausencia de MIF hay una deficiencia en la activación clásica de los Mφs, llevando a un déficit en la activación de los linfocitos *Mif*^{-/-} hacia un perfil inflamatorio. Además, MIF es un gatillo para la respuesta inflamatoria al incrementar la secreción de citocinas de tipo Th1 y Th17 [3], relacionado con la actividad citotóxica anti-tumoral [98]. Por lo que es posible que en ausencia de MIF disminuya la respuesta efectora contra las células transformadas durante la fase de “eliminación”, permitiendo el crecimiento tumoral sin oponer tanta resistencia como en los ratones WT.

Por lo tanto, identificamos el mecanismo mediante el cual MIF promueve la respuesta antitumoral al evaluar la presencia de células NK, Mφs, linfocitos, y el perfil inmunológico en el tumor en el sistema *in vivo*.

Ya que las células NK pueden reconocer y eliminar células transformadas en las etapas iniciales del desarrollo tumoral [94] y mantienen baja actividad durante el resto de la enfermedad [99] analizamos su presencia a los 34 d.p.i. Se observó la presencia de células NK cercana a las células epiteliales proliferativas y displásicas, principalmente en ratones WT, lo que refleja su papel en la inmunovigilancia como reconocedoras de las células transformadas. Mientras que en los ratones *Mif*^{-/-} se observó una menor cantidad de células NK, principalmente como parte del infiltrado inflamatorio y algunas en la lámina propia. No se ha reportado la relación directa entre MIF y la presencia de células NK. Pero es posible correlacionar la ausencia de células NK con una menor activación de Mφs y de la respuesta Th1, desencadenada por la producción de IFN-γ e IL-18 [100]. Además de que las células NK secretan quimiocinas que pueden atraer células presentadoras al tumor y aumentar la producción de otras quimiocinas que potencializan el reclutamiento de células T [101]. Sin embargo, no sabemos si la ausencia de células NK es consecuencia directa de la ausencia de MIF o indirectamente, como resultado de algún otro proceso incompleto.

Ya que MIF es ligando para CXCR2, el cual se expresa en monocitos/Mφs evaluamos la presencia de Mφs infiltrados en el tumor. Identificamos una menor cantidad de Mφs en etapas avanzadas del desarrollo tumoral en los ratones *Mif*^{-/-}; estas diferencias se identificaron en el estroma tumoral, donde se acumulan los Mφs provenientes de circulación, y no en el margen, donde se ubican los Mφs residentes. A pesar de haber inducido inflamación al inicio

del modelo, el microambiente tumoral se vuelve progresivamente inmuno-modulador, lo que permite el crecimiento del tumor [102]. En CCR la presencia de M ϕ s se relaciona con un pronóstico favorable en cuanto a la supervivencia de los pacientes, especialmente los M1, y su respuesta efectora ya ha sido reportada como parte del proceso inicial de eliminación tumoral [102].

La activación clásica de los M ϕ s está relacionada con la activación de la respuesta Th1 [102]. M1 (productores de IL-12, IL-23 y óxido nítrico [NO]) favorecen un microambiente tumoral hostil para las células transformadas pues las citocinas que secretan activan la función efectora de las células T citotóxicas [103,104]. En etapas tempranas de nuestro modelo, es clara la prevalencia de M ϕ s M1 en el tumor WT, mientras que en los tumores *Mif*^{-/-} parece haber un equilibrio entre M1/M2, es decir que la inflamación en el tumor WT era mayor. En los tumores de etapas avanzadas, vemos que en algunas muestras WT hay un equilibrio entre M1/M2, mientras que los ratones *Mif*^{-/-} ya tienen una fuerte polarización hacia M2. Es posible que la respuesta anti-tumoral de los M ϕ s sea menor y eficaz, llevando al establecimiento de un microambiente inmuno-regulatorio más pronto en los tumores *Mif*^{-/-}.

La presencia y polarización de los M ϕ s influye directamente en la activación de los linfocitos T mediante la presentación de antígeno y la secreción de citocinas. A su vez los diferentes perfiles de los linfocitos pueden ser identificados mediante las citocinas que secretan [105]. Ya que MIF es también un ligando de CXCR4, y que no hay diferencia entre el porcentaje de linfocitos T en el tumor [92], identificamos los transcritos de genes que codifican citocinas características de los diferentes perfiles de activación linfocitaria, sin embargo no se encontraron diferencias significativas, excepto en la expresión de *il-17a*, la cual es mayor en los tumores *Mif*^{-/-} que en los WT.

A continuación, evaluamos la concentración de algunas moléculas relacionadas con la respuesta Th17 en etapas tardías y encontramos que IL-21 y MIP-3 se encontraban incrementadas en los tumores del grupo WT CCR, mientras que en los tumores *Mif*^{-/-} la concentración de estas proteínas es similar a la de los controles sanos. IL-21 es una citocina principalmente producida por las células NK y CD4⁺ [106], la cual tiene propiedades inflamatorias en diferentes tipos celulares; por ejemplo, favorece la activación de los M ϕ s, la fagocitosis y la producción de IL-8, además que incrementa la supervivencia, citotoxicidad y actividad anti-tumoral de los linfocitos CD8⁺. En las NKs, IL-21 estimula la producción de IFN- γ y la granularidad [107]. IL-21 también disminuye la diferenciación y supervivencia de las células T-regs [108] y amplifica la respuesta Th17 [109]. En algunos casos se ha observado que IL-21 puede promover la transición de M2 a M1 en M ϕ s asociados a tumor [110]. Estas propiedades la relacionan con el incremento en la respuesta inmune antitumoral, que va de la mano con la polarización M1 de los M ϕ s que observamos en los tumores WT.

Además, IL-21 incrementa la secreción de MIP-3 α por las células epiteliales [111], la cual es una quimiocina (también conocida como CCL20) que se secreta en concentraciones bajas constitutivamente en estas células e incrementa en condiciones inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-21) [111]. Es por eso que observamos el incremento de IL-21 y MIP-3 α en los ratones WT, como consecuencia al proceso inflamatorio causado por la exposición a DSS, mientras que la concentración de estas citocinas en los ratones *Mif*^{-/-} es similar a las de los grupos sanos ya que como se ha reportado previamente, MIF es necesario para el establecimiento de la colitis experimental murina [112][4][3]. Es interesante como en las pruebas realizadas mediante PCR se observa un incremento en los transcritos de *il-17a* a los 68 días en los *Mif*^{-/-} CCR, pero cuando revisamos la concentración de proteínas relacionadas con Th17, IL-21 y MIP-3 α están disminuidas en este grupo. Será necesario aclarar esta discrepancia mediante un análisis minucioso sobre MIF y la respuesta Th17 en el tumor.

Finalmente analizamos la presencia de las MDSC. Estas células son características de tumores en etapas avanzadas y correlacionan con un mal pronóstico en pacientes [113]. Las MDSC son células inmaduras conformadas por subpoblaciones con características monocíticas y granulocíticas: ambas con propiedades inmuno-regulatorias que inhiben la respuesta anti tumoral [114]. Así que evaluamos la presencia de MDSC mediante citometría de flujo con el uso de los marcadores Gr1, CD11b y F4/80. La población Gr1^{hi} F4/80- representa a las MDSC (en la figura GR1+) que no tienen características de macrófagos. Estas se vieron incrementadas en los ratones WT, pero no en los *Mif*^{-/-} en condiciones de CCR. Previamente se ha señalado que MIF es necesario para la formación de MDSC [115]. Y que además, estas células expresan el receptor CXCL2, por lo cual MIF es capaz de actuar como una quimiocina sobre ellas [116], lo cual puede explicar la ausencia de esta población en los tumores *Mif*^{-/-}. Es interesante, que las MDSC poseen mecanismos inmunoregulatorios relacionados con la expresión de Arg1, PDL-1 y P-STAT3 [116], aunque esto no correlaciona con el microambiente regulatorio que observamos en los *Mif*^{-/-}. Esto puede deberse a un mecanismo alternativo, posiblemente más relacionado con las poblaciones de macrófagos M2. Observamos una población CD11b⁺ Gr1^{lo} F4/80⁺ (denominada TAMs en esta tesis), la cual se ha reportado como una población en una fase intermedia entre MDSC y M ϕ s, y que, al diferenciarse completamente en M ϕ s pueden tener un mayor efecto inmunosupresor que las mismas MDSC [117]. En nuestro caso, no observamos diferencias significativas en esta población: sin embargo, es posible que tenga un efecto en las poblaciones de M ϕ s. LA tercera población que se observó en este análisis fue una CD11b⁺ GR1⁻ F4/80⁺ (denominada Macrófagos en esta tesis). A pesar de no encontrar diferencias estadísticamente significativas, si observamos que esa población no era tan definida en los ratones *Mif*^{-/-} como lo era en los WT CCR. Es más, la distribución de las células de esta población era similar a la observada en los grupos control. Es posible entonces que la ausencia de MIF disminuya el porcentaje de células MDSC en el tumor, y a su vez esto influya en el porcentaje de macrófagos maduros en él. Sumado a la ausencia de MIF como activador de estos macrófagos hacia un perfil inflamatorio, esto explicaría el microambiente

permisivo para el desarrollo tumoral que se observó en los ratones *Mif*^{-/-}. Aún falta determinar si la deficiencia de MDSC en el tumor es directamente la causa de la disminución de macrófagos en el tumor o se trata de dos poblaciones diferentes.

En conjunto, los datos presentados en esta tesis demuestran que MIF favorece la respuesta inmune anti-tumoral al favorecer la quimiotaxis de monocitos que se polarizaran a Mφs hacia tumor, en especial del tipo M1 y la presencia de células NK. Mientras que la ausencia de esta citocina resulta en la desregulación de la respuesta Th17 y un mayor crecimiento tumoral. MIF contrarresta el crecimiento de tumores colorrectal colorrectales al favorecer la respuesta inflamatoria, posiblemente desde etapas tempranas. Por otro lado, su papel pro-tumoral, reportado ampliamente por diversos autores, podría ocurrir en etapas avanzadas del desarrollo tumoral, cuando las células tumorales que expresan CD74 han sido seleccionadas.

La aparente discrepancia entre los estudios previos mencionados en la sección 4.2.1 y los obtenidos en esta tesis se deben principalmente a dos factores: el modelo experimental y que nuestro estudio se enfoca en la respuesta inmune (no en los procesos propios de las células tumorales).

En el caso del modelo experimental, nosotros utilizamos un modelo completamente deficiente de MIF, en el cual, además, el tumor se desarrolló a partir de células sanas y fue pasando por los diferentes estadios; desde la presencia de focos de criptas aberrantes, hasta que las células transformadas prevalecientes desarrollaron tumores con diversos grados de diferenciación. En algunos de los modelos previos se utilizaron líneas celulares tumorigénicas, las cuales no permitían observar la interacción de MIF con el microambiente inflamatorio temprano y su efecto en la transición hacia células tumorales. Además de que las líneas celulares implantadas no son completamente deficientes de MIF. Esto concuerda con el estudio realizado por Choi en 2012 [90] donde se generaron tumores mediante la implantación de la línea celular CT26 en ratones *Mif*^{-/-}. Este trabajo demuestra que los linfocitos T (tanto T-reguladores como T citotóxicos) son atraídos específicamente hacia el tumor en los ratones *Mif*^{-/-} debido a las altas concentraciones de MIF generadas por las células CT26. Es decir, que el microambiente inmunológico generado en ese tumor no necesariamente responde al genotipo del ratón (en ese caso, deficiente de MIF). La relevancia de nuestro modelo es justamente la generación de un microambiente sin MIF, que da origen a células tumorales que no son productoras de MIF. Esto nos permitió aclarar el papel de esta citocina desde el desarrollo de los primeros pólipos, hasta la interacción del sistema inmune con tumores de mayor tamaño.

Es necesario aclarar que en esta tesis se estudió la respuesta inmune, a diferencia de muchos de los trabajos que se han hecho en cuanto a MIF y CCR. Los antecedentes presentados en la sección 4.2.1. definen claramente cómo MIF es utilizado por las células tumorales a su favor, principalmente en etapas avanzadas del desarrollo tumoral. En nuestro

caso observamos cómo MIF es necesario para la activación del sistema inmune innato favoreciendo la presencia de NKs y macrófagos en el tumor, y limitando la polarización de macrófagos hacia un perfil anti-inflamatorio. También, que su producción aumenta con la presencia de células epiteliales menos diferenciadas. Además de que es claro que tiene un impacto en la producción de citocinas y en la formación de MDSC en etapas avanzadas. Es decir, que MIF puede tener diferentes papeles dependiendo con el momento del desarrollo tumoral; en etapas iniciales favorece la respuesta inmune innata anti-tumoral, mientras que en etapas avanzadas las células transformadas lo utilizan a su favor, y además permite el desarrollo de MDSC.

11. Conclusión

MIF participa en la promoción de la respuesta inmune anti-tumoral en etapas tempranas al favorecer la quimiotaxis de macrófagos, su polarización hacia M1 y consecuentemente la activación de la respuesta inflamatoria (Th1), indispensable en la eliminación del tumor. La ausencia de MIF favorece la activación alternativa de los macrófagos (M2) y la inducción de una respuesta inflamatoria Th17 que no elimina las células tumorales, pero promueve el crecimiento tumoral.

12. Perspectivas

Ya hemos demostrado que MIF participa en la contención del crecimiento de tumores colorrectales al favorecer la respuesta inflamatoria desde el inicio de la enfermedad. Es posible que el papel pro-tumoral de MIF se lleve a cabo en etapas avanzadas. Proponemos realizar un estudio en ratones WT con CCR, donde se administre un inhibidor de MIF a diferentes tiempos del desarrollo de cáncer, para evaluar el impacto en el desarrollo, malignidad y perfil inmunológico del tumor. Al mismo tiempo, evaluar la expresión de CD74 durante las diversas etapas del modelo permitirá determinar cuándo la terapia anti-MIF sería viable al relacionarla con las condiciones del micro ambiente tumoral. También, proponemos realizar un estudio a profundidad sobre la relación entre la presencia de macrófagos y MDSC en el tumor, y evaluar si estos mecanismos dependen de MIF; incluso si existe una transición entre el fenotipo de ambas poblaciones. En conjunto, esto permitirá predecir un éxito o fracaso de la terapia anti-MIF contra el cáncer colorrectal.

13. Bibliografía

1. What Is Cancer? - National Cancer Institute (2015) 2015. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
2. OMS (2018) Cáncer, 2018. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
3. GLOBOCAN Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, all cancers, both sexes, all ages. 2018. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/home>.
4. GLOBOCAN Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, Mexico, both sexes, all ages. Available from: <http://gco.iarc.fr/today/home>.
5. American Cancer Society (2018) Signos y síntomas del cáncer colorrectal, 2018. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-colon-o-recto/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/senales-y-sintomas.html>.
6. Bretthauer M (2011) Colorectal cancer screening. *Journal of Internal Medicine* 270: 87–98.
7. American Cancer Society Pruebas de detección del cáncer de colon: ¿cuáles son las opciones? Available from: <https://www.cancer.org/es/noticias-recientes/pruebas-de-deteccion-del-cancer-de-colon.html>.
8. Lee H, Rhee H, Kang HJ, et al. (2008) Macrophage Migration Inhibitory Factor May Be Used as an Early Diagnostic Marker in Colorectal Carcinomas. *Am J Clin Pathol* 129: 772–779.
9. American Cancer Society (2018) Treatment of Colon Cancer, by Stage, 2018. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/colon-rectal-cancer/treating/by-stage-colon.html>.
10. Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2015) Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 65: 5–29.
11. Itzkowitz SH, Yio X (2004) Inflammation and Cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 287: G7–G17.
12. Al-Sukhni W, Aronson M, Gallinger S (2008) Hereditary colorectal cancer syndromes: familial adenomatous polyposis and lynch syndrome. *Surg Clin North Am* 88: 819–844, vii.
13. de la Chapelle A (2004) Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 4: 769–780.
14. Kanth P, Grimmett J, Champine M, et al. (2017) Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management. *Official journal of the American College of Gastroenterology / ACG* 112: 1509–1525.
15. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, et al. (2010) Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology* 138: 2101–2114.e5.
16. Bernstein CN, Blanchard JF, Kliwer E, et al. (2001) Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer* 91: 854–862.
17. Abbas AKL, Pillai Shiv H (2015) Inmunología celular y molecular.
18. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646–674.
19. Schottenfeld D, Beebe-Dimmer J (2006) Chronic inflammation: a common and important factor in the pathogenesis of neoplasia. *CA Cancer J Clin* 56: 69–83.
20. Kumari S, Badana AK, G MM, et al. (2018) Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. *Biomark Insights* 13.
21. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ (2011) Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 331: 1565–1570.
22. Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF (2016) Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene* 35: 5931–5941.
23. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD (2006) Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nature Reviews Immunology* 6: 836–848.
24. Bhatia A, Kumar Y (2011) Cancer-Immune Equilibrium: Questions Unanswered. *Cancer Microenviron* 4: 209–217.

25. Liu VC, Wong LY, Jang T, et al. (2007) Tumor Evasion of the Immune System by Converting CD4+CD25- T Cells into CD4+CD25+ T Regulatory Cells: Role of Tumor-Derived TGF- β . *The Journal of Immunology* 178: 2883–2892.
26. Thomas DA, Massagué J (2005) TGF- β directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell* 8: 369–380.
27. O'Malley G, Treacy O, Lynch K, et al. (2018) Stromal Cell PD-L1 Inhibits CD8+ T-cell Antitumor Immune Responses and Promotes Colon Cancer. *Cancer Immunol Res* 6: 1426–1441.
28. Kalyan A, Kircher S, Shah H, et al. (2018) Updates on immunotherapy for colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol* 9: 160–169.
29. Leng L, Metz CN, Fang Y, et al. (2003) MIF Signal Transduction Initiated by Binding to CD74. *Journal of Experimental Medicine* 197: 1467–1476.
30. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, et al. (2007) MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 13: 587–596.
31. Calandra T, Roger T (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 3: 791–800.
32. Maaser C, Eckmann L, Paesold G, et al. (2002) Ubiquitous production of macrophage migration inhibitory factor by human gastric and intestinal epithelium. *Gastroenterology* 122: 667–680.
33. Nishino T, Bernhagen J, Shiiki H, et al. (1995) Localization of macrophage migration inhibitory factor (MIF) to secretory granules within the corticotrophic and thyrotrophic cells of the pituitary gland. *Mol Med* 1: 781–788.
34. Bucala R (2000) A most interesting factor. *Nature* 408: 146–147.
35. Frölich D, Blassfeld D, Reiter K, et al. (2012) The anti-CD74 humanized monoclonal antibody, milatuzumab, which targets the invariant chain of MHC II complexes, alters B-cell proliferation, migration, and adhesion molecule expression. *Arthritis Res Ther* 14: R54.
36. Wilson KM, Labeta MO, Pawelec G, et al. (1993) Cell-surface expression of human histocompatibility leucocyte antigen (HLA) class II-associated invariant chain (CD74) does not always correlate with cell-surface expression of HLA class II molecules. *Immunology* 79: 331–335.
37. Shi X, Leng L, Wang T, et al. (2006) CD44 Is the Signaling Component of the Macrophage Migration Inhibitory Factor-CD74 Receptor Complex. *Immunity* 25: 595–606.
38. Lindner R (2017) Invariant Chain Complexes and Clusters as Platforms for MIF Signaling. *Cells* 6.
39. Henne C, Schwenk F, Koch N, et al. (1995) Surface expression of the invariant chain (CD74) is independent of concomitant expression of major histocompatibility complex class II antigens. *Immunology* 84: 177–182.
40. Fan H, Hall P, Santos LL, et al. (2011) Macrophage migration inhibitory factor and CD74 regulate macrophage chemotactic responses via MAPK and Rho GTPase. *J Immunol* 186: 4915–4924.
41. Gore Y, Starlets D, Maharshak N, et al. (2007) Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces B Cell Survival by Activation of a CD74-CD44 Receptor Complex.
42. Starlets D, Gore Y, Binsky I, et al. (2006) Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood* 107: 4807–4816.
43. Fingerle-Rowson G, Petrenko O (2007) MIF coordinates the cell cycle with DNA damage checkpoints. Lessons from knockout mouse models. *Cell Div* 2: 22.
44. Biorender (2020).
45. Schwartz V, Lue H, Kraemer S, et al. (2009) A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett* 583: 2749–2757.
46. Gold DV, Stein R, Burton J, et al. (2010) Enhanced expression of CD74 in gastrointestinal cancers and benign tissues. *Int J Clin Exp Pathol* 4: 1–12.
47. Zheng Y-X, Yang M, Rong T-T, et al. (2012) CD74 and macrophage migration inhibitory factor as therapeutic targets in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 18: 2253–2261.

48. De R, Sarkar S, Mazumder S, et al. (2018) Macrophage migration inhibitory factor regulates mitochondrial dynamics and cell growth of human cancer cell lines through CD74-NF- κ B signaling. *J Biol Chem* 293: 19740–19760.
49. McClelland M, Zhao L, Carskadon S, et al. (2009) Expression of CD74, the receptor for macrophage migration inhibitory factor, in non-small cell lung cancer. *Am J Pathol* 174: 638–646.
50. Nagata S, Jin Y-F, Yoshizato K, et al. (2009) CD74 is a novel prognostic factor for patients with pancreatic cancer receiving multimodal therapy. *Ann Surg Oncol* 16: 2531–2538.
51. Meyer-Siegler KL, Iczkowski KA, Leng L, et al. (2006) Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *J Immunol* 177: 8730–8739.
52. Binsky I, Haran M, Starlets D, et al. (2007) IL-8 secreted in a macrophage migration-inhibitory factor- and CD74-dependent manner regulates B cell chronic lymphocytic leukemia survival. *Proceedings of the National Academy of Science* 104: 13408–13413.
53. Burton JD, Ely S, Reddy PK, et al. (2004) CD74 is expressed by multiple myeloma and is a promising target for therapy. *Clin Cancer Res* 10: 6606–6611.
54. Maharshak N, Cohen S, Lantner F, et al. (2010) CD74 is a survival receptor on colon epithelial cells. *World J Gastroenterol* 16: 3258–3266.
55. Beswick EJ, Reyes VE (2009) CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 15: 2855–2861.
56. O'Reilly C, Doroudian M, Mawhinney L, et al. (2016) Targeting MIF in Cancer: Therapeutic Strategies, Current Developments, and Future Opportunities. *Med Res Rev* 36: 440–460.
57. Conroy H, Mawhinney L, Donnelly SC (2010) Inflammation and cancer: macrophage migration inhibitory factor (MIF)--the potential missing link. *QJM* 103: 831–836.
58. Bucala R, Donnelly SC (2007) Macrophage migration inhibitory factor: a probable link between inflammation and cancer. *Immunity* 26: 281–285.
59. Yasasever V, Camlica H, Duranyildiz D, et al. (2007) Macrophage migration inhibitory factor in cancer. *Cancer Invest* 25: 715–719.
60. Dai S-X, Zou Y, Feng Y-L, et al. (2012) Baicalin down-regulates the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) effectively for rats with ulcerative colitis. *Phytother Res* 26: 498–504.
61. Ohkawara T, Takeda H, Nishihira J, et al. (2001) Essential role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the pathogenesis of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice: Amelioration of colocal damage by anti-MIF antibody. *Gastroenterology* 120: A693–A694.
62. Nishihira J (2012) Molecular function of macrophage migration inhibitory factor and a novel therapy for inflammatory bowel disease. *Ann N Y Acad Sci* 1271: 53–57.
63. Ludwiczek O, Tauber M, Kaser A, et al. (2001) Overexpression of macrophage migratory inhibitory factor (MIF) in human inflammatory bowel disease (IBD). *Gastroenterology* 120: A525.
64. Shen Y, Guo S, Yang T, et al. (2013) The -173 G/C Polymorphism of the MIF Gene and Inflammatory Bowel Disease Risk: A Meta-Analysis. *Int J Mol Sci* 14: 11392–11401.
65. Yang J, Li Y, Zhang X (2015) Meta-analysis of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene -173G/C polymorphism and inflammatory bowel disease (IBD) risk. *Int J Clin Exp Med* 8: 9570–9574.
66. Oliver J, Márquez A, Gómez-García M, et al. (2007) Association of the macrophage migration inhibitory factor gene polymorphisms with inflammatory bowel disease. *Gut* 56: 150–151.
67. Dambacher J, Staudinger T, Seiderer J, et al. (2007) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) -173G/C promoter polymorphism influences upper gastrointestinal tract involvement and disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 13: 71–82.
68. Mrowicki J, Przybyłowska-Sygut K, Dziki L, et al. (2014) The role of polymorphisms of genes CXCL12/CXCR4 and MIF in the risk development IBD the Polish population. *Mol Biol Rep* 41: 4639–4652.

69. Griga T, Wilkens C, Wirkus N, et al. (2007) A polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor gene is involved in the genetic predisposition of Crohn's disease and associated with cumulative steroid doses. *Hepatogastroenterology* 54: 784–786.
70. Fei B-Y, Lv H-X, Yang J-M, et al. (2008) Association of MIF-173 gene polymorphism with inflammatory bowel disease in Chinese Han population. *Cytokine* 41: 44–47.
71. Shiroeda H, Tahara T, Nakamura M, et al. (2010) Association between functional promoter polymorphisms of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene and ulcerative colitis in Japan. *Cytokine* 51: 173–177.
72. Shkolnik T, Livni E, Reshef R, et al. (1987) The macrophage migration inhibition (MIF) assay as a marker of colorectal cancer. Studies in patients with colorectal cancer, noncolonic neoplasms, and conditions predisposing to colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 30: 101–105.
73. Chen WT-L, Chang S-C, Ke T-W, et al. (2011) Identification of biomarkers to improve diagnostic sensitivity of sporadic colorectal cancer in patients with low preoperative serum carcinoembryonic antigen by clinical proteomic analysis. *Clin Chim Acta* 412: 636–641.
74. Thorsen SB, Lundberg M, Villablanca A, et al. (2013) Detection of serological biomarkers by proximity extension assay for detection of colorectal neoplasias in symptomatic individuals. *J Transl Med* 11: 253.
75. He X-X, Chen K, Yang J, et al. (2009) Macrophage migration inhibitory factor promotes colorectal cancer. *Mol Med* 15: 1–10.
76. Ramireddy L, Chen WT-L, Peng C-T, et al. (2015) Association Between Genetic Polymorphism of the MIF Gene and Colorectal Cancer in Taiwan. *J Clin Lab Anal* 29: 268–274.
77. Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, et al. (1998) Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth. *Mol Med* 4: 707–714.
78. Ioannou K, Cheng KF, Crichlow GV, et al. (2014) ISO-66, a novel inhibitor of macrophage migration, shows efficacy in melanoma and colon cancer models. *Int J Oncol* 45: 1457–1468.
79. Burger JA, Kipps TJ (2006) CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107: 1761–1767.
80. Dessein A-F, Stechly L, Jonckheere N, et al. (2010) Autocrine induction of invasive and metastatic phenotypes by the MIF-CXCR4 axis in drug-resistant human colon cancer cells. *Cancer Res* 70: 4644–4654.
81. Sun B, Nishihira J, Yoshiki T, et al. (2005) Macrophage migration inhibitory factor promotes tumor invasion and metastasis via the Rho-dependent pathway. *Clin Cancer Res* 11: 1050–1058.
82. Willier S, Butt E, Grunewald TGP (2013) Lysophosphatidic acid (LPA) signalling in cell migration and cancer invasion: a focussed review and analysis of LPA receptor gene expression on the basis of more than 1700 cancer microarrays. *Biol Cell* 105: 317–333.
83. Shin H-N, Moon H-H, Ku J-L (2012) Stromal cell-derived factor-1 α and macrophage migration-inhibitory factor induce metastatic behavior in CXCR4-expressing colon cancer cells. *International Journal of Molecular Medicine* 30: 1537–1543.
84. Hogan NM, Joyce MR, Murphy JM, et al. (2013) Impact of mesenchymal stem cell secreted PAI-1 on colon cancer cell migration and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 435: 574–579.
85. Morris KT, Nofchissey RA, Pinchuk IV, et al. (2014) Chronic macrophage migration inhibitory factor exposure induces mesenchymal epithelial transition and promotes gastric and colon cancers. *PLoS ONE* 9: e98656.
86. Gordon-Weeks AN, Lim SY, Yuzhalin AE, et al. (2015) Macrophage migration inhibitory factor: a key cytokine and therapeutic target in colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 26: 451–461.
87. Baxalta now part of Shire (2019) A Phase 1 Open-Label Study to Assess the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Anti-MIF Antibody in Subjects With Malignant Solid Tumors, clinicaltrials.gov.

88. Legendre H, Decaestecker C, Nagy N, et al. (2003) Prognostic values of galectin-3 and the macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human colorectal cancers. *Mod Pathol* 16: 491–504.
89. Yao K, Shida S, Selvakumararan M, et al. (2005) Macrophage Migration Inhibitory Factor Is a Determinant of Hypoxia-Induced Apoptosis in Colon Cancer Cell Lines | Clinical Cancer Research. *Clinical Cancer Res.*
90. Choi S, Kim H-R, Leng L, et al. (2012) Role of macrophage migration inhibitory factor in the regulatory T cell response of tumor-bearing mice. *J Immunol* 189: 3905–3913.
91. Neufert C, Becker C, Neurath MF (2007) An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc* 2: 1998–2004.
92. Pacheco Fernández T, Rodríguez Sosa M (2015) El papel de mif en el cáncer de colon asociado a colitis en un modelo murino.
93. Takahashi M, Wakabayashi K (2004) Gene mutations and altered gene expression in azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rodents. *Cancer Sci* 95: 475–480.
94. Mandal A, Viswanathan C (2015) Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 8: 47–55.
95. De Robertis M, Massi E, Poeta ML, et al. (2011) The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *J Carcinog* 10: 9.
96. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X (2013) Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology* 14: 1014–1022.
97. Bucala R, Bernhagen J (Eds.) (2017) MIF Family Cytokines in Innate Immunity and Homeostasis, Springer International Publishing.
98. Xu H-M (2014) Th1 cytokine-based immunotherapy for cancer. *HBPD INT* 13: 482–494.
99. Bassani B, Baci D, Gallazzi M, et al. (2019) Natural Killer Cells as Key Players of Tumor Progression and Angiogenesis: Old and Novel Tools to Divert Their Pro-Tumor Activities into Potent Anti-Tumor Effects. *Cancers (Basel)* 11.
100. Zwirner NW, Ziblat A (2017) Regulation of NK Cell Activation and Effector Functions by the IL-12 Family of Cytokines: The Case of IL-27. *Front Immunol* 8: 25.
101. Allen F, Bobanga ID, Rauhe P, et al. (2018) CCL3 augments tumor rejection and enhances CD8+ T cell infiltration through NK and CD103+ dendritic cell recruitment via IFN γ . *Oncoimmunology* 7: e1393598.
102. Yahaya M a. F, Lila M a. M, Ismail S, et al. (2019) Tumour-Associated Macrophages (TAMs) in Colon Cancer and How to Reeducate Them. *J Immunol Res* 2019: 2368249.
103. Sica A, Larghi P, Mancino A, et al. (2008) Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 18: 349–355.
104. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM (2012) Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol* 33: 119–126.
105. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313: 1960–1964.
106. Coquet JM, Kyparissoudis K, Pellicci DG, et al. (2007) IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. *J Immunol* 178: 2827–2834.
107. Gharibi T, Majidi J, Kazemi T, et al. (2016) Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases. *Immunobiology* 221: 357–367.
108. Kato H, Perl A (2018) Blockade of Treg Cell Differentiation and Function by the Interleukin-21-Mechanistic Target of Rapamycin Axis Via Suppression of Autophagy in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, NJ)* 70: 427–438.
109. Wei L, Laurence A, Elias KM, et al. (2007) IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem* 282: 34605–34610.
110. Li S, Wang W, Fu S, et al. (2013) IL-21 modulates release of proinflammatory cytokines in LPS-stimulated macrophages through distinct signaling pathways. *Mediators Inflamm* 2013: 548073.

111. Caruso R, Fina D, Peluso I, et al. (2006) A Functional Role for Interleukin-21 in Promoting the Synthesis of the T-Cell Chemoattractant, MIP-3 α , by Gut Epithelial Cells - *Gastroenterology*. *Gastroenterology*.
112. de Jong YP, Abadia-Molina AC, Satoskar AR, et al. (2001) Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nat Immunol* 2: 1061–1066.
113. Limagne E, Euvrard R, Thibaudin M, et al. (2016) Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX–Bevacizumab Drug Treatment Regimen. *Cancer Res* 76: 5241–5252.
114. Umansky V, Blattner C, Gebhardt C, et al. (2016) The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. *Vaccines* 4: 36.
115. Simpson KD, Cross JV (2013) MIF: metastasis/MDSC-inducing factor? *Oncoimmunology* 2.
116. Zhang H, Ye Y-L, Li M-X, et al. (2017) CXCL2/MIF-CXCR2 signaling promotes the recruitment of myeloid-derived suppressor cells and is correlated with prognosis in bladder cancer. *Oncogene* 36: 2095–2104.
117. Hamilton MJ, Bosiljic M, LePard NE, et al. (2014) Macrophages Are More Potent Immune Suppressors Ex Vivo Than Immature Myeloid-Derived Suppressor Cells Induced by Metastatic Murine Mammary Carcinomas. *The Journal of Immunology* 192: 512–522.

14. Anexo de técnicas

Apéndice I: Técnicas histológicas

13.1.1 Paraformaldehido amortiguado (PFA)

Agregar 4 g de paraformaldehido a 80 ml de PBS. Calentar a 60°C y agregar unas gotas de NaOH 1M hasta disolver. Cuando la solución se vuelva transparente, dejar enfriar. Ajustar pH a 7.4 y aforar a 100 ml con PBS.

13.1.2 Tren de deshidratación e Inclusión del tejido

1.	PFA	24 horas
2.	Agua corriente	30 min
3.	Etanol 50%	30 min
4.	Etanol 60%	20 min
5.	Etanol 70%	20 min
6.	Etanol 80%	20 min
7.	Etanol 85%	20 min
8.	Etanol 90%	20 min
9.	Etanol 96%	20 min
10.	Etanol 100% (1)	20 min
11.	Etanol 100% (2)	20 min
12.	Alcohol-amílico (1)	20 min
13.	Alcohol-amílico (2)	20 min
14.	Parafina (1)	1 hora
15.	Parafina (2)	1 hora

16. Inclusión en Paraplast

13.1.3 Hidratación de tejidos

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

1.	Xilol (1)	5 min
2.	Xilol (2)	5 min
3.	Etanol 100%	5 min
4.	Etanol 96%	5 min
5.	Etanol 80%	5 min
6.	Etanol 70%	5 min
7.	Agua corriente	5 min

13.1.4 Tren de tinción Hematoxilina y Eosina (H&E) + Azul alción

1.	Ácido acético	1 min
1.	Azul alción	20 min
2.	Agua destilada	Enjuagar
3.	Hematoxilina	4 min
4.	Agua corriente	Enjuagar
5.	HCl 0.25%	2-3 seg
6.	Agua corriente	Enjuagar
7.	Etanol 70%	1 min
8.	Eosina	1 min
9.	Etanol 96%	30-60 seg
10.	Etanol 100%	30 seg
11.	Etanol 100%	30 seg
12.	Xilol	5 min
13.	Montar con Resina Entellan	

13.1.5 Técnica de inmunohistoquímica

1. Recuperación antigénica con Búfer DIVA durante 10 min a 95°C en olla exprés. Dejar enfriar las laminillas por 2 h a temperatura ambiente.
2. H₂O₂ 3% disuelto en metanol 10 min
3. Lavar con PBS-Tween 0.5%
4. *Blocking solution (1A)* 10 min
5. Lavar con PBS-Tween 0.5%
6. Anticuerpo primario Toda la noche a 4°C
7. Lavar con PBS-Tween 0.5%
8. *HRP polymer conjugate (1B)* 10-20 min
9. Lavar con PBS-Tween 0.5%

10.	<i>Enzyme conjugate (2)</i>	10 min
11.	Lavar con PBS-Tween 0.5%	
12.	DAB	6 min
13.	Lavar con PBS-Tween 0.5%	
14.	Agua destilada	5 min
15.	Hematoxilina de Harris	40 seg
16.	Lavar con agua corriente	
17.	Agua amoniacal 3%	15 seg
18.	Agua destilada	5 min
19.	Etanol 96%	3 min
20.	Etanol Absoluto	3 min
21.	Xilol I	3 min
22.	Xilol II	3 min
23.	Montar con Entellan	

Diaminobencidina (DAB):

Solución Stock A: 0.1 g de DAB en 10 ml de Agua destilada. Una vez disuelto, agregar 2-3 gotas de 10N HCl hasta que la solución adquiera un color ligeramente café. Agitar en hielo durante 10 min hasta que la DAB se disuelva completamente.

Solución Stock B: Preparar antes de usar 100 µl de H₂O₂ 30% en 10 ml de agua destilada y mezclar.

Solución de trabajo: Agregar 250 µl de la solución A y 250 µl de la solución B a 5 ml de PBS con pH de 7.2. Se menciona como DAB en el procedimiento (paso 12).

Búfer DIVA:

Disolver 2.94 g de citrato de sodio en 800 ml de H₂O destilada, mezclar hasta disolver. Ajustar pH a 6 con HCl 1N. Aforar a 1 L. Agregar 0.5 ml de Tween.

Anticuerpos primarios:

Disolver los anticuerpos en PBS-BSA recién preparado de acuerdo con la Tabla 1. El tiempo de incubación del anticuerpo secundario *Biotinilated second antibody (1B)* depende del anticuerpo primario; en caso de que la especie huésped del anticuerpo primario sea de rata el tiempo de incubación del secundario es de 20 min. Si el anticuerpo primario es de cualquier otra especie, el tiempo de incubación es de 10 min.

Anticuerpo	Concentración	Especie Hospedera	No. Catálogo
F4/80	1:200	Rata	Biologned 123102
iNOS	1:200	Conejo	GTX31048
Arginasa-1	1:500	Conejo	PA5-29645

MIF	1:200	Conejo	sc-20121
CD335	1:100	Rata	BD 560754

Apéndice 2. Amplificación de los transcritos de genes mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Primers

	Secuencia	TM (°C)	Amplicón (pb)
<i>mif</i> F	5'- TGCCCAGAACCGCAACTACAGTAA-3'	60	218
<i>mif</i> R	5'-TCGCTACCGGTGGATAAACACAGA-3'		
<i>il-17</i> F	5'-TCCCTCCGCATTGACACA-3'	60	83
<i>il-17</i> R	5'-ACCGCAATGAAGACCCTGAT-3'		
<i>il-18</i> F	5'-ACTGTACAACCGCAGTAATACG-3'	58	434
<i>il-18</i> R	5'-AGTGAACATTACAGATTTATCCC-3'		
<i>il-10</i> F	5'-ACCTGGTAGAAGTGATGCCCCAGGCA-3'	56	237
<i>il-10</i> R	5'-CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAAA-3'		
<i>il-4</i> F	5'-CGAAGAACACAGAGAGTGAGCT-3'	58	180
<i>il-4</i> R	5'-GACTCATTTCATGGTGCAGCTTATCG-3'		
<i>il-1β</i> F	5'-GAGTGTGGATCCCAAGCAAT-3'	59	520
<i>il-1β</i> R	5'-CTCAGTGCAGGCTATGACCA-3'		
<i>foxp3</i> F	5'-GGCCCTTCTCCAGGACAGA-3'	60	112
<i>foxp3</i> R	5'-GCTGATCATGGCTGGGTTGT-3'		
<i>arg-1</i> F	5'-CAGAAGAATGGAAGAGTCAG-3'	55	250
<i>arg-1</i> R	5'-CAGATATGCAGGGAGTCACC-3'		
<i>inos</i> F	5'-CTGGAGGAGCTCCTGCCTCATG-3'	62	449
<i>inos</i> R	5'-GCAGCATCCCCTCTGATGGTG-3'		
<i>actin-β</i> F	5'-TTTGATGTCACGCACGATTTCC-3'	60	514
<i>actin-β</i> R	5'-TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3'		

Condiciones del ciclado

Paso del ciclado	Condiciones del paso	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C por 3 min	1

Desnaturalización	94°C por 30 seg	40
Alineación	Variable por 30 seg	
Extensión	72°C por 1 min	
Extensión final	72°C por 5 min	1
Enfriamiento	4°C por 10 min	1

Apéndice 3. Obtención de células de *lamina propria* de colon

1. Obtener el colon, lavarlo y abrirlo longitudinalmente
2. Incubar el colon en 10 ml de HBSS (SIGMA) + 2 mM EDTA + 2% SFB + 1% pen/step (SIGMA) a 37°C durante 30 min en agitación (250 rpm).
3. Lavar y cortar en piezas <5 mm
4. Incubar 4 ml de DMEM + 2 mg/ml Colagenasa tipo IV (SIGMA) + 10% SFB + 40 mg/ml DNasa I (SIGMA) + 1% pen/strep a 37°C durante 1 hr (250 rpm).
5. Pasar la solución resultante por un separador celular Strainer (Falcon) de 100 µm y después por uno de 40 µm.
6. Lavar las células con 5 ml de DMEM 10% + 10% SFB + 1% pen/strep. Centrifugar a 1500 rpm por 10 min. Realizar dos lavados.
7. Resuspender en 4 ml de Percoll 30% en DMEM completo y depositar sin romper el gradiente sobre 4 ml de Percoll 70%.
8. Centrifugar 2000 rpm 25 min con Aceleración 0 a temperatura ambiente
9. Obtener el anillo celular que se forma entre ambas fases.
- 10.** Lavar con 10 ml de DMEM, contar y teñir para citometría de flujo

14 Artículos publicados durante los estudios de doctorado (total 9)

14.1 Artículos relacionados con cáncer de colon y/o MIF

1. Pacheco-Fernández, T., Juárez-Avelar, I., Illescas, O., Terrazas, L. I., Hernández-Pando, R., Pérez-Plasencia, C., Gutiérrez-Cirlos, E. B., Ávila-Moreno, F., Chirino, Y. I., Reyes, J. L., Maldonado, V., & Rodríguez-Sosa, M. (2019). Macrophage Migration Inhibitory Factor Promotes the Interaction between the Tumor, Macrophages, and T Cells to Regulate the Progression of Chemically Induced Colitis-Associated Colorectal Cancer. *Mediators of inflammation*, 2019, 2056085. <https://doi.org/10.1155/2019/2056085>
2. Oscar Illescas, Thalia Pacheco-Fernández, Juan P. Laclette, Tonathiu Rodriguez, Miriam Rodriguez-Sosa (2020). Immune modulation by the macrophage migration inhibitory factor (MIF) family: D-dopachrome tautomerase (DDT) is not (always) a backup system. *Cytokine*, 2020, 155121. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155121>
3. Olgúin, J. E., Medina-Andrade, I., Molina, E., Vázquez, A., Pacheco-Fernández, T., Saavedra, R., Pérez-Plasencia, C., Chirino, Y. I., Vaca-Paniagua, F., Arias-Romero, L. E., Gutierrez-Cirlos, E. B., León-Cabrera, S. A., Rodríguez-Sosa, M., & Terrazas, L. I. (2018). Early and Partial Reduction in CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells during Colitis-Associated Colon Cancer Induces CD4+ and CD8+ T Cell Activation Inhibiting Tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 9(2), 239–249. <https://doi.org/10.7150/jca.21336>
4. Rodríguez-Sosa, M., Cabellos-Avelar, T., Sanchez-Zamora, Y., Juárez-Avelar, I., García-Reyes, E., Lira-León, A., Benítez-Flores, J., Pacheco-Fernández, T., Hiriart, M., & Gutiérrez-Cirlos, E. B. (2017). Proinflammatory cytokine MIF plays a role in the pathogenesis of type-2 diabetes mellitus, but does not affect hepatic mitochondrial function. *Cytokine*, 99,214–224. doi.org/10.1016/j.cyto.2017.07.012

14.2 Artículos relacionados con otros tipos de cáncer

5. Muñoz-Galindo, L., Melendez-Zajgla, J., Pacheco-Fernández, T., Rodríguez-Sosa, M., Mandujano-Tinoco, E. A., Vazquez-Santillan, K., Castro-Oropeza, R., Lizarraga, F., Sanchez-Lopez, J. M., & Maldonado, V. (2019). Changes in the transcriptome profile of breast cancer cells grown as spheroids. *Biochemical and biophysical research communications*, 516(4), 1258–1264. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.155>
6. Greta Volpedo, Thalia Pacheco-Fernández, Marianna de Carvalho Clímaco, Abhay R. Satoskar (2020). Chapter 4: The Fas/FasL Pathway as a Target for Enhancing Anti-cancer Adoptive Cell Therapy. Libro: Sensitizing agents for cancer resistant to cell mediated immunotherapy. Vol. 2. Immunotherapy in resistant cancer: from the lab bench work to its clinical perspectives. Elsevier.

14.3 Artículos relacionados con la respuesta inmune ante parásitos

7. Rodríguez, T., Pacheco-Fernández, T., Vázquez-Mendoza, A., Nieto-Yañez, O., Juárez- M Avelar, I., Reyes, J. L., Terrazas, L. I., & Rodríguez-Sosa, M. (2020). MGL1 Receptor Plays a Key Role in the Control of T. cruzi Infection by Increasing Macrophage Activation through Modulation of ERK1/2, c-Jun, NF-κB and NLRP3 Pathways. *Cells*, 9(1), 108. <https://doi.org/10.3390/cells9010108>
8. Thalia Pacheco-Fernandez, Greta Volpedo, Chaitenya Verma and Abhay R Satoskar (2021). Understanding the immune responses involved in mediating protection or immunopathology during Leishmaniasis. *Biochem Soc Trans.* 2021 Feb 26;49(1):297-311. doi: 10.1042/BST20200606.
9. Thalia Pacheco Fernandez, Greta Volpedo, Sreenivas Gannavaram, Parna Bhattacharya, Ranadhir Dey, Abhay Satoskar, Greg Matlashewski, Hira L Nakhasi (2021). Revival of Leishmanization and Leishmanin. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 17 March 2021 | <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.639801>