



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN

FACULTAD DE MEDICINA.

Rol del eje HDAC6/STAT3 en la regulación de la expresión de moduladores inmunitarios en cáncer colorrectal

POR

Constanza Mardones Molina

Tutor: Dr. Matías Hepp
Departamento de Ciencias Básicas y Morfología
Facultad de Medicina
Universidad Católica de la Santísima Concepción

Co- Tutora: Dra. Valentina González
Departamento de Ciencias Básicas y Morfología
Facultad de Medicina
Universidad Católica de la Santísima Concepción

Evaluador externo: Dr. Fernando Cruzat,
Universidad de Concepción.
Evaluador interno: Dr. Carlos Farkas,
Universidad Católica de la Santísima Concepción.

2022

Concepción, Chile



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN

FACULTAD DE MEDICINA.

Rol del eje HDAC6/STAT3 en la regulación de la expresión de moduladores inmunitarios en cáncer colorrectal

POR

Constanza Mardones Molina

Tutor: Dr. Matías Hepp
Departamento de Ciencias Básicas y Morfología
Facultad de Medicina
Universidad Católica de la Santísima Concepción

Co- Tutora: Dra. Valentina González
Departamento de Ciencias Básicas y Morfología
Facultad de Medicina
Universidad Católica de la Santísima Concepción

Evaluador externo: Dr. Fernando Cruzat,
Universidad de Concepción.
Evaluador interno: Dr. Carlos Farkas,
Universidad Católica de la Santísima Concepción.

2022

Concepción, Chile

Acta de tesis

Agradecer al Dr. Matías Hepp, a la Dra. Valentina González, compañeros de laboratorio, familia y amigos, por acompañarme en este gran e importante proceso.

Resumen.

El cáncer es una de las enfermedades más frecuentes a nivel mundial y, en la actualidad, los fracasos del tratamiento se deben a la resistencia farmacológica o a la baja tasa de éxito de los enfoques convencionales. En particular, el cáncer colorrectal (CCR) es una de las neoplasias malignas más comunes según la OMS, representa la segunda causa de muerte por tumores en el mundo, por lo que existe la necesidad de estudiar nuevas estrategias para futuras terapias, como la inmunoterapia dirigida a bloquear los puntos de control inmunitarios, para controlar las vías inmunomoduladoras. Sin embargo, existen varios pacientes que no responden a esta terapia, por lo que es necesario buscar tratamientos alternativos o adyuvantes. La histona desacetilasa 6 (HDAC6), una proteína principalmente citoplasmática, está implicada en varios procesos celulares, incluida la respuesta inmune, estando involucrada en la progresión tumoral. En concreto, se ha observado que HDAC6 estimula la actividad de *Signal transducer and activador of transcription 3* (STAT3), un factor de transcripción implicado en la inmunogenicidad, que juega un papel como inductor transcripcional de diferentes genes, como es PD-L1. La sobreexpresión de diferentes inmunomoduladores en algunas células cancerosas promueve la desregulación de la activación de los linfocitos T. Por lo tanto, nos centraremos en la inhibición farmacológica de HDAC6 en células CCR debido a su potencial como terapia adyuvante para evitar la inmunotolerancia en inmunoterapia contra el cáncer. Para resolver esto, investigamos si HDAC6 afecta la activación de STAT3 en células CCR, mediante tratamientos con Nexturastat A (NextA), un inhibidor específico de HDAC6. Observando que NextA es menos citotóxico que el paninhibidor de HDAC como Panobinostat. Esto, disminuyó la expresión de ARNm y proteína de PD-L1 después del tratamiento con NextA y modificó los niveles de las modificaciones postraduccionales en STAT3 analizados por Western blot. Luego, tratamos las células con Interleukin-6 (IL-6) y NextA, observando la funcionalidad de los cambios descritos anteriormente sobre STAT3 por RT-qPCR, western blot, citometría de flujo e inmunofluorescencia, donde observamos los cambios de localización cuando se fosforila STAT3. Finalmente, a través de un RNaseq en condiciones duales, se observó una reducción en la expresión de genes comunes involucrados en vías inmunomoduladoras en células de CCR. Estos resultados sugieren que los tratamientos con un inhibidor específico de HDAC6 reducirían la funcionalidad de STAT3 en las células de CCR, lo que afectaría la expresión de los genes inmunomoduladores implicados en la respuesta inflamatoria e inmunitaria. Por lo tanto, el uso de inhibidores específicos de HDAC6 puede ser una estrategia adyuvante razonable e interesante para ayudar en la inmunoterapia, ya que los inhibidores de HDAC6 disminuirían la expresión de diferentes inmunomoduladores de la respuesta inmune.

Palabras claves: Histonas deacetilasa, cáncer colorrectal, inmunomoduladores, inhibidores.

Abstract.

Cancer is one of the most frequent diseases worldwide and currently, treatment failures are caused by pharmacological resistance or low success rate of conventional approaches. In particular, colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignant neoplasms according to the WHO, represents the second cause of death from tumors in the world. Which is why there is a need to study new strategies for future therapies, like the immunotherapy aimed at blocking the immune checkpoints, to control immunomodulators pathways. However, there are several patients who don't respond to this therapy, making it necessary to search for alternative or adjuvant treatments. Histone deacetylase 6 (HDAC6), a mainly cytoplasmic protein, is involved in several cellular processes including the immune response, being involved in tumor progression. Specifically, it has been observed that HDAC6 stimulates Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activity, a transcription factor involved in immunogenicity, which plays a role as a transcriptional inducer of different genes in these pathways, as PD-L1. The over-expression of different immunomodulators on some cancer cells promotes deregulation of T lymphocyte activation. Therefore, we will focus on pharmacological inhibition of HDAC6 in CRC cell due to its potential as an adjuvant therapy to avoid immunotolerance in cancer immunotherapy. We investigate whether HDAC6 affects STAT3 activation in CRC cells, through treatments with Nexturastat A (NextA), a specific HDAC6 inhibitor. First, we showed that NextA is less cytotoxic than HDAC paninhibitor like Panobinostat. The treatment with Next A decreases the expression of PD-L1 mRNA and protein, after NextA treatment and modified the levels of activating post-translational modifications on STAT3 analyzed by Western blot. Then, we treat the cells with Interleukin-6 (IL-6) and NextA, observing the functionality of the changes described above over the STAT3 by RT-qPCR, western blot, flow cytometry and immunofluorescence. Finally, through a RNAseq assay in dual conditions, showed a reduced expression of common genes involved in immunomodulatory pathways in CRC cells. These results suggest that treatments with specific HDAC6 inhibitor would reduce the functionality of STAT3 in CRC cells, impacting the expression of immunomodulator genes involved in the inflammatory and immune response. Therefore, the use of specific HDAC6 inhibitors may be a reasonable and an interesting adjuvant strategy in combination with for help in immunotherapy, since HDAC6 inhibitors would decrease the expression of different immunomodulators of immune response.

Índice.

Portada	2
Acta	3
Agradecimientos	4
Resumen de tesis y abreviaciones	5
I. Introducción	16
II Epidemiología del cáncer	19
III Colon y cáncer colorrectal	23
IV Tratamientos oncológicos	24
V Sistema inmune en cáncer colorrectal	25
VI Regulación epigenética y vías de señalización en cáncer colorrectal	26
VII HDAC6 en cáncer colorrectal	31
VIII STAT3 en cáncer colorrectal	34
IX Eje HDAC6/STAT3	35
X Inhibidores de HDAC6	36
XI Hipótesis	37
XII Objetivos generales	37

XIII Objetivos específicos	37
XIV Metodología	39
• Cultivo y líneas celulares	39
• Inhibición enzimáticos	39
• Obtención de extractos totales de proteínas	39
• Electroforesis de proteínas y Western Blot	39
• Inmunocitoquímica	40
• Citometría de flujo	40
• Fraccionamiento núcleo/citoplasma	41
• Aislamiento de ARN	41
• PCR y RT-PCR	42
• Oligonucleótidos para detección de expresión de ARNm	42
• Secuenciación de ARNm	43
• Análisis bioinformático	43
• Análisis <i>in silico</i> de regiones promotoras	43
• Análisis estadístico	43

XV Resultados	45
• Análisis de citotoxicidad de Inhibidores de HDAC6 en células de colon.	45
• Modulación de la actividad de STAT3 en células de cáncer colorrectal frente a tratamiento con Nexturastat A.	47
• Inducción de la actividad de STAT3 bajo estimulación con IL-6	50
• Activación de STAT3 es regulada por IL-6 y HDAC6 en cáncer de colon.	52
• Efecto de la inhibición de HDAC6 sobre la actividad de STAT3	54
• Modificación de la localización de STAT3	56
• Modulación transcripcional del eje HDAC6/STAT3	58
• Vías inmunomoduladoras involucradas en cáncer colorrectal	60
• Identificación de los sitios de unión para el factor de transcripción STAT3	63
XVI Discusión	66
XVII Conclusión y proyecciones	71
XVIII. Bibliografía	73

Índice de figura

Figura 1: Incidencia y número de muertes por Cáncer a nivel mundial.	18
Figura 2: Representación esquemática de pólipo.	20
Figura 3. Representación esquemática de estadios del Cáncer Colorrectal	20
Figura 4: Histología de colon	21
Figura 5: Octámero de histonas.	29
Figura 6: Clasificación de histonas deacetilasas	30
Figura 7: Activación del factor de transcripción STAT3	32
Figura 8: Comparación de viabilidad celular al utilizar HDAC6i	46
Figura 9: Niveles de expresión de ARNm	48
Figura 10: Detección y cuantificación de las modificaciones postraduccionales de STAT3	49
Figura 11: Análisis de la expresión relativa al realizar el tratamiento con citoquinas.	51
Figura 12: Variación de modificaciones postraduccionales de STAT3	53
Figura 13: Nexturastat A reduce los niveles de fosforilación de STAT3 (705), en células de CCR	55
Figura 14: Modificación de la localización celular de STAT3	57
Figura 15: Expresión diferencial de genes en células de colon y CCR	59
Figura 16: Vías afectadas por la inhibición de HDAC6 en un contexto proinflamatorio	61

Figura 17: Esquema de los sitios de unión para STAT3 en los genes blanco.	64
Figura 18: Presencia de acetilación en la región promotora de los genes blanco	65
Figura 19: El rol del eje HDAC6/STAT3	70

Índice de tablas.

Tabla 1. Clasificación submolecular en cáncer colorrectal	23
Tabla 2. Expresión de HDAC6 en distintos cánceres	33
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la detección de ARNm	42
Tabla 4. Vías Inmune afectadas por tratamiento dual (IL-6/NextA).	62

Palabras cortas

HDAC6: Histona deacetilasa 6

Next A: Nexturastat A

STAT3: Traductor de señal y activador de transcripción 3

p STAT3: STAT3 fosforilado

ac-STAT3: STAT3 acetilado

CCR: Cáncer colorrectal

TIM-3: Timidilato sintetasa

GAL-9: Galactina 9

HDAC6i: inhibidor de HDAC6

I Introducción

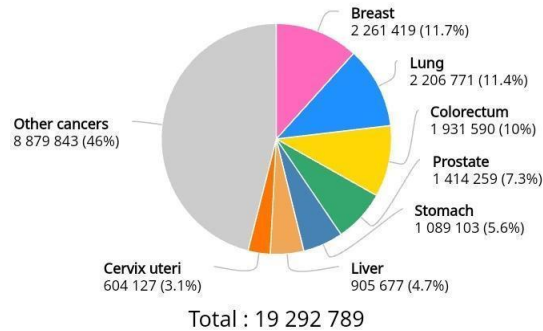
El sistema inmune se encarga de combatir infecciones y procesos inflamatorios, mediante la activación de distintas respuestas al reconocer un agente extraño o injuria. Las células que forman el sistema inmune ayudan a ejecutar estas respuestas, que muchas veces ocurre a nivel celular donde estas sufren constantes mutaciones. Las células NK y los linfocitos CD8+, son células del sistema inmune que cumplen un papel fundamental en la eliminación de células tumorales. El cáncer ocurre cuando las células tumorales no pueden ser eliminadas generando una acumulación de mutaciones, evasión de la muerte y una proliferación exacerbada de células anormales que se van acumulando. En la actualidad encontramos múltiples tratamientos anticancerígenos, como son los, quirúrgicos, quimioterapia y radioterapia, los cuales han sido de mucha ayuda para el tratamiento del cáncer y si bien actúan de diferentes formas y se pueden utilizar en conjunto, todos estos tienen en común que son muy invasivos y con varios efectos adversos. Ante esto se generó la necesidad de nuevos tratamientos, como lo es la inmunoterapia, que estimula células inmunes y mecanismos celulares, a través de vías de señalización y moduladores epigenéticos como es el caso de las histonas deacetilasas 6 (HDAC6) la cual está involucrado en la supervivencia celular, la progresión del ciclo celular, el desarrollo y la degradación de proteínas. Esto ha generado un gran interés en el estudio de esta deacetilasa y sus inhibidores selectivos. Además, esta deacetilasa cumple un rol fundamental, debido a su interacción con el factor de transcripción STAT3, regulando la traslocación de STAT3 al núcleo y por consecuencia su funcionalidad.

II Epidemiología del cáncer.

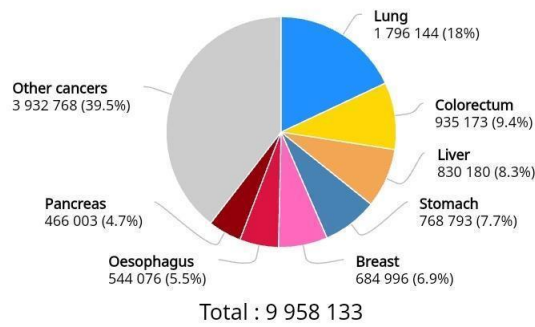
El cáncer se caracteriza por una serie de mecanismos que se desregulan, por distintos fenómenos como la hiperproliferación celular, evasión de factores supresores de crecimiento, activación de la invasión y metástasis, inmortalidad replicativa, inducción de la angiogénesis y resistencia a la apoptosis, mutaciones somáticas, alteraciones en el control de la integridad genómica y replicativa, además de un microambiente inflamatorio, sobre expresión y/o baja expresión de genes relacionados con la adhesión celular, factores de transcripción, entre otras causales (Hanahan & Weinberg, 2011).

El Cáncer Colorrectal (CCR) es el tercer cáncer con mayor incidencia en el mundo siendo esta de un 10,2% y la segunda causa de mortalidad en hombres y mujeres a nivel mundial siendo esta de un 9,4% (Globocan, 2020) (**Figura 1**). En Chile, esto no es diferente, ya que es la segunda causa de muerte siendo esta de un 9,3% (Ministerio Salud, 2018). En cuanto a la sobrevida, el 90% de los pacientes en etapa temprana sobrevive, mientras que sólo un 11% lo hace cuando el CCR es metastásico (CCRm) (Ministerio Salud, 2018).

Número estimado de casos nuevos en 2020, Mundo, ambos sexos, todas las edades



Número estimado de muertes en 2020, Mundo, ambos sexos, todas las edades



Data source: GLOBOCAN 2020
 Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)
 © International Agency for Research on Cancer 2022



Figura 1. Incidencia y número de muertes por Cáncer a nivel mundial. A) Datos publicados por GLOBOCAN 2020, muestran la incidencia en cáncer, donde el CCR es la tercera patología con más número de casos nuevos. B) Datos publicados por GLOBOCAN 2020, muestran al CCR como el segundo cáncer con mayor mortalidad en el mundo. En ambos casos se muestra la tendencia considerando ambos sexos en personas entre 8 a 85 años.

III Colon y cáncer colorrectal.

El colon posee un epitelio cilíndrico simple con criptas de Lieberkuhn, su función es la reabsorción de electrolitos y agua. En el epitelio del colon se pueden desarrollar múltiples procesos como las lesiones benignas, las cuales pueden ser del tipo de pólipos no adenomatosos y adenomatosos de los cuales su relevancia clínica va aumentando según su grado de pérdida morfológica (Bleier, J. I., & Wilkins, 2016) (**figura 2**). Un 90% de estas lesiones progresan a CCR en donde las células basales comienzan a proliferar de forma exacerbada generando proyecciones digitiformes hacia el lumen acompañada de otros criterios de malignidad (**Figura 3**).

Entre el 15-20% de los CCR son de tipo hereditarios, como el cáncer colorrectal hereditario sin poliposis (HNPCC) y la poliposis adenomatosa familiar (PAF), mientras que el resto son de tipo esporádicos, donde no hay antecedentes personales y solo el 25% de las personas que lo padecen presentan antecedentes familiares de la enfermedad (Migheli & Migliore, 2012).

Otra forma de clasificar los tumores depende de la clínica, donde existen distintas formas de clasificar las lesiones en colon, donde las lesiones benignas se clasifican en grado YAMADA, de la cual existen 4 tipos donde YAMADA I, II, III y IV, la cual clasifica los tipos de pólipos y sus cambios morfológicos. Las lesiones malignas se clasifican mediante la clasificación TNM, donde T es para tumor primario, N linfonodos y M por si se encuentra metastásico (**Figura 4**).

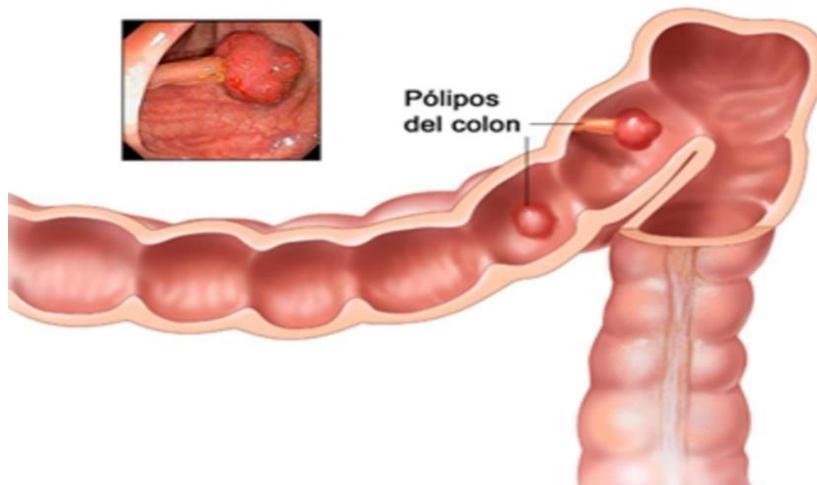


Figura 2. Representación esquemática de pólipo. Pólipo sin y con pedículo
(Instituto nacional del cáncer)

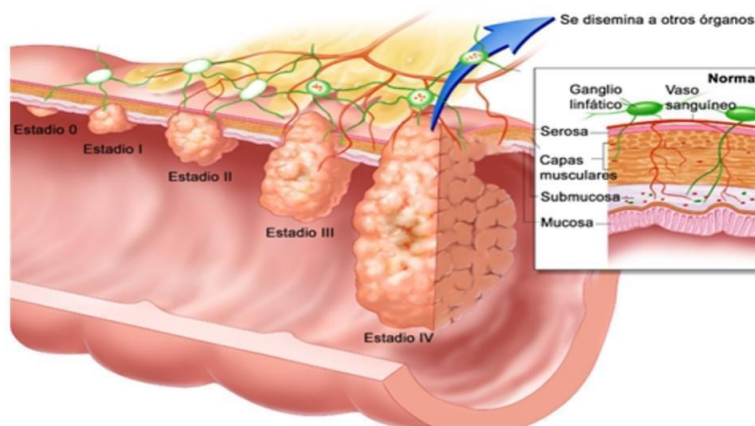


Figura 3. Representación esquemática de estadios del Cáncer Colorrectal. Estadio 0 corresponde al carcinoma in situ. Estadio I invasión de la mucosa. Estadio II el cáncer disemino a la pared muscular y serosa del recto y ano. Estadio III invasión del peritoneo. Estadio IV, metástasis.

(Modificada de Muñoz y Sánchez 2010)

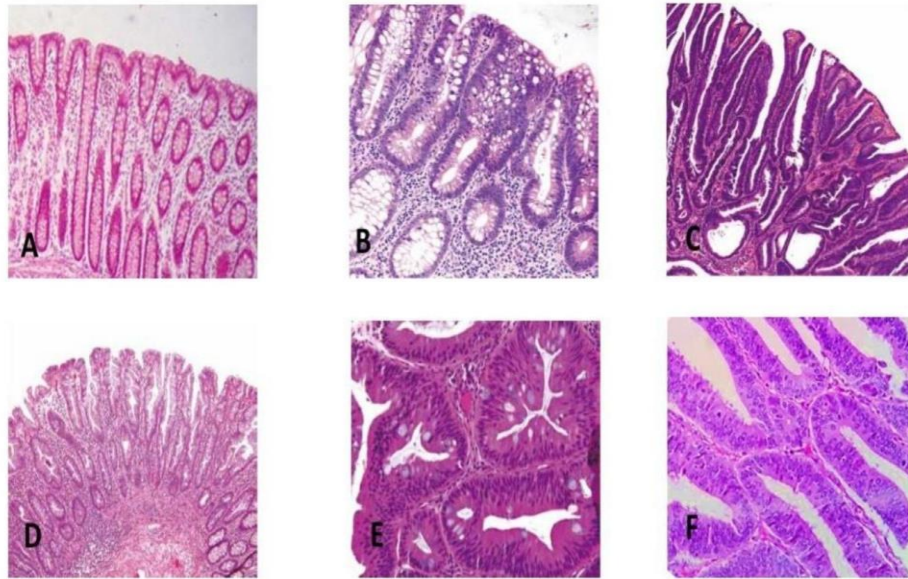


Figura 4. Histología de colon. **A)** Colon normal. La mucosa colónica normal presenta epitelio cilíndrico simple con enterocitos y células caliciformes entre las células cilíndricas, se observan invaginaciones llamadas criptas de Lieberkühn que se extiende hasta la muscular de la mucosa (10x), **B)** Adenoma tubular de colon (10x) **C)** Adenoma túbulo-velloso de colon (10x) **D)** Pólipo hiperplásico de colon (10x) **E)** Adenoma serrado tradicional de colon, con un epitelio dentado y displasia de bajo grado (40x). **F)** Adenocarcinoma de colon con proyecciones digitiformes (40x).

(Modificado de Fleming, 2012)

El CCR es un tumor morfológicamente homogéneo, pero puede exhibir diversidad celular, ante esto es que se realizó una correlación fenotípica de las células cancerosas, clasificándose en cuatro subtipos moleculares (Cellular Molecular Subtype, CMS). El subtipo CMS1, implica la hipermutación e inestabilidad de microsatélites junto con un aumento de los infiltrados de células inmunes, y su incidencia es del 14%. El subtipo CMS2 implica la desregulación de las vías de señalización canónicas que incluyen la vía WNT y c-MYC, aumentando la metilación de estos genes, la incidencia de este subtipo molecular es del 37%. El subtipo CMS3 se define por la desregulación de las rutas metabólicas, incluyendo la oxidación de carbohidratos y ácidos grasos, siendo su incidencia del 13%. Finalmente, el subtipo CMS4 se define como mesenquimatoso e implica la regulación positiva de la transformación epitelio mesénquima y angiogénesis, entre otras características. La incidencia de este subtipo molecular es del 23% (Menter et al., 2019) (**Tabla 1**). A pesar de sus diferencias, estos subtipos pueden tener en común la mutación del gen RAS que pertenece a una familia de genes que codifica GTPasas y se encuentra comúnmente mutado en pacientes con CCR. Sin embargo, es sabido que el cáncer es una patología multifactorial, observándose alteraciones en la expresión de otros genes (Thanki et al., 2017).

Tabla 1. Clasificación submolecular en cáncer colorrectal. Las distintos polimorfismos y vías que se encuentran involucradas en el desarrollo del cáncer colorrectal, siendo la vía metabólica una de las más estudiadas, pero desde hace unos años se le presta igual atención a la vía inmune.

CMS1 Vía inmune	CMS2 Vía canónica	CMS3 Vía metabólica	CMS4 Vía mesenquimal
Hipermutación e inestabilidad microsatelital.	Aumenta la metilación de genes.	Baja metilación.	Aumento en el numero de copias somáticas.
Mutación de BRAF.	APC	Mutación de KRAS, APC Y PI3K.	APC, PI3K
Activación e infiltración inmune.	Activación de C-MYC y WNT	Desregulación metabólica.	Infiltración estromal, Activación de TGF-β y angiogénesis.
Peor supervivencia luego de una recidiva.			Peor supervivencia libre de recaídas y general

IV Tratamientos oncológicos.

En los últimos años se han utilizado distintos tratamientos para el cáncer, los cuales difieren entre ellos, siendo unos más invasivos que otros. El tratamiento quirúrgico, es el más invasivo, y es utilizado cuando el cáncer está contenido en tumores sólidos y localizado en un sitio. Otros tratamientos son la quimioterapia y radioterapia, ambos destruyen las células cancerosas y enlentecen el crecimiento celular, y pueden ser utilizadas en combinación con otros tipos de tratamientos, su problema es que son poco específicos, porque, no sólo destruyen las células cancerosas que crecen con rapidez, sino que también destruyen o hace lento el crecimiento de células sanas aledañas que se encuentran en estado proliferativo como las que revisten la boca e intestinos. Otra arista que sirve como tratamiento, incluye la respuesta inmune, ya que las células cancerosas tienen la capacidad de activar diferentes vías de control inmunológico que albergan funciones inmunosupresoras (Darvin, P., et al 2018) dando espacio a un nuevo tratamiento.

La inmunoterapia es un tratamiento vanguardista que consiste en el desarrollo de inhibidores del control inmunológico, ósea se bloquean puntos de control inmunitario, desencadenando la activación o inhibición del sistema inmune e induciendo respuestas duraderas (Abril-Rodriguez, G., & Ribas, A. 2017). Cuando el tratamiento es en etapas tempranas, disminuye la progresión del cáncer y aumenta la sobrevida, observado en nuevas investigaciones realizadas en cáncer de ovario y cáncer renal (Guo, S., et al. (2020). Aun así, se ha observado que pacientes siguen presentando resistencia a la terapia, es por esto la necesidad de crear nuevas estrategias terapéuticas.

V Sistema inmune en cáncer colorrectal.

En la actualidad, se sabe que el sistema inmunológico desempeña un papel importante en la regulación del desarrollo del cáncer. Los puntos de control inmunitario regulan la acción del sistema inmune atenuando su activación, permitiendo respuestas inmunitarias en los pacientes (Bonnetoy, N., et al 2019). Sin embargo, los tumores pueden desregular la actividad de estas proteínas de puntos de control inmunitario como un mecanismo de resistencia inmune (Dyck & Mills, 2017). Es debido a esto que se ha convertido en una de las áreas más prometedoras de la investigación en inmuno-oncología en donde los puntos de control juegan un importante rol. Un ejemplo es el cáncer de mama, el cual se asocia con una progresión agresiva, una alta tasa de metástasis y un mal pronóstico (Liu, L., et al 2018). En este cáncer se han realizado estudios clínicos utilizando una terapia anti-CTLA-4, ya que es una de las proteínas que actúa como punto de control inmunitario y que se puede encontrar desregulado en cáncer. El antígeno 4 asociado a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), es miembro de una familia de receptores relacionadas con inmunoglobulinas que regulan las células inmunitarias T, su ubicación es intracelular, pero transloca hacia la superficie de las células T (Rowshanravan, B., et al 2018). Otro inmunomodulador es PD-1 (receptor de muerte programada 1), presente en linfocitos T, y su ligando PD-L1, presente en células tumorales. Se ha demostrado que el bloqueo de PD-1 suprime la metástasis tumoral de líneas celulares de melanoma B16 y células de carcinoma de colon CT26 (Yoshiko Iwai, Terawaki, & Honjo, 2005). Lo mismo ocurre al utilizar un anticuerpo monoclonal contra PD-L1, ya que este puede bloquear la vía de supresión (es decir, una interacción PD-1/PD-L1) y dar como resultado una regulación positiva de la respuesta inmune e inhibición del crecimiento tumoral, aumentando el reconocimiento del tumor como extraño con el objetivo de activar el sistema inmune (Zhao, C., et al (2020). Dada estas características es que se propone a PD-1 y su ligando, como un buen marcador para detección y tratamiento del cáncer en los distintos estadios. Se debe tener en consideración que las células cancerosas tienen una capacidad inherente de aprovechar diferentes vías de señalización y de factores de crecimiento para obtener ventajas de crecimiento y supervivencia celular. Por esto, se ha dado paso a nuevos tratamientos para mejorar la eficacia, uno de estos, está enfocado en el uso combinado de la inmunoterapia con el uso de moduladores epigenéticos (Coutzac et al., 2017). Así mismo se han comenzado a estudiar nuevos moduladores inmunitarios como por ejemplo GAL-9 y CD86. GAL-9 (Galactina 9) es un ligando, que se ha estudiado su expresión en cáncer de pulmón y mamas. Además, estructuralmente, GAL-9 consta de dos dominios conservados de reconocimiento de carbohidratos (CRDs) conectados por una secuencia

enlazadora, y es capaz de reticulares glicoproteínas para formar entramados multivalentes de Galectina-glicoproteína que regulan múltiples procesos celulares, incluyendo la muerte de células T mediada por el gen Timidilato sintetasa 3 (TIM-3) el cual es su receptor. Esta vía se asocia con inmunosupresión y un peor resultado clínico en múltiples cánceres (Kandel ,2021; Lie ,2017). Estudios han descrito que la función de TIM-3 es mediar la muerte de linfocitos T inducida por GAL-9, asociando la expresión de PD-L1 y GAL-9 con un mal pronóstico de supervivencia. Por otra parte, CD86 (Cluster of differentiation 86) proporciona señales co-estimuladoras necesarias para la activación y supervivencia de células T. Esta proteína es expresada por células presentadoras de antígeno y es el ligando de CD28 y de CTLA-4 asociada a linfocitos T citotóxicos. La unión de esta proteína con el antígeno CD28 (Cluster of differentiation 28) es una señal co-estimuladora para activación de linfocitos T. La unión de esta proteína con la CTLA-4 es asociada a linfocitos T citotóxicos, los cuales regulan negativamente la activación de las células T y disminuye la respuesta inmunitaria. Estas pruebas, si bien generan un nuevo plan terapéutico, fueron ensayos *in vitro*, por lo que debemos recordar que ensayos clínicos en pacientes, la terapia puede variar teniendo distinta sensibilidad, especificidad y respuesta en cada paciente. En consecuencia, el estudio de estos inmunomoduladores nos podría ayudar a proponer una terapia coadyuvante más completa en CCR (Yang., 2021).

VI Regulación epigenética y vías de señalización en cáncer colorrectal.

Dentro de los fenómenos que pueden llevar a la formación y progresión del cáncer, está la regulación epigenética, que puede ser modulado por varios mecanismos (Allis & Jenuwein, 2016). Uno de ellos es la Metilación de ADN, que consiste en la adición de grupos metilos a residuos de citosina por enzimas ADN Metiltransferasas, modificación relacionada estrechamente con una baja actividad transcripcional (Jung et al., 2020). Otro mecanismo son los ARN no codificantes, los cuales actúan como represores postranscripcionales al unirse a secuencias diana complementarias controlando la traducción de genes que pueden codificar proteínas que regulan procesos tumorigénicos como proliferación, diferenciación celular y apoptosis (Jung et al., 2020). También encontramos mecanismo relacionados con las modificaciones de histonas, las cuales, además de ser proteínas de empaquetamiento de la cromatina, pueden regular las secuencias de ADN subyacentes a través de complejas modificaciones postraduccionales en sus extremos N-terminales, como la acetilación, metilación o fosforilación de aminoácidos específicos (Migheli & Migliore, 2012). Dado esto es que la modificación de

las colas de histonas últimamente se ha convertido en un mecanismo importante de estudio en cáncer y más aún en el CCR. Estas condiciones generan que los patrones de expresión génica que se rigen por la epigenética puedan provocar enfermedades autoinmunes, cánceres, entre otras.

Debemos recordar que en condiciones normales el ADN se envuelve alrededor de un complejo proteico octamérico que comprende un par de 4 proteínas, conocido como histonas. Las histonas se clasifican según su función en nucleosómica (H2A, H2B, H3 y H4) y la histona H1 que evita cortes de la hebra de ADN. Cada histona posee una cola característica que está enriquecida en residuos de lisina y arginina, que pueden ser sometidos a modificaciones postraduccionales como acetilación, metilación o fosforilación, comúnmente realizadas en las histonas H3 y H4 (**Figura 5**). Estas modificaciones controlan el acceso y restricción de factores de transcripción a la región promotora de los genes involucrados e influyen de esta forma en la expresión génica, activando o reprimiendo la transcripción (Bannister & Kouzarides, 2011). Uno de los mecanismos de modificación de histonas es llevado a cabo por grupo de enzimas clasificadas en Histonas Acetiltransferasas (HAT) e Histonas Deacetilasas (HDAC), las primeras encargadas de agregar grupos acetilos a los residuos de lisina neutralizando la carga positiva del aminoácido para debilitar las interacciones entre las histonas y el ADN, y las segundas removiendo estas modificaciones restaurando la carga y estabilizando nuevamente la arquitectura de la cromatina local (Allis & Jenuwein, 2016). Las modificaciones de histonas son un control fisiológico de toda célula, sin embargo, una desregulación por acetilación o metilación pueden afectar la expresión de genes involucrados en la regulación de las mismas, afectando a los genes que codifican las enzimas. Como, por ejemplo, las histonas acetiltransferasas, que cumplen el rol de acetilar residuos de lisina en las colas de histonas, lo que se ha asociado a un cambio atípico en su funcionamiento, ya sea por una alta o baja actividad de las HDACs, cumpliendo un importante rol en el desarrollo y progresión del cáncer (Jung et al., 2020). La desacetilación de estas modificaciones fuera del entorno de la cromatina también es un proceso importante en el mantenimiento y homeostasis celular. Se ha descrito que algunas HDACs modifican una variedad de proteínas no histónicas que participan en procesos celulares importantes. Promueven la desacetilación de proteínas involucradas en vías oncogénicas y relacionadas con el sistema inmune, como, transductores de señales y activadores de la transcripción, por ejemplo, de proteínas STAT, entre otros blancos proteicos (Oszukowski & Pieta-Dolińska, 2011; Yuan, Guan, Chatterjee, & Chin, 2005).

A la fecha, se han descrito 11 tipos de histonas deacetilasas, las cuales se clasifican en cuatro grupos, según su cofactor al que se unen, diferenciándose en su expresión e

isoformas (**Figura 6**) (Yang & Seto, 2003, Gao., et al 2019). Encontraremos histonas deacetilasa con distintas funciones y localizaciones, tanto nucleares como citoplasmáticas como es el caso de HDAC6. Las histonas deacetilasas o HDAC, se clasifican de clase I y clase II, la mayoría de ellas poseen una localización nuclear, con actividad co-represora en el ADN, sin embargo, en la clase IIb HDAC6, posee una localización que predomina en el citoplasma e interactúa y regula la función de proteínas no nucleares (Ruijter, AJD, et al., 2003).

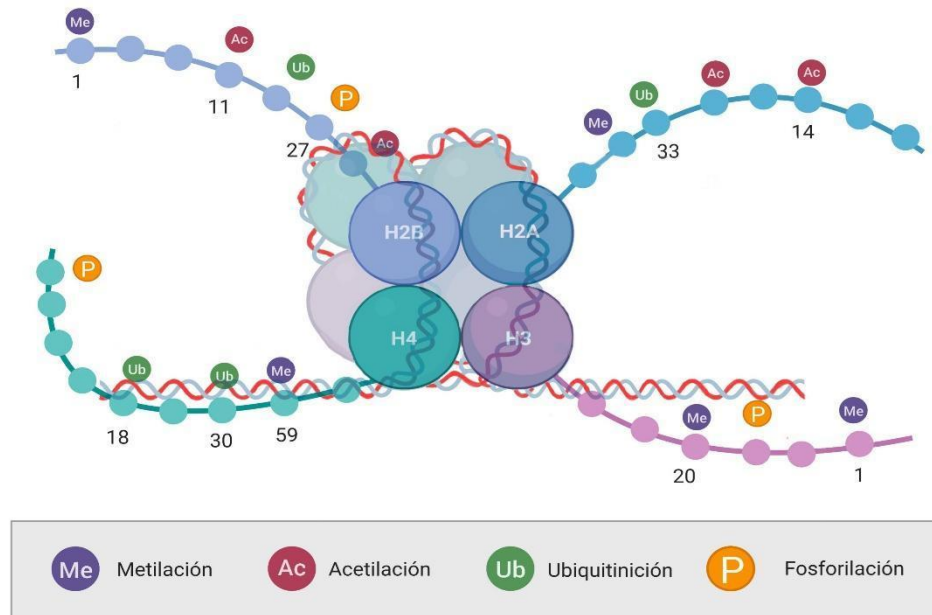


Figura 5. Octámero de histonas. Se observa la conformación de un octámero de histonas, formado por 4 histonas H2, 2 histonas H3 y 2 histonas H4, las cuales permiten enrollar el ADN, para brindarle mayor protección dentro del núcleo.

(Mandonés-Molina, Constanza 2022)

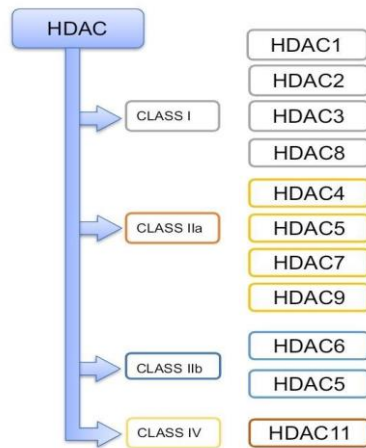


Figura 6. Clasificación de histonas deacetilasas. La mayoría de las HDACs son de localización nuclear, pero existen algunas excepciones, como es el caso de HDAC6, donde predominantemente se encuentran en citoplasma de las células.

VII HDAC6 en cáncer colorrectal.

La Histona deacetilasa 6 (HDAC6), pertenece al grupo IIb que posee 2 dominios catalíticos dispuestos en tandem con un dominio c-terminal y su localización es en un 99% citoplasmática donde regula señales a través de la inactivación de proteínas (Ruijter, A. J. D., et al; 2003). Sus funciones son variadas, una de ellas se genera al interactuar con α -tubulina, donde la hipoacetilación, ayuda a la maduración del receptor de glucocorticoide y promueve la viabilidad celular en respuesta al estrés por proteínas mal plegadas, participando en el reclutamiento de complejos (motores) de dineína (Hubbert, Guardiola, & Shao, 2002; Kawaguchi et al., 2003; Kovacs et al., 2005). Además, por ser la única histona deacetilasa que contiene un dominio de unión a ubiquitina, es clave en la activación de degradación dependiente de la autofagia por el sistema ubiquitina-proteasoma (Pandey et al., 2007). También, HDAC6 parece estar involucrado en la regulación de varias funciones celulares críticas íntimamente relacionadas con el cáncer a través de diversas vías, como la transformación de células oncogénicas, regulación del ciclo celular, reclutamiento hacia regiones promotoras de genes y en la migración e invasión de células cancerosas (Sakamoto & Aldana-Masangkay, 2011). Así mismo, se ha visto que HDAC6 puede afectar la expresión génica de inmunomoduladores (T. Li et al., 2018) y desempeñar un papel importante en el mantenimiento de la tolerancia inmune, ya que favorece el reclutamiento a regiones promotoras del factor de transcripción STAT3 (Cheng, Lienlaf, Wang, et al., 2014), ayudando en su regulación transcripcional. (**Figura 7**)

En CCR, la expresión de HDAC6 disminuye con respecto al tejido normal en casi el doble (Ruijter, AJD, et al., 2003) (**Tabla 2**), siguiendo una tendencia similar a la observada en melanoma, generando la búsqueda del comportamiento de HDAC6 en CCR.

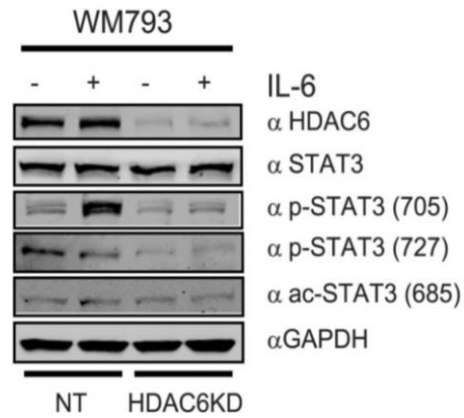


Figura 7. Activación del factor de transcripción STAT3. La baja expresión de HDAC6 (HDAC6KD) altera la activación del factor de transcripción STAT3 mediado por IL-6 (30 ng/mL) en células de melanoma WM793. Las células WM793 se trataron con IL6 y otras se dejaron sin tratar. Se evaluó mediante Western Blot la presencia de HDAC6, STAT3, ambas isoformas de STAT3 fosforilada (p-STAT3 705 y p-STAT3 727) y STAT3 acetilada (ac-STAT3 685), Se utilizó GAPDH como control de carga. NT: no tratadas, KD: knockdown (Lienlaf, M., 2016).

Tabla 2. Expresión de HDAC6 en distintos cánceres. Se observa la expresión de las diferentes HDAC entre tejido canceroso y tejido normal, de 100000 personas.

Expresión (100000 personas)										
Tejido	Clase I				Clase II					
	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8	HDAC4	HDAC5	HDAC6	HDAC7	HDAC9	HDAC10
Tejido Normal										
control	1.4	3	1.85	0.2	0.01	0.42	4.5	2.2	0.55	1.15
Cerebro	0.3	1.6	0.8	-	-	7.2	4.5	0.8	0.8	2.38
Mama	-	-	4.3	-	-	4.0	8.6	2.9	-	3.3
Colon	7	5.0	-	-	-	4.6	4.0	-	-	2.0
Riñón	1.8	11.9	2.7	0.9	-	-	-	-	-	4.6
Tejido tumoral										
Cerebro	1.9	3.8	2.5	0.9	6.1	6.1	7.2	1.5	1.7	3.1
Mama	0.2	3.0	1.1	-	-	-	8.9	3.2	-	4.3
Colon	1.8	2.3	1.5	0.6	1.6	3.7	2.0	1.5	2.6	2.5
Ovario	2.6	6.1	2.6	1.0	3.1	-	4.2	2.9	1.0	2.6

VIII STAT3 en cáncer colorrectal.

El factor de transcripción STAT3 actúa como mediador en la expresión de diversos genes en respuesta a determinados estímulos celulares. Posee un rol importante en distintos procesos, viéndose involucrado en la patogénesis y el desarrollo de tumores malignos, así como, en la inducción y el mantenimiento de la tolerancia inmune tumoral. Es esencial para la transducción de señales extracelulares, además de ser un factor de transcripción nuclear necesario para la regulación de genes involucrados en la proliferación, supervivencia, angiogénesis e invasión tumoral, y promover mediadores inflamatorios como citoquinas y quimioquinas. (Yu, Pardoll, & Jove, 2009). Las citoquinas que son reguladas por STAT3, también, pueden regular la activación de este factor de transcripción al unirse a sus receptores quinasas, como, por ejemplo, al receptor Jak (JAK/STAT) promoviendo una retroalimentación positiva, ya que induciría la fosforilación de STAT3 y que este pueda translocar al núcleo promoviendo un microentorno inflamatorio y de inmunomodulación. La funcionalidad y localización de STAT3 está regulada por modificaciones postraduccionales, es así, como una fosforilación en el residuo de tirosina 705, desencadenada por la fosforilación de JAK permitiendo a STAT3 migrar y translocar al núcleo y 727 de activación de STAT3. La acetilación de STAT3 en el residuo de lisina 685 (Lys 685) encargado de la inactivación de STAT3 (Tesoriere, A., Dinarello, A. y Argenton, F. 2021). Estos mecanismos se han visto involucrados entre sí en CCR, ya que se sabe que cuando STAT3 logra translocar al núcleo, interacciona con secuencias específicas de unión en la región promotora de sus genes blanco, aumentando la expresión de ellos, como es PD-L1, el cual después de transcrito, se traduce y es traslocado a la membrana de las células tumorales. Una vez expresados en la membrana de las células cancerígenas, se une a su receptor PD-1, expresado en células T, inhibiendo de esta forma la respuesta de las células T ante las células tumorales, por lo que se relaciona con la evasión del sistema inmune y por consecuencia con la supervivencia de las células tumorales y progresión del cáncer. Sin embargo, PD-L1 no sería el único blanco, transcripcional de STAT3, es así como nace la necesidad de buscar nuevos blancos transcripcionales de STAT3 en CCR.

IX Eje HDAC6/STAT3.

Se ha descrito que HDAC6 juega un rol sobre otras proteínas, modulando la activación de factores de transcripción como STAT3. Se ha observado el rol del eje HDAC6/STAT3, en melanoma (Lienlaf, M., Pérez-Villaruel, P., et al., 2016). El melanoma es un tipo de cáncer recurrente donde se diagnostican 99.780 nuevos pacientes al año y tiene una mortalidad de 7.650 personas en el 2022. (American Cancer Society., 2022). Si bien, ya existen tratamientos que involucran la inhibición de genes como MEK y KRAS, los tratamientos no son específicos para cada persona y las respuestas varían entre pacientes. Logrando estudiar nuevos mecanismos de regulación, como es el caso del eje HDAC6/STAT3, a través de líneas celulares de melanoma en donde se observó que en ausencia o inhibición genética de HDAC6 se encontraba una menor fosforilación de STAT3 (residuo Y705) como se mostró en la **figura 7**, anteriormente, que representa una modificación importante para su activación, además un menor reclutamiento en la región promotora de sus genes diana, como IL10, sin alterar su expresión, ni estado de acetilación. (Cheng, Lienlaf, Perez-Villaruel, et al., 2014; Keremu, Aimaiti, Liang, & Zou, 2019; Lienlaf et al., 2016). Se conocía también que la expresión de IL10, interleuquina inmunoreguladora (Kube, D., et al ; 2001). esta mediada por el factor de transcripción STAT3 (Ray, Lee, Hou, Boldogh, & Brasier, 2008; R. Wang, Cherukuri, & Luo, 2005). Estos antecedentes llevaron a sugerir que la participación de HDAC6 en la activación de la ruta de STAT3 puede ser regulada si se interviene la funcionalidad de HDAC6 y de esta forma influir en la actividad transcripcional de los genes diana para STAT3. Además, estudios han evidenciado que HDAC6 interacciona formando un complejo proteico aún no caracterizado con STAT3 para ser reclutados en la misma secuencia de la región promotora del gen de IL10, demostrando así su importante rol fuera de las modificaciones de histonas (Cheng, Lienlaf, Perez-Villaruel, et al., 2014).

X Inhibidores de HDAC6.

Las histonas deacetilasas son el blanco terapéutico de varios compuestos estructuralmente diversos conocidos como inhibidores de HDAC (HDACinh), clasificados como pan-inhibidores o específicos para cada una de las HDACs descritas. Estos compuestos pueden inducir diferenciación celular, detención del ciclo celular y apoptosis de células transformadas (Villagra, Sotomayor, & Seto, 2010). A pesar de los efectos bien documentados de los HDACinh en el control del ciclo celular y la apoptosis, no se conoce completamente su participación en las vías relacionadas con el sistema inmune.

Con todo lo documentado sobre la participación de HDAC6 en cáncer es que nace la búsqueda de inhibidores específicos, que por consiguiente regularía la fosforilación del factor de transcripción STAT3 y posteriormente podría generar inactivación de sus genes diana, incluyendo niveles de citoquinas y genes relacionados con el sistema inmune (Cheng, Lienlaf, Wang, et al., 2014). Por lo tanto, este tratamiento podría dar paso a una terapia combinada en conjunto con el bloqueo específico de receptores de punto de control inmune para el tratamiento de CCR, así como otras neoplasias.

Por todo lo expuesto, creemos que sería fundamental resolver cómo el eje HDAC6/STAT3 tienen la capacidad de modificar la expresión de moduladores inmunitarios en cáncer colorrectal por lo que desarrollamos la siguiente hipótesis.

XI Hipótesis

La inhibición de HDAC6 promueve la disminución de la función de STAT3 y por ende, la función de las vías inmunomoduladoras represivas que están asociadas al control inmunitario en células de cáncer colorrectal.

XII Objetivo general

Determinar la relación funcional entre HDAC6 y la vía STAT3 en la regulación de vías inmunomoduladoras en células de cáncer colorrectal.

XIII Objetivos específicos

1-Characterizar la funcionalidad del eje HDAC6/STAT3 en células de cáncer colorrectal al intervenir la vía.

Se realizará mediante análisis de Western blot, inmunocitoquímica y citometría de flujo en líneas celulares de colon normales y cancerígenas, tratadas con inhibidores de HDAC6 y/o STAT3, observando la expresión de algunos inmunomoduladores, así como la funcionalidad del eje a través de la localización y de modificaciones post-traduccionales de STAT3, generadas por HDAC6.

Interpretación: Se espera detectar las modificaciones de STAT3 y asociarlas a sus blancos transcripcionales descritos. Al realizar los tratamientos con inhibidores de HDAC6 y/o STAT3 esperamos analizar la localización de STAT3 (nuclear o citoplasmática), y asociarlo con la pérdida de los niveles de fosforilación y aumento de los niveles de acetilación y que esto se refleje en expresión del factor de transcripción en células de cáncer colorrectal.

2-Determinar los blancos transcripcionales del eje HDAC6/STAT3 en células de cáncer colorrectal.

Se realizará a través de un análisis masivo de BRB-seq, (Bulk RNA Barcoding and Sequencing) el cual se confirmará por RT-qPCR y western blot de genes específicos, en las células de cáncer colorrectal que serán tratadas con activadores de la vía JAK/STAT (IL-6) e inhibidores de HDAC6 (Nexturastat). Además, inhibimos a STAT3 para observar la respuesta a su pérdida de función.

Interpretación: Se espera que los niveles de expresión de múltiples genes se vean afectados y que estos varíen según las modificaciones que pueda presentar STAT3 de acuerdo con los niveles de acetilación y fosforilación, previamente descritos, y que estos se asocien a la regulación de la transcripción de inmunomoduladores en células de cáncer colorrectal.

3- Determinar la presencia de sitios para STAT3, en la región promotora de los blancos transcripcionales de STAT3 hallados en células de cáncer colorrectal.

Para abordar esto, primero se realizó un análisis *in silico* de la región promotora de los blancos obtenidos en el BRBseq. Pudiendo a futuro confirmarlos por RT-qPCR de los genes blanco, utilizando tratamientos con inhibidores de HDAC6 y STAT3.

Interpretación: Se espera que los genes blanco de esta vía, tengan presencia de sitio de unión para STAT3. Además, en presencia de inhibidores de HDAC6 y STAT3, se confirmó que este efecto se genera a través de STAT3 y eso regula la respuesta de STAT3. De esta forma, podemos sugerir que el mecanismo transcripcional que ocurre al momento de activar o inhibir la vía a diferentes niveles está regulada por la acción inicial de HDAC6.

XIV Metodología

Cultivo y líneas celulares. Se trabajó con células de cáncer colorrectal, HT-29 y HCT-116, que corresponden a células de adenocarcinoma y carcinoma colorrectal humanas respectivamente. Además, se utilizaron las células CCD841 (CoN), células inmortalizadas de epitelio normal de colon. El cultivo se realizó en placas con medio DMEM, suplementado con suero fetal bovino 10%, L-glutamina 4 mM, bicarbonato de sodio 1.5 mg/mL y glucosa 4.5 mg/mL. A cada medio se le adicionó penicilina-estreptomina 50 U/mL, y de ser necesario Fungizona 1µg/mL (anfotericina B 0,5 µg/mL, desoxicolato de sodio 0,5 µg/mL). La incubación de todas las líneas celulares se realizó a 37°C en un ambiente de 5% CO₂.

Inhibidores enzimáticos. Se utilizaron inhibidores específicos de HDACs (Nexturstat A) o de STAT3 (WP1066). En un principio, los inhibidores fueron donados por el Dr. Alejandro Villagra (USA), posteriormente fueron adquiridos en MedChemExpress (USA) o Santa Cruz Biotechnology (USA).

Obtención de extractos totales de proteína. Después de crecer y tratar las células, se lavaron 2 veces con PBS 1X. Luego se adicionó PBS 1X y se colectaron las células por arrastre mecánico. Se traspasaron las células a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se centrifugaron por 10 minutos a 1000 rpm. Se descarta el sobrenadante y se adiciono al pellet obtenido tampón de lisis, según cantidad de pellet [50 mM Tris-HCl pH 7,4; 10% glicerol; 200 mM NaCl₂; 2,5 mM MgCl₂; 1% Tritón X-100; inhibidores de proteasas; inhibidor de fosfatasa (Sigma)]. Se dejó en agitación 20 minutos a 4 °C. Se centrifugaron los lisados celulares a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. Finalmente, se midió la concentración de proteínas totales por el método Bradford (según datos del fabricante).

Electroforesis de proteínas y Western blot. La caracterización de las líneas celulares en nuestras condiciones de estudio involucró también electroforesis de proteínas y ensayos de Western blot utilizando anticuerpos específicos para la expresión de diferentes proteínas. Para la electroforesis de proteínas, las muestras se denaturan en buffer de carga (50 mM Trizma-Cl pH 6,8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol) calentando a 95 °C durante 5 minutos. Luego se centrifugaron a 16.000xg durante 2 minutos, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida (29:1)/SDS 0.1% al 8% para visualizar proteínas mayores a 200 KDa y al 12% para proteínas menores a 200 KD. La electroforesis se llevó a cabo a 20 mA corriente constante por gel en buffer de corrida

(25 mM Trizma-Cl, 250 mM glicina, 0,1% SDS) y en una minicámara (Mini PROTEAN 3 System, BIO-RAD).

Una vez terminada la electroforesis las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer Medium, BIO-RAD) en buffer de transferencia (glicina 39 mM, Trizma 48 mM, SDS 0,037%, metanol 20%) a 30 volt de corriente constante durante 18 horas. La membrana fue teñida con Ponceau S (Ponceau S 0,1%, ácido acético 5%). Luego de ser lavada con PBS, la membrana se bloquea con solución TBS/Tween 0.1%/leche descremada al 5%. Luego la membrana se incubó con anticuerpos específicos para los ensayos a realizar, en TBS-TWEEN a temperatura ambiente durante 2 horas o a 4°C durante toda la noche. Luego se lavó con TBS-Tween 20 0,1%, durante 5 minutos repitiendo esto 3 veces. Finalmente, se realizaron lavados de la misma manera que para el primer anticuerpo, la detección se llevó a cabo con reactivos de quimioluminiscencia y se expuso en un equipo fotodocumentador para quimioluminiscencia (OmeGAlum). Los anticuerpos utilizados fueron PD-L1 (E1L3N®) #85164, Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7) XP® Rabbit mAb #9145, Acetyl- α -Tubulin (Lys40) (D20G3) XP® Rabbit mAb #5335, Acetyl-Stat3 (Lys685) Antibody #2523, Stat3 α (D1A5) XP® Rabbit mAb #8768, Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Anticuerpo (D-11): sc-28386, Actin Anticuerpo (C-2): sc-8432 y β 3-Tubulin (D65A4) XP® Rabbit mAb #5666.

Inmunocitoquímica. La caracterización de las líneas celulares en nuestras condiciones de estudio involucró también el ensayo de inmunocitoquímica, para estos las muestras se fijaron con paraformaldehído y luego se lavaron con PBS al 1X, se permeabilizaron las muestras con TritonX-100. Luego, se lavaron 3 veces con PBS, se incubaron con anticuerpos específicos para los ensayos a realizar, en cámara húmeda durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS 1X. Inmediatamente después, fueron incubadas con el anticuerpo secundario (anti-rata IgG conjugado con Alexa Fluor 568) dilución 1:200 en PBS 1X. La incubación se realizó durante 35 minutos en oscuridad. Luego se realizó una tinción con DAPI para luego lavar con PBS por 3 veces, para finalmente montar con DAKO para el análisis mediante el microscopio confocal SP8 LIGHTNING, LEICA, Centro de Microscopia Avanzada, Universidad de Concepción.

Citometría de flujo. Se cultivan 2×10^5 células en placa de 60 mm, las cuales fueron tratadas con IL-6 a 30ng/uLy Nexturastat A a 5uM por 24 horas. Estas se precipitaron por centrifugación y se eliminó el medio de cultivo. Se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS (millón de células/ml). Luego, se agregó NP40 al 10% y se trataron las células con buffer de fijación y permeabilización celular, para analizar la fosforilación de STAT3. Se añadió

anticuerpo específico para STAT3 o STAT3 fosforilado (stock: 1mg/ml) por muestra. Los anticuerpos que se dejaron que ingresen a la célula e interaccionen con su proteína blanco unos 30 min. a temperatura ambiente (R.T.) y oscuridad. Se agregó el buffer de lavado y se analizó en citómetro de flujo (FACS CantoII, BD) en menos de 24 horas. Las muestras son mantenidas en oscuridad y a 4°C.

Se cultivaron 2×10^5 células en placa de 12 pocillos y fueron expuestas a 0,1 nM, 100nM y 1000nM por 24 horas con Nexturastat A. Se recolectó el medio en tubos falcón de 15mL y se lavaron con PBS 1X para posteriormente recolectar las células por arrastre mecánico en tubos falcón correspondientes.

Los tubos con células se centrifugaron a 2000 rpm por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 1 ml de PBS 1X, repitiendo el lavado dos veces. Luego de la última centrifugación, se resuspendió el pellet en 200 uL de Staining Buffer 1X. Se colectaron 100uL de cada muestra en tubos Can para citometría y se agregaron 5uL de Ioduro de Propidio y 5uL de Anexina V. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se adicionaron 400 uL de Staining Buffer 1X y se analizó en citómetro de flujo (FACS Canto II, BD) en menos de 1 hora manteniendo en frío y oscuridad.

Fraccionamiento núcleo/citoplasma. La caracterización de las líneas celulares en nuestras condiciones de estudio involucró también el trabajo de extracción de proteínas. Se cultivan 2×10^5 células en placa de 60 mm, las cuales fueron tratadas con IL-6 a 30ng/uL y Nexturastat A a 5uM por 24 horas. Después de crecer y tratar las células, se lavaron 2 veces con PBS 1X. Luego se adicionó PBS 1X y se colectaron las células por arrastre mecánico. Se traspasaron las células a un tubo Eppendorf de 1,5 mL y se centrifugaron a 600 g por 5 min a 4°C, luego añadimos proteasas para evitar degradación. Se utilizo el kit de fragmentación núcleo/citoplasma, BioVision (#K266) y utilizamos el protocolo sugerido por el fabricante.

Aislamiento de ARN. Con el objetivo de caracterizar las líneas celulares en nuestras condiciones de estudio y determinar la expresión de genes asociados al fenotipo y de respuesta inmune se realizarán ensayos de RT-PCR para los ARNm de diferentes genes en presencia y ausencia de inhibidores enzimáticos esenciales en este proyecto. Las células fueron sembradas a 5×10^5 células por placa y se trataron con diferentes tipos y concentraciones de inhibidores diluidos en medio de cultivo por diferentes periodos de incubación. Como control se usó células que no fueron expuestas a tratamiento y fueron retiradas junto con las muestras tratadas. Para todos los ensayos se aisló ARN total desde

las células utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante.

PCR y RT-PCR. Los oligonucleótidos sentido y antisentido que se utilizarán aún no han sido establecidos en su totalidad. La mezcla de PCR se preparará en 10 µL usando diferentes volúmenes de templado, en presencia de 0.2 mM de dNTPs, 20 pmoles de cada oligonucleotido y SapphireAmp fast PCR—hot-start master mix (TaKaRa). La reacción de PCR se llevará a cabo empleando las condiciones óptimas para cada gen en particular. Todas las reacciones de PCR se realizan en un termociclador Termociclador Applied Biosystems ABI Modelo MiniAmp Plus (ThermoFisher Scientific). Para la transcripción reversa (RT), luego de la obtención del ARN y de su posterior cuantificación y análisis de calidad, se sintetizan los correspondientes ADNc por retrotranscripción mediante la utilización de una transcriptasa reversa (M-MLV, Promega) en presencia de Oligo dT anclado (JenaBiotech), se ejecutará, según las condiciones del fabricante de la polimerasa.

Oligonucleótidos para detección de expresión de ARNm. La gran mayoría de los partidores que utilizamos, ya se encuentran disponibles en el laboratorio. Sin embargo, los partidores específicos que no se encuentran disponibles en nuestro laboratorio, se enviarán a sintetizar a IDT (a través de Fermelo).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la detección de ARNm.

Gen Target	Secuencia 5´- 3´	Tamaño producto	Código secuencia
18S	F: GTAACCCGTTGAACCCATT R: CCATCCAATCGGTAGTAGCG	100	NM_008360
PD-L1	F: TCCTGAGGAAAACCATACAGC R: GATGGCTCCCAGAATTACCA	120	NM_014143
STAT3	F: CTTTGAGACCGAGGTGTATCACC R: GGTCAGCATGTTGTACCACAGG	120	NM_213662
IRAK1	F: TCAGAACGGCTTCTACTGCCTG R: TACCCAGAAGGATGTCCAGTCG	127	NM_001569.4
TRIP6	F: GATGCTACGAGCCAGATCCACT R: TCGCACTTGTAACAGCCAATGTG	160	NM_003302.3
TYMS	F: GGTGTTTTGGAGGAGTTGCTGTG R: GGAGAATCCCAGGCTGTCCAAA	125	NM_001071
LRRC41	F: CTGGATAGTGCCACCTTTGCCT R: GCTCTGACAGTCAGCGAGATTC	122	NM_006369
MLST8	F: CAGGTGAATGCCTTGGAGGTCA R: TTGTTGACCCGTCGTAGCTGA	127	NM_001199173

IFITM2	F: GGCTTCATAGCATTCGCGTACTC R: AGATGTTTCAGGCACTTGGCGGT	105	<u>NM_006435</u>
PSMB5	F: GTGTCCCAGAAGAGCCAGGAAT R: TCTTCACCGTCTGGGAGGCAAT	134	<u>NM_001130725</u>
KEAP1	F: CAACTTCGCTGAGCAGATTGGC R: TGATGAGGGTCACCAGTTGGCA	133	<u>NM_012289</u>
SEC61A1	F: CTCGCTTCAGTGGCAACTTGCT R: GCCACCAACTGGATAAGCACGT	91	<u>NM_013336</u>
MAPK12	F: CAGTTCCTCGTGTACCAGATGC R: CACAGTCTTCGTTACAGCCAG	105	<u>NM_001303252</u>

Secuenciación de ARNm. Se realizó secuenciación NGS de transcritos totales de ARN mensajero a través de secuenciador masivo a través de BRBseq, para lo cual se utilizará el servicio de secuenciación de la empresa Diagenode (Bélgica), donde se llevará a cabo tanto la secuenciación como el análisis de los resultados obtenidos (comparativo, gene ontology y análisis de vías). Luego de la obtención del ARN, se analiza la calidad del ARN obtenido, se confeccionan las librerías de cada muestra, marcando cada una de forma específica y se secuencian, obteniéndose 4 millones de lecturas aproximadamente por muestra. Todo el proceso se realizará conforme a las instrucciones del fabricante del equipo.

Análisis Bioinformático. Los secuenciadores generan cantidades masivas de datos. Inicialmente estos datos son imágenes de microscopía tomadas durante la fase de secuenciación, que posteriormente el propio equipo convierte en archivos de texto plano, estos son los archivos de salida del secuenciador o lecturas crudas en formato Fastq. La primera herramienta de visualización que se utilizó Fast-QC proporciona una manera rápida y sencilla de visualizar y verificar la calidad de las lecturas obtenidas de la plataforma de secuenciación Illumina Mi-Seq. Provee una interfaz gráfica con un set de módulos que ayudan a realizar un rápido control de calidad de lecturas como el largo de lecturas, contenido GC, niveles de duplicación, calidad de lecturas en base a Phred, entre otras. Una vez identificados los módulos con parámetros no óptimos, se procedió a utilizar el programa Trimmomatic versión 0.36. Uno de los parámetros más importantes a la hora de analizar secuencias es la calidad, la cual es valorada según la escala Phred o Q, la que se expresa normalmente en código ASCII. Este valor de calidad representa la probabilidad de que una base determinada haya sido erróneamente asignada y se representa por un número entero. Para finalizar se obtuvo una muestra filtrada por función por Gene ontology (GO).

Análisis *in silico* de regiones promotoras. Se obtuvo secuencias de la región promotora de los genes blancos de STAT3, de humano, utilizando el programa online Eukariotic Promotor Database disponible en <https://epd.epfl.ch/> seleccionando la región a analizar, 2000pb corriente arriba (-1900) desde el TSS y unos 100pb del 5'UTR.

Luego de obtenidas las secuencias se realizó búsqueda de sitios de unión en Eukariotic Promotor Database. Finalmente, se utilizó el programa TFBind disponible en <http://tfbind.hgc.jp/> para confirmar los sitios de unión específicos hallados en Eukariotic Promotor Database para el factor de transcripción STAT3 en la secuencia de ADN de la región promotora de algunos genes blanco de STAT3.

Análisis estadístico. Todos los ensayos fueron resueltos del promedio de 3 o 5 experimentos independientes realizados ya sea en triplicado o quintuplicado, donde se obtuvo la desviación estándar de cada experimento (incorporado en cada figura). Los análisis estadísticos serán realizados por t-Student (valores de significancia * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

XV Resultados

Análisis de citotoxicidad de Inhibidores de HDACs en células de colon.

La administración de drogas y alimentos de Estados Unidos (US FDA) ha aprobado 4 drogas como inhibidores de HDACs, en el tratamiento contra el cáncer, entre los cuales encontramos a Panobinostat y Nexturastat A. Panobinostat corresponde a un inhibidor no selectivo de HDACs el cuál se utiliza como tratamiento para metástasis de melanoma, cáncer de próstata, Linfoma de Hodking, Mieloma múltiple y cáncer de mama (Yoon, S., & Eom, G. H;2016; Valente, S. y Mai, A. 2014). Por otra parte, Next A, al contrario de Panobinostat, es inhibidor específico de HDAC6. Aun así, ambos son inhibidores utilizados para HDAC6. Para evaluar que inhibidor de HDAC6 es más sensible, específico y menos dañino para las líneas celulares de colon, analizamos la viabilidad celular de distintas líneas celulares de cáncer colorrectal, en presencia de ambos inhibidores. Las células de colon fueron tratadas con concentraciones crecientes desde 0,1 uM a 10uM de droga por 48 hrs, en donde se observó que Nexturastat A presenta un mayor porcentaje de sobrevivencia en todo el rango de concentraciones utilizadas, la cual además mostró una respuesta dependiente de la concentración. Esta tendencia se observó en las tres líneas celulares CCD-841-CoN, HT-29 y HCT-116 (**Figura 8A**). Next A además mostró una respuesta dependiente del tiempo con una concentración constante, en donde se observa una disminución de los niveles de crecimiento celular, el cual es más significativo en las líneas celulares de adenocarcinoma HT-29 (**Figura 8B**)

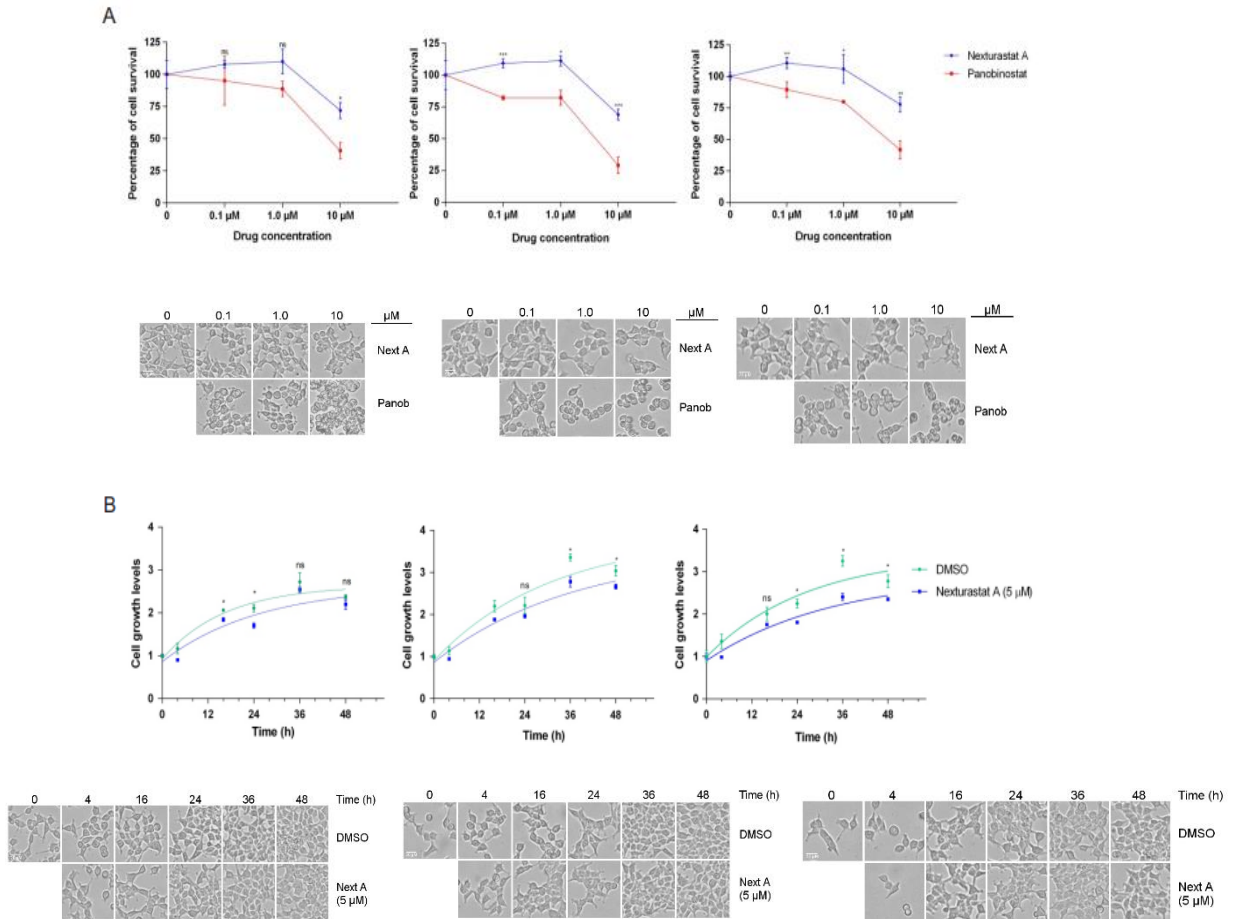


Figura 8. Comparación de viabilidad celular al utilizar HDAC6i. Análisis de viabilidad celular realizados mediante ensayo XTT, luego del tratamiento con Panobinostat y Nexturastat A en líneas celulares de colon CCD-841 y cáncer colorrectal (HCT-116 y HT-29). **A)** Análisis de viabilidad celular luego del tratamiento con inhibidores de HDACs a diferentes concentraciones, células CCD 841 CoN (izquierda), HCT116 (medio) y HT29 (derecha). **B)** Análisis de viabilidad celular luego de tratamiento con 5μM de Nexturastat A a diferentes tiempos de exposición hasta 48 horas. Parte inferior de cada figura, muestra microscopía del crecimiento de las células al exponerlas a los diferentes inhibidores o el vehículo en células CCD 841 CoN (izquierda), HCT116 (medio) y HT29 (derecha).

Modulación de la actividad de STAT3 en células de cáncer colorrectal frente a tratamiento con Nexturastat A.

Como ya hemos visto por literatura, STAT3 necesita fosforilarse para translocar al núcleo y cumplir su función de regulación positiva en genes blanco como PD-L1. Es por lo que, primero analizamos la expresión de STAT3 y de PD-L1, como blanco transcripcional de STAT3. Se analizaron las tres líneas celulares CCD-841-CoN, HCT-116 y HT-29 en condiciones similares, igual cantidad y tiempos de exposición a Next A (5 μ M). Nuestros resultados evidencian que la línea celular normal de colon CCD-841-CoN (**Figura 9A y D**), no sufre una variación en la expresión de PD-L1 y tampoco en STAT3. Mientras que en las líneas celulares de cáncer como HCT-116 (**Figura 9B y E**) se observa una disminución de la expresión de PD-L1 desde las 2 hrs, ya podemos observar una disminución de la expresión de PD-L1, al igual que en las células HT-29 (**Figura 9C y F**) donde observamos una disminución significativa de PD-L1 desde las 8 hrs. En ambas líneas celulares cancerígenas no existen cambios de expresión para STAT3. Esta información confirma que al añadir Next A en células de cáncer de colon se genera una disminución de los blancos transcripcionales de STAT3. Para dejar esto en evidencia es que observamos los niveles de acetilación y fosforilación de STAT3 y algunos blancos de STAT3 y HDAC6, como PD-L1 y tubulina respectivamente. Realizando la comparación en células control de colon y células de cáncer (**Figura 10A**). En la línea celular de colon control (Figura 10A) podemos observar una muy baja modulación de las modificaciones analizadas. En cambio, en las líneas celulares de CCR (**Figura 10B y 10C**) existe una disminución de la fosforilación a la hora 8, que es revertida a la hora 24. Aun así, la acetilación de STAT3 aumenta desde la hora 4 y decae a la hora 8 justo cuando aumentan los niveles de fosforilación, aun así, los niveles de acetilación comienzan a aumentar de forma paulatina hasta la hora 24. Una tendencia similar sufre ambas líneas celulares de CCR, donde (**Figura 10B y 10C**) HCT-116 y HT-29, al recibir el mismo tratamiento presenta una disminución lineal de los niveles de fosforilación inverso a lo que ocurre con los niveles de acetilación. Estos resultados presentan la tendencia esperada y reafirmando que al añadir Next A inducimos la inhibición de HDAC6, activando STAT3 y afectando sus blancos transcripcionales.

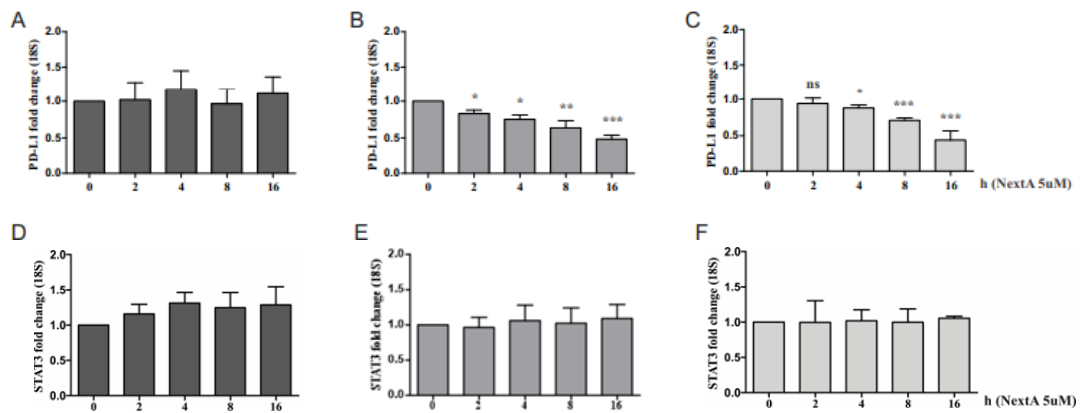


Figura 9. Niveles de expresión de ARNm. Se analizó la expresión de STAT3 y PD-L1 en el tiempo de 0 a 16 horas con exposición de NextA. **A-C)** Expresión de PD-L1, en las células CCD-841-CoN (A), HCT-116 (B) y HT-29 (C). **D-F)** Expresión de STAT3, en las líneas celulares CCD-841-CoN (D), HCT-116 (E) y HT-29 (F). Ambos experimentos en las tres líneas celulares fueron tratados con Next A (5uM) y en la condición 0 se utilizó DMSO. Los niveles de PD-L1 y STAT3 fueron normalizados con los niveles de 18s.

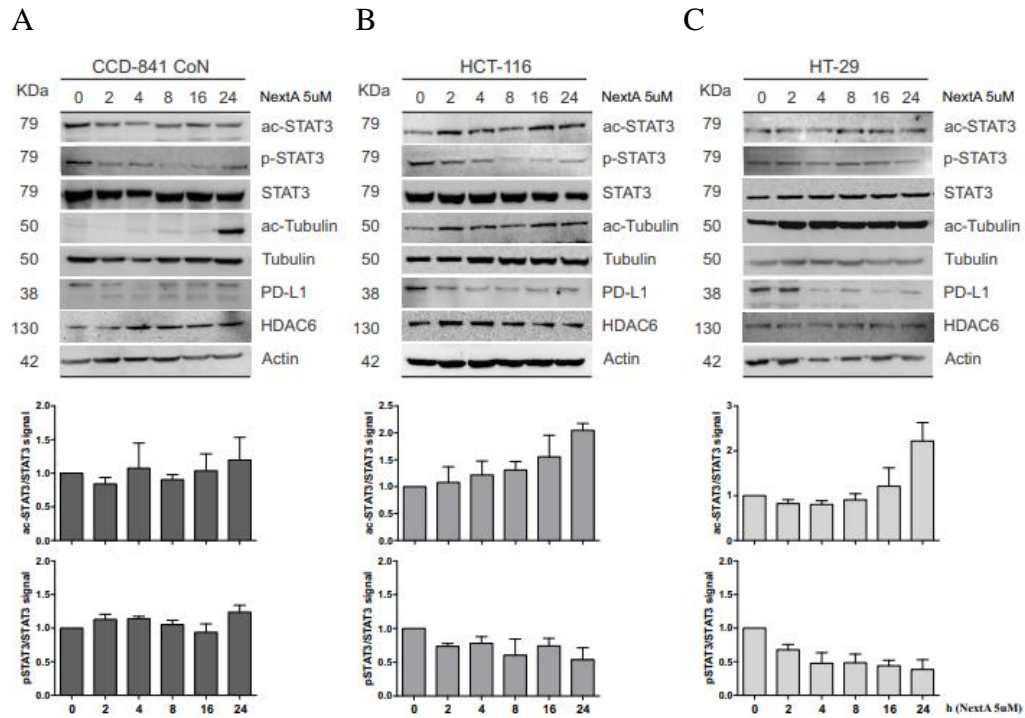


Figura 10. Detección y cuantificación de las modificaciones postraduccionales de STAT3. A-C) Se analizó la expresión de distintas proteínas y los niveles de acetilación y fosforilación de STAT3 a distintos tiempos de exposición (0 a 24 hrs) con NextA (5uM) y en la condición 0 se utilizó DMSO. En las líneas celulares CCD-841-CoN (A), HCT-116 (B) y HT-29 (C). En las tres líneas celulares se evaluó por Western Blot ac-STAT3, p-STAT3, STAT3, ac-Tubulina, Tubulina, PD-L1, HDAC6 y como control de carga se utilizó actina. El grafico centro se refiere a la cuantificación de la acetilación de STAT3 en el residuo 685 y el grafico inferior la cuantificación de la fosforilación de STAT3 en el residuo 705. Todos los gráficos fueron realizados en n3.

Inducción de la actividad de STAT3 bajo estimulación con IL-6.

Se ha descrito en la literatura que la activación de STAT3 es mediada por los receptores de citoquinas como IL-6 e INF- γ (Stephanou, A. y Latchman, DS; 1999). Para observar el efecto de STAT3 en sus genes blanco, se analizaron los niveles relativos de ARNm de PD-L1 bajo la estimulación con IL-6 e INF- γ (**Figura 11A**). Se observa que la estimulación con IL-6 aumenta significativamente los niveles de PD-L1 luego de 16 horas de exposición, mientras que al estimular con INF- γ no se observan cambios significativos. También se analizaron los niveles de IL-6 bajo las mismas condiciones anteriores, evidenciando que no hay cambios significativos en los niveles de ARNm (**Figura 11B**). Al ampliar el rango de exposición con IL-6 de 8 a 24 horas (**Figura 11C**) hay cambios significativos en los niveles de PD-L1 a partir de las 8 horas de exposición, mostrando un aumento a las 16 horas, tanto en HCT-116 (arriba) como en HT-29 (abajo). Para observar el efecto de Next A en PD-L1 en combinación con IL-6 se realizaron exposiciones de 24h y 32h solos y en combinación, (**Figura 11D**) que al utilizar 5 μ M de Next A por 24 horas se observa una disminución de los niveles de PD-L1, efecto que ya fue observado en análisis anteriores. Este, efecto es contrario al observado con la estimulación de IL-6 a 32 horas de exposición, donde los niveles de PD-L1 aumentan significativamente en comparación al control sin tratamiento. Al observar el efecto al combinar 5 μ M de Next A por 24 horas con 30 ng/ μ L de IL-6 por 32 horas se observa que los niveles de PD-L1 disminuyen, reforzando el efecto inhibitor de HDAC6 que ejerce Next A sobre las proteínas blanco de STAT3, efecto observado tanto en HCT-116 (arriba) como en HT-29 (abajo).

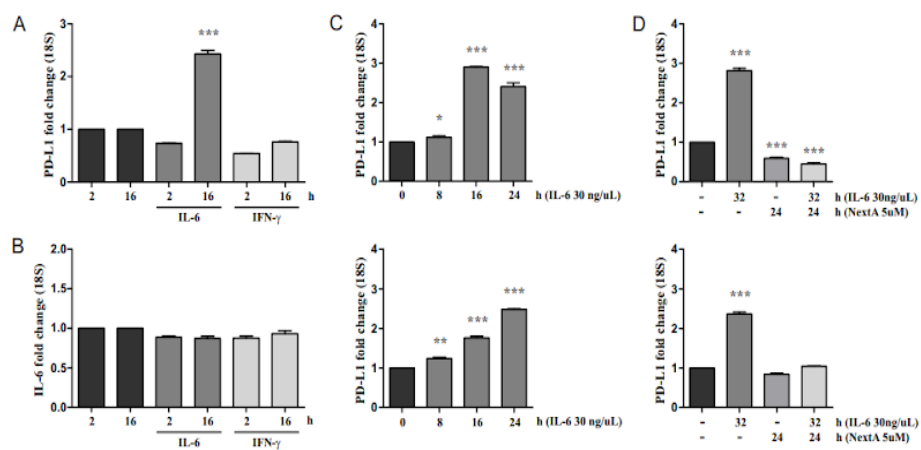


Figura 11. Análisis de la expresión relativa al realizar el tratamiento con citoquinas. **A)** Niveles relativos de PD-L1 sin estimulación y con estimulación de IL-6 e INF- γ a 2 y 16 horas de exposición. **B)** Niveles de IL-6 sin estimulación y con estimulación con IL-6 e INF- γ a 2 y 16 horas de exposición. Gráfico superior HCT-116, inferior HT-29. **C)** Niveles relativos de PD-L1 estimulada con 30 ng/uL de IL-6 a 8, 16 y 24 horas de exposición. Gráfico superior HCT-116, inferior HT-29 **D)** Niveles relativos de PD-L1 estimulada con 5 uM de Nexturastat A y 30 ng/uL de IL-6 por si solos o en combinatoria por 24 y 32 horas de exposición. Gráfico superior HCT-116, inferior HT-29 Los niveles de PD-L1 e IL-6 fueron normalizados con 18s

Activación de STAT3 es regulada por IL-6 y HDAC6 en cáncer colorrectal.

En los resultados anteriores observamos que al añadir Next A, los niveles de la fosforilación de STAT3 en el residuo 705 (pSTAT3) disminuyen, así como la expresión de uno de sus blancos, como es PD-L1. Ante esto nos preguntamos, que pasaría con las modificaciones de STAT3 frente a estímulos con IL-6 y NextA. Para observar el efecto de IL-6 y HDAC6 sobre las modificaciones de STAT3, en las células analizadas (CCR), se identificó por Western Blot, la acetilación de STAT3 (685), la fosforilación de STAT3 (705) y STAT3 total. Se trataron con IL-6 (30 ng/ml) como activador de STAT3 con Next A (5µM) como inhibidor de HDAC6, ambos por si solos y en combinación (**Figura 12**). Se observó que en la línea celular CCD-841-CoN (**Figura 12A**) al comparar la condición control con la que se realizó el tratamiento dual con IL-6/ Next A, existe una disminución de los niveles de acetilación de STAT3. En las líneas celulares de CCR (**Figura 12B-C**) siguen una tendencia bastante similar en donde, el aumento de los niveles de acetilación aumenta cuando se añade Next A, a pesar de añadir IL-6, para potenciar la fosforilación. Ambos procesos se observan de mejor forma en los gráficos, donde se realizó la cuantificación, de la señal obtenida por densitometría.

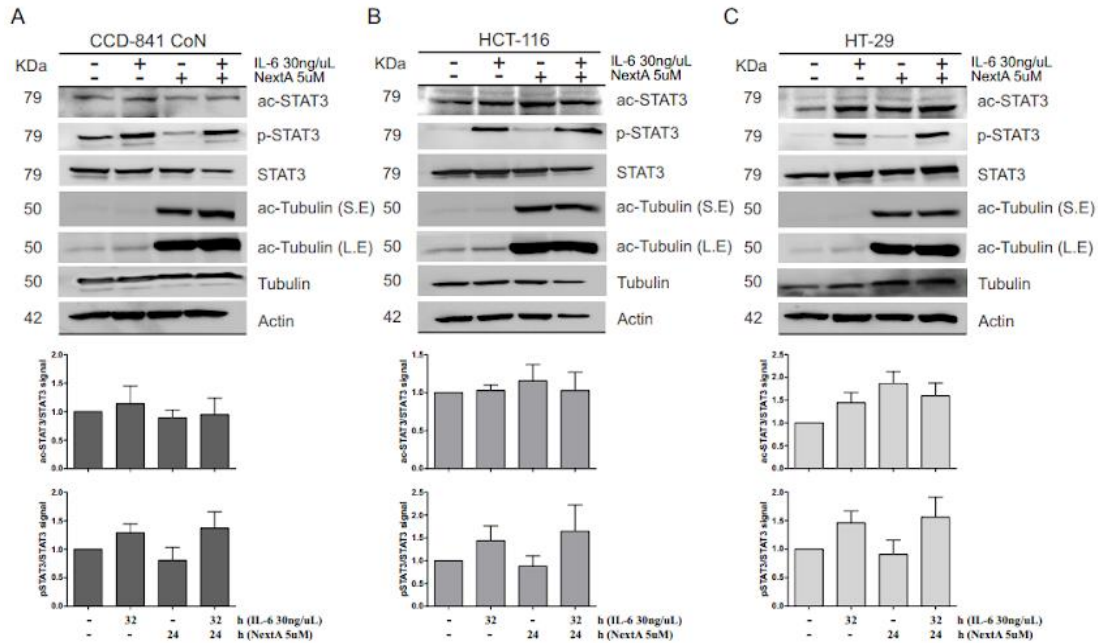


Figura 12. Variación de modificaciones postraduccionales de STAT3. Se analiza cómo se modifica STAT3, en términos de acetilación y fosforilación bajo tratamiento con 5 uM Next A y 30 ng/uL de IL-6 en tres líneas celulares de CCR. **A)** CCD-841-CoN, **B)** HCT-116 y **C)** HT-29. Se observaron las variaciones de las modificaciones de STAT3, y como control de carga se utilizó actina. En todas las líneas celulares se cuantifico la acetilación (grafico medio) y fosforilación (grafico inferior).

Efecto de la inhibición de HDAC6 sobre la actividad de STAT3.

Como la inhibición de HDAC6 impide la remoción de los grupos acetilos de residuos lisina en STAT3, se ve afectada la fosforilación en sus residuos de tirosina como tirosina 705 (Tyr705) (Dees, S., et al; 2020), y por consecuencia la activación de STAT3 se ve afectada (Biersack, B., Nitzsche, B., & Höpfner, M.; 2022; Saraswati, A. P., et al;2020). Utilizamos citometría de flujo para cuantificar los niveles de fosforilación de STAT3 en las tres líneas celulares de colon. Para poder lograr esto medimos los niveles basales de fosforilación de STAT3 en las tres líneas celulares (CCD-841-CoN, HCT-116 y HT-29) y luego generamos tres condiciones donde añadimos un estimulador para la activación de STAT3 como es IL-6, una segunda condición con Next A para inhibir a HDAC6 y una tercera condición donde se añadieron ambos compuestos. En las células CCD-841-CoN (**Figura 13A**) se observa un aumento de la fosforilación en comparación a la basal cuando añadimos IL-6 y que esta misma disminuye al añadir Next A, similar a la basal. Por otra parte, cuando añadimos IL-6 y Next A, si bien existe un aumento en la fosforilación esta disminuye en comparación a lo observado en la condición basal o cuando añadimos IL-6, demostrado a través de la cuantificación de las señales y picos de intensidad (**Figura 13D**). En las células HCT-116 (**Figura 13B**) se puede observar que cuando se añade IL-6 y Next A de forma conjunta a diferencia de las células normales los niveles de fosforilación disminuyen de forma significativa con respecto a cuando solo añadimos IL-6, esto se representa en el gráfico de cuantificación (**Figura 13E**). Algo similar ocurre con las células HT-29 (**Figura 13C**) donde la respuesta de los niveles de fosforilación al tratamiento con Next A es similar a la basal y sigue la tendencia esperada cuando se realiza el tratamiento en conjunto. En relación con evidencia en el gráfico de cuantificación (**Figura 13F**).

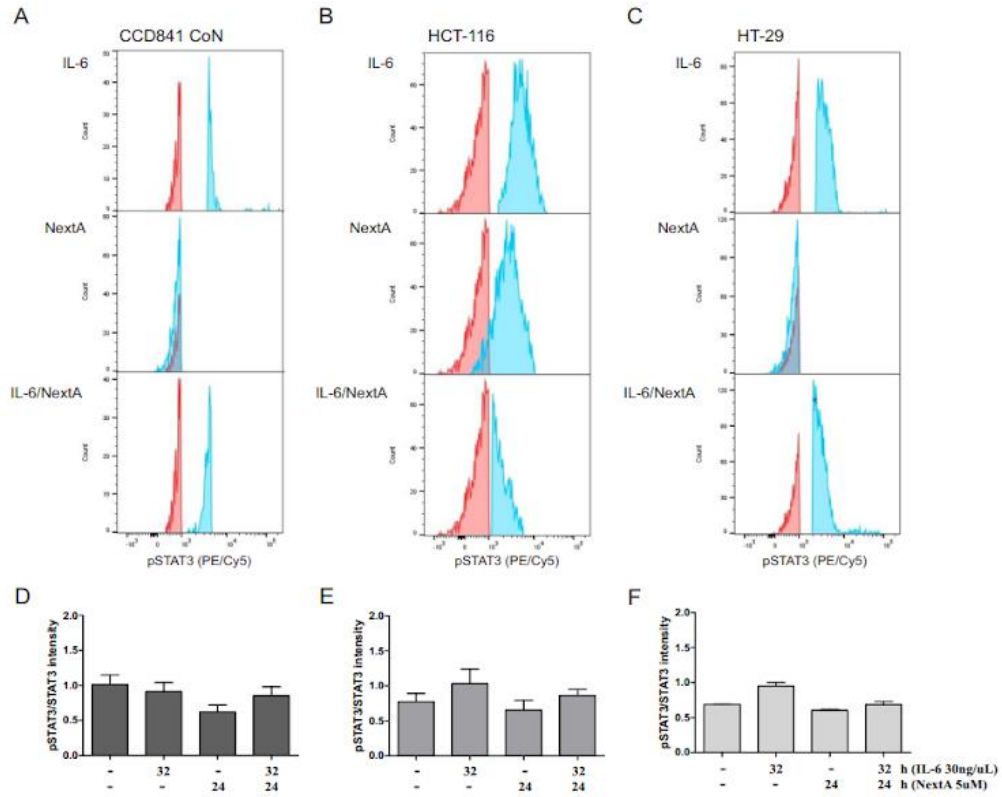


Figura 13. Nexturastat A reduce los niveles de fosforilación de STAT3 (705), en células de CCR. Se analizó los niveles de fosforilación de STAT3 a través de citometría. Se observan los picos de detección de pSTAT3 (A-C) comparando los diferentes tratamientos con NextA e IL-6. Se cuantificaron las intensidades de señal de cada condición (D-F). Se realizó con CCD-841-CoN (A y D), HCT-116 (B y E) y HT-29 (C y F).

Modificación de la localización de STAT3.

Se ha establecido en la literatura que, como consecuencia de su activación, STAT3 migraría al núcleo para cumplir su función como activador transcripcional de varios genes (Wang, B., et al; 2018). Para determinar este proceso se observó el cambio de localización, generado por el efecto IL-6 y/o Next A sobre la activación de STAT3 en células de CCR. Al igual que los análisis anteriores, las células CCD-841-CoN se utilizaron como control de células normales (**Figura 14A**). En las células de CCR, HCT-116 y HT-29 (**Figura 14B-C**), al realizar la comparación del control respecto a la condición con el tratamiento entre IL-6/Next A, en donde en la condición control se observa un patrón de la señal de la fosforilación de STAT3 que tiende a encontrarse mayormente citoplasmático. En la condición con IL-6 un patrón mixto (núcleo-citoplasma), en donde resalta la intensidad nuclear. Mientras que en el tratamiento dual de IL-6/Next A, el patrón de marcación sigue siendo mixto, pero mayor entre más agresiva sea la neoplasia como es el caso de las células HT-29 que representan un adenocarcinoma de colon, observamos que a pesar de tener un estimulador como IL-6, en presencia de Next A la intensidad de la fosforilación nuclear disminuye y aumenta en el citoplasma. Además, en la condición con IL-6 se observa un patrón mixto (núcleo-citoplasma), en donde resalta la intensidad en el citoplasma. Mientras que en el tratamiento de IL-6/Next A, el patrón de marcación sigue siendo mixto. Esto se corrobora a través de fraccionamiento núcleo citoplasma (**Figura 14D-F**) analizado a través de Western Blot, la fosforilación de STAT3 en las tres líneas celulares, mantiene una tendencia similar a la vista a través de inmunofluorescencia. Por otro lado, analizamos la acetilación de STAT3 que sería indicador de encontrarse principalmente inactivo. Tanto, en las células CCD-841-CoN (**Figura 14G**), como las células de CCR, HCT-116 y HT-29 (**Figura 14H-I**), al realizar la comparación de señales del control respecto a la condición con el tratamiento dual con IL-6/Next A, se observa un patrón de la señal de ac-STAT3 que tiende a encontrarse mayormente citoplasmático. Por lo que, estos datos sugieren que, STAT3 frente al tratamiento con HDAC6i, no podría migrar al núcleo de forma normal, disminuyendo su función.

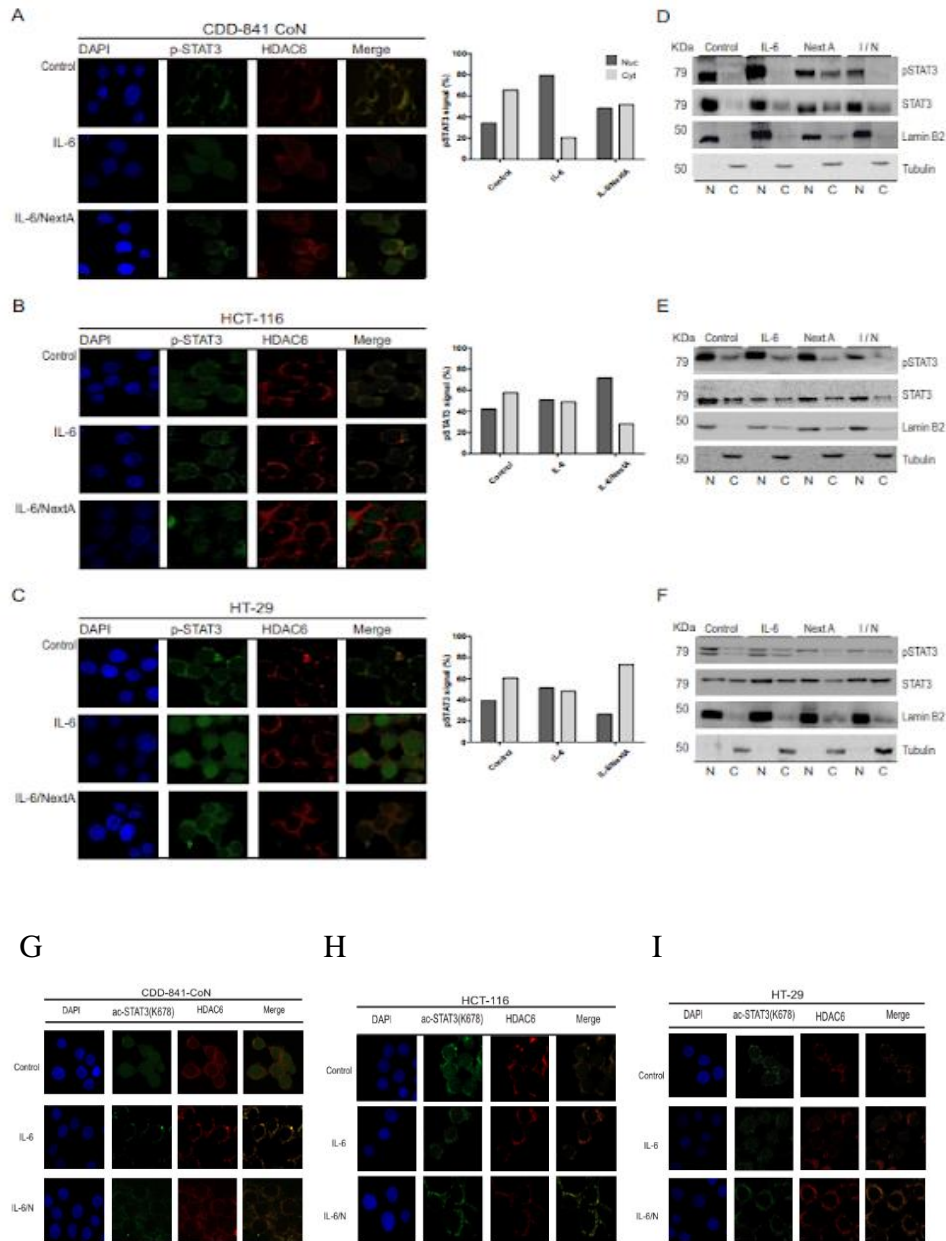


Figura 14. Modificación de la localización celular de STAT3. A-C) Microfotografías representativas de células de colon (normal; A) (CCR; B y C) tomadas con microscopio confocal muestran el cambio de localización entre núcleo y citoplasma (verde). Gráficos centrales, análisis cuantitativos de las células que poseían pSTAT3. Dapi como marcaje nuclear. D-F) Análisis de fraccionamiento celular para detectar los niveles de fosforilación de STAT3 en células de colon los cuales se analizaron por Western Blot, como control nuclear se utilizó Lamin B2 y como control citoplasmático tubulina. G-I) Microfotografías representativas de células de colon tomadas con microscopio confocal muestran el cambio de localización de ac-STAT3, entre núcleo y citoplasma (verde). Se utilizó Dapi como marcador nuclear.

Modulación transcripcional del eje HDAC6/STAT3.

Se enviaron a secuenciar 24 muestras, representando 4 condiciones para cada línea celular trabajada en duplicado. De este análisis, se obtuvieron secuencias adecuadas, con buena profundidad, por lo que pudimos realizar el análisis completo. Se analizaron combinatorias de datos, comparando los niveles de expresión entre el control y la condición de tratamiento con IL-6 (**Figura 15A**), obteniendo, pocos los genes que lograban tener un DEG y un valor p considerable para asignarlo como diferencialmente expresado CCD 841-CoN (izquierda), HCT-116 (medio) y HT-29 (derecha). También se compararon los niveles de expresión entre la condición del tratamiento con IL-6 y el tratamiento de IL-6/Next A (**Figura 15B**), en donde obtuvimos los cambios de expresión de múltiples genes con DEG y un valor p considerable, permitiéndonos observar los genes diferencialmente expresados, siendo mayoritarios en la línea celular HT-29. Sin embargo, en la línea celular HCT-116, también logramos encontrar múltiples genes con expresión diferencial. Finalmente, se realizó una búsqueda de genes involucrados en respuesta inmune e inflamatoria (**Figura 15C**). Se hallaron más de 30 genes diferencialmente expresados entre las líneas celulares de CCR, siendo los más destacados los que responden en las células HT-29. Con estos genes seleccionados se realizó búsqueda de vías inmunomoduladoras que puedan estar afectadas por estos genes.

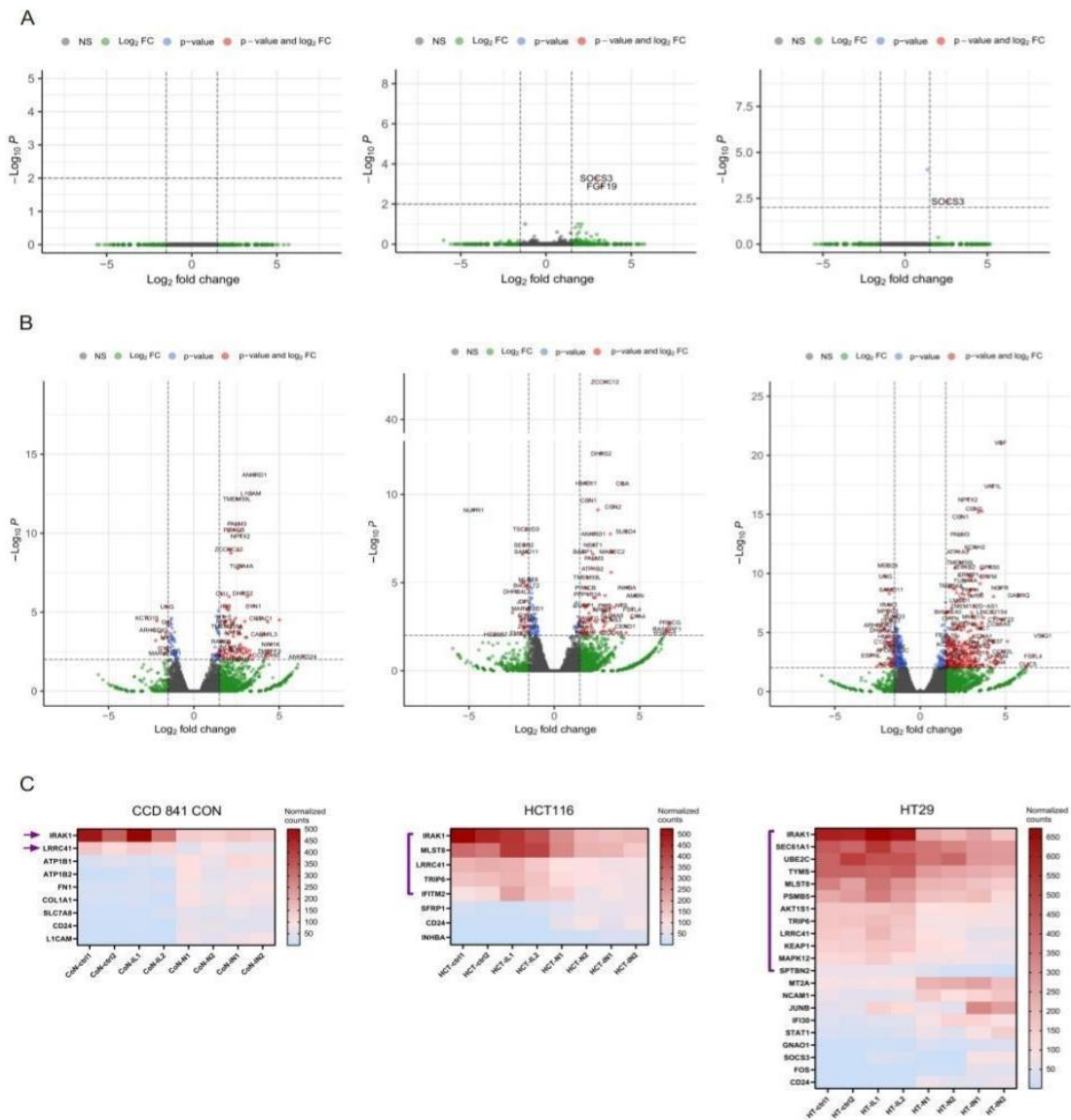


Figura 15: Expresión diferencial de genes en células de colon y CCR. A) (superior) gráfica de volcán de genes expresados diferencialmente (DEG) al comparar el control con el tratamiento con IL6 30 ng/uL en la línea celular CCD 841 CoN (izquierda). Para definir DEGs, usamos un FDR <0.01 como punto de corte. Los puntos verdes representan genes que contienen un cambio significativo, pero no un valor p suficiente para ser considerados DEG. Los puntos rojos representan DEG, con un cambio significativo y un valor p considerable en las células CCD 841 CoN (izquierda), HCT116 (medio) y HT29 (derecha) B) Igual que arriba, pero se compara IL6 versus IL6 seguido de tratamiento con Nexturastat A 5mM. Las células HCT116 (medio). Las células HT29 (derecha) C) Expresión génica normalizada con puntuación Z de una selección de DEG de genes inmunitarios identificados al comparar IL6 frente a IL6 seguido de tratamiento con Nexturastat A en células CCD 841 CoN (izquierda), HCT116 (medio) y HT29 (derecha), respectivamente. Los DEG de cada línea celular se clasificaron combinando el análisis de la ruta InnateDB y Shiny GO (KEGG). La expresión génica se normalizó mediante el método de normalización del cuartil superior de Bullard et al (2010), implementado en edgeR.

Vías inmunomoduladoras involucradas en cáncer colorrectal.

Se realizó un análisis de genes que se expresaban en las distintas vías que se vieron afectadas por el tratamiento de IL-6/Next A. Esto se realizó en las líneas celulares de colon, CCD-841-CoN (**Figura 16A**), HT-29 (**Figura 16B**) y HCT-116 (**Figura 16C**), donde se observó las agrupaciones de genes asociadas a cada vía.

También evaluamos la interacción de estos genes de interés implicados en la respuesta frente a IL-6/NextA. Para esto empleamos el gráfico de String logrando establecer una interacción de vías inmunes relacionados de forma *virtual* (**Figura 16D**), señalando genes como: IRAK1, TRIP6, TYMS, LRRC41, MLST8, IFITM2, PSMB5, KEAP1, SEC61A1 y MAPK12. Muestra los genes claves afectados con el tratamiento como TRIP6 involucrado en la vía de respuesta de IL-1, TYMS involucrado en las vías de respuesta de citoquinas, IRAK1 que aporta en la regulación de la vía de señalización mediada por citoquinas, entre otros (**Tabla 4**).

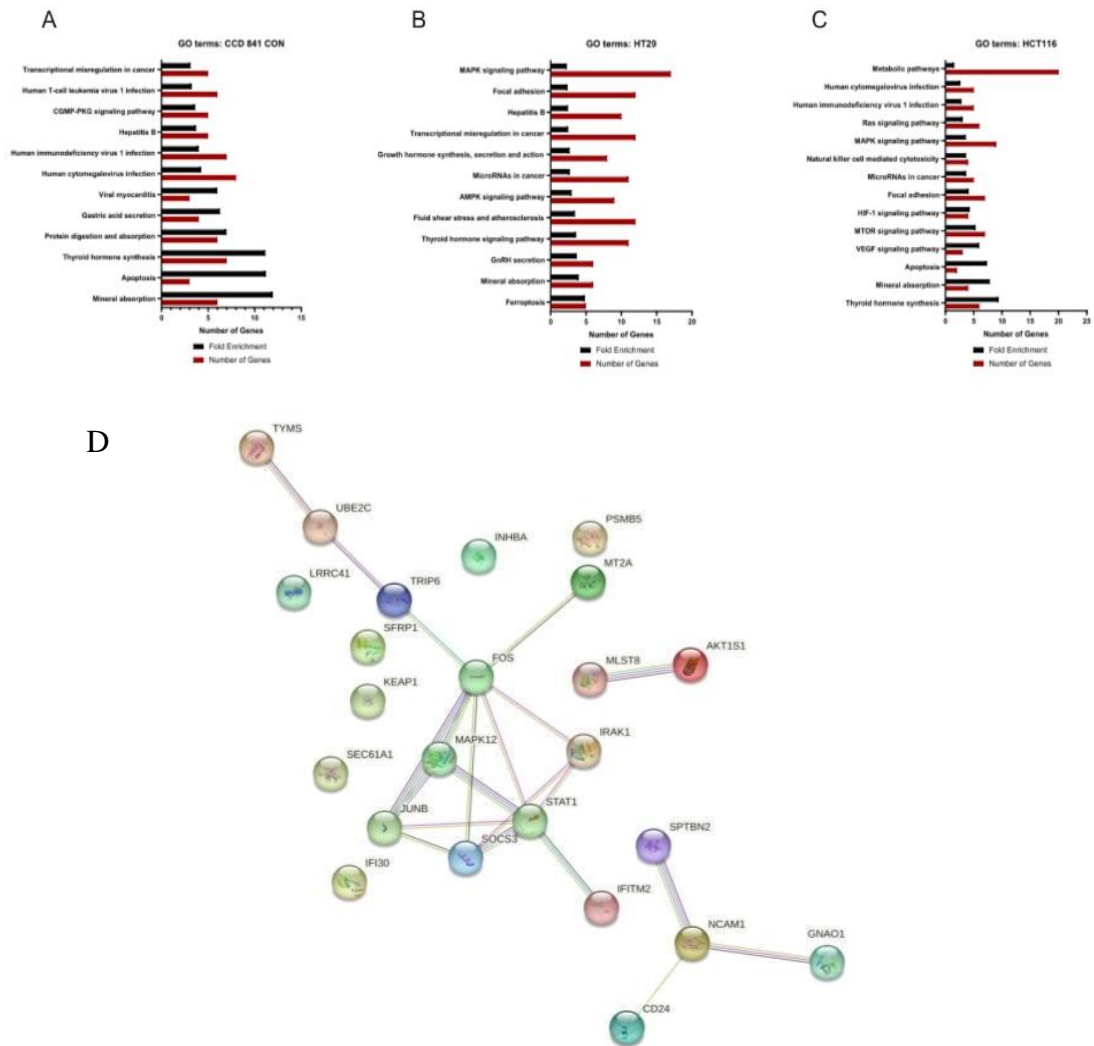


Figura 16: Vías afectadas por la inhibición de HDAC6 en un contexto proinflamatorio; Se encontraron distintas vías afectadas por el tratamiento con Next A en células de CCR. En **A-C)** observamos las vías implicadas en cada línea celular, donde en las barras negras encontramos los sitios de unión y en rojo el número de genes presentes CCD 841-CoN (izquierda), HT-29 (medio) y HCT-116 (derecha). **D)** Análisis de red STRING (versión 11) de genes inmunitarios comunes entre células HT29 y HCT116. La red se construyó utilizando la puntuación media del grupo de confianza (0,400), calculada combinando las probabilidades de los diferentes canales de evidencia y corregida por la probabilidad de observar aleatoriamente una interacción. Agrupamos las redes utilizando un parámetro de inflación MCL de 3. Se observan los genes IRAK1, TRIP6, TYMS, LRR41, MLST8, IFITM2, PSMB5, KEAP1, SEC61A1 y MAPK12.

Tabla 4. Vías Inmune afectadas por tratamiento dual (IL-6/NextA). Análisis de GO term efectuado en plataforma innate DB.

GO Term Name	GO Term ID	ORA P-Value	ORA P-Value (Corrected)	Genes
CCD 841 CON				
regulation of cytokine-mediated signaling pathway	GO:0001959	2,94E-04	0,045255088	CD24; IRAK1;
leukocyte migration	GO:0050900	0,001084112	0,098016477	ATP1B1; ATP1B2; COL1A1; FN1; L1CAM; SLC7A8;
HT29				
interleukin-1 receptor complex	GO:0045323	8,52E-04	0,072985684	IRAK1; TRIP6;
regulation of cytokine-mediated signaling pathway	GO:0001959	8,52E-04	0,072985684	CD24; IRAK1;
interferon-gamma-mediated signaling pathway	GO:0060333	0,003741249	0,13652494	IFI30; MT2A; NCAM1; SOCS3; STAT1;
response to cytokine	GO:0034097	0,004300633	0,138742174	FOS; GNAO1; JUNB; STAT1; TYMS;
HCT116				
interleukin-1 receptor complex	GO:0045323	3,01E-04	0,05499427	IRAK1; TRIP6;
regulation of cytokine-mediated signaling pathway	GO:0001959	3,01E-04	0,05499427	CD24; IRAK1;
negative regulation of B cell differentiation	GO:0045578	9,89E-04	0,085684335	INHBA; SFRP1;

Identificación de sitios de unión para el factor de transcripción STAT3.

Para poder observar los sitios de unión STAT3, se analizaron los genes con expresión diferencial obtenidos por la secuenciación y que están relacionados con vías inmunes, como son IRAK1, TRIP6, TYMS, LRRC41, MLST8, IFITM2, PSMB5, KEAP1, SEC61A1 y MAPK12. Realizamos una búsqueda de los sitios de unión para el factor de transcripción STAT3 en 2000 pares de bases de la región promotora desde la posición +100 de 10 genes mediante un programa de búsqueda de sitios de unión para factores de transcripción disponibles online (Eukariotic Promoter Database) (**Figura 17**). Además, a través de Genecards se confirmó la función de estos genes y analizamos la estructura de cada uno de estos genes en el Genome Browser del genoma humano a través de la base de datos del navegador del genoma de UCSC para corroborar que estos promotores son altamente activados por acetilación, comprobado por los datos disponibles en esta base de datos en estudios realizados en 7 líneas celulares diferentes (GM12878, H1-hESC, HSMM, HUVEC, K562, NHEK y NHLF) (**Figura 18**).

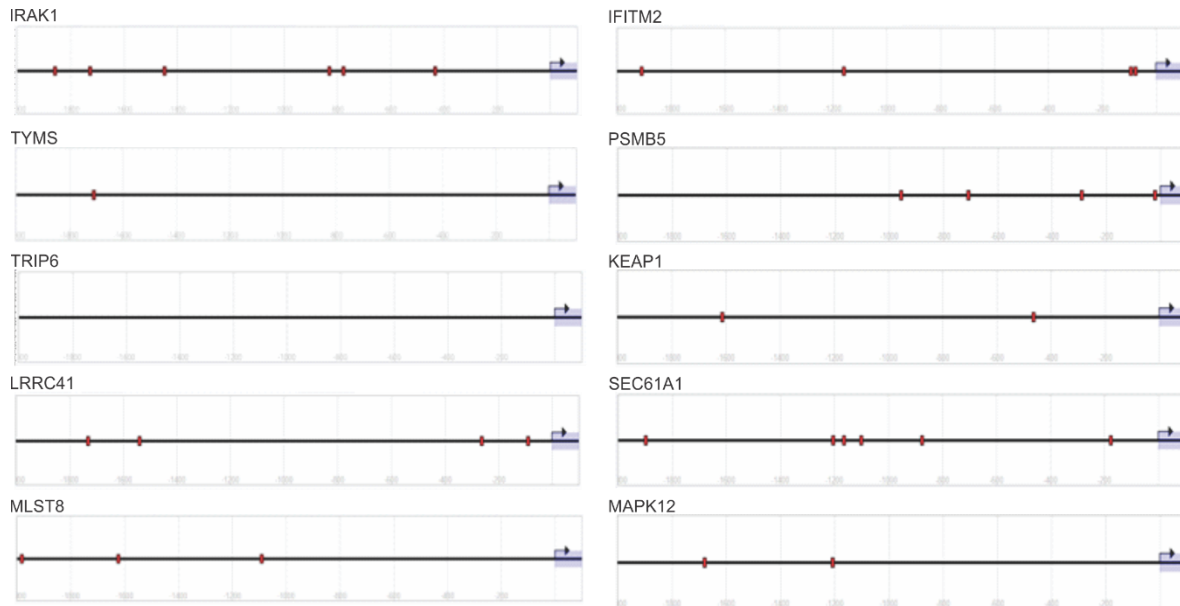


Figura 17: Esquema de los sitios de unión para STAT3 en los genes blanco. En rojo se observan los sitios de unión para STAT3 detectados *in silico* en los 2000pb proximales de los distintos genes blancos analizados, como son: IRAK1, TRIP6, TYMS, LRRC41, MLST8, IFITM2, PSMB5, KEAP1, SEC61A1 y MAPK12

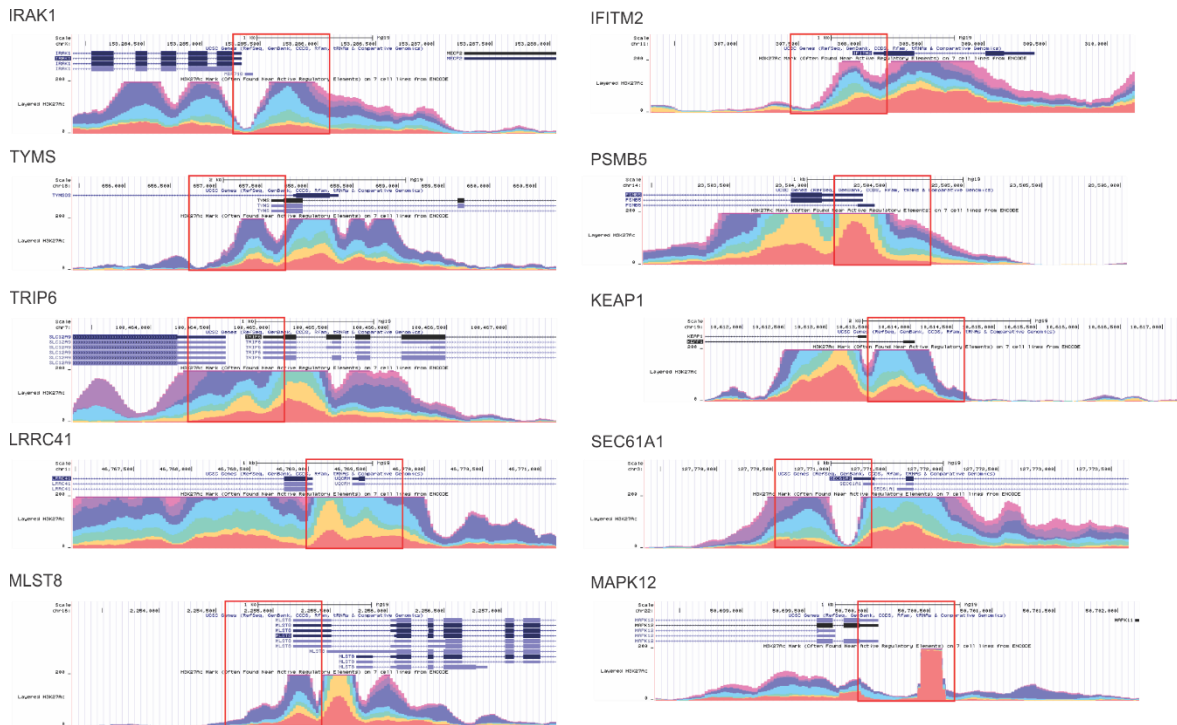


Figura 18: Presencia de acetilación en la región promotora de los genes blanco. Se observa la acetilación de las regiones promotoras en los genes blanco en el genoma humano, utilizando la base de datos del genoma browser de UCSC: actualización de 2022. *Ácidos Nucleicos Res. 7* de enero de 2022; 50 (D1): D1115-D1122. PMID: 34718705; PMC: PMC8728131. Las capas de detección de histona H3K27Ac se marcan con diferentes colores dentro de cada gen (GM12878; rojo, H1-hESC; naranja, HSMM; verde, HUVEC; celeste, K562; azul, NHEK; lila y NHLF; rosa). El recuadro rojo, marca la región promotora de cada gen analizado.

XVI Discusión.

Estudios previos han descrito que el factor de transcripción STAT3, es un factor oncogénico que se encuentra involucrado en la regulación de protooncogenes y proteínas anti-apoptóticas, asociado a CCR cuando se encuentra activo (Yan, B., et al. 2015). Además, se ha demostrado que HDAC6 se encuentra en diversas etapas que llevan a la formación y progresión del cáncer. Sin embargo, se desconoce su papel clínico en tratamientos oncológicos. Por otra parte, se ha relatado que HDAC6 interviene sobre la activación de STAT3, en dónde está deacetilasa remueve grupos acetilos dejando el dominio -SH2 de STAT3 libre. Esto se ha verificado en distintas patologías como, linfomas (Cosenza, M., et al; 2020), osteosarcoma (Keremu, A., Aimaiti, A., Liang, Z., & Zou, X. (2019), melanoma (Lienlaf, M., et al; 2016), mama (Banik, D., et al; 2020) y enfermedades inflamatorias (Cheng, C., et al; (2019). En nuestro trabajo evidenciamos que cuando potenciamos la activación de la vía de STAT3 aumentaban los niveles de fosforilación de STAT3, pero si añadíamos un inhibidor de HDAC6, disminuyen los niveles de fosforilación.

Se ha reportado previamente que los inhibidores de histonas deacetilasas afectan la sobrevivencia de células tumorales (Bolden et al., 2006). Los hallazgos obtenidos en esta investigación concuerdan con lo reportado en literatura, dónde se evidencia la potente actividad antitumoral contra células de cáncer que ejerce Panobinostat (Chao et al., 2013; Edwards, Li, Atadja, Bhalla, & Haura, 2007; Helland et al., 2016; Mehdi et al., 2012), incluidos estudios en células de cáncer colorrectal *in vitro* (Shao et al., 2008) en contraste con el menor efecto de Next A. A pesar de esto, el inhibidor Next A ha mostrado generar un aumento en la inducción de apoptosis y muerte en células de mieloma y cáncer de ovario (Moufarrij et al., 2020), esto sugiere que la inhibición selectiva de HDAC6 provocaría cambios en los niveles de acetilación y desacetilación de proteínas (Yan, B., et al; 2015). Los resultados de esta investigación revelaron que el efecto de Next A depende del contexto celular. En ensayos exploratorios de viabilidad e inducción de la apoptosis, se observó que el tratamiento con Next A afecta de manera dosis dependiente a las líneas celulares de CCR y que posee una mejor sobrevivencia en comparación con Panobinostat, inhibidor de HDAC (Villagra, 2019).

En altas concentraciones con ambos tratamientos se observó una notoria disminución de la viabilidad en los dos modelos celulares de CCR, y muy bajo efecto sobre células de colon normales, mientras que a concentraciones bajas esta disminución fue modesta en

comparación con ambos inhibidores de HDAC. También observamos los niveles de crecimiento celular en donde en donde con las células HT-29, encontramos una disminución significativa del crecimiento celular en comparación con las células tratadas con un vehículo y mucho mayor comparada con la línea celular control de colon CCD-841-CoN. Estos resultados soportan la noción de que las drogas pueden actuar de manera diferente según el estadio en que se encuentra el paciente, específicamente en esta tesis se demuestra que la línea HT-29, línea celular de adenocarcinoma, es más sensible al tratamiento con Next A.

En cáncer a pesar de existir terapias dirigidas, y a pesar de la innovación con inmunoterapia, la supervivencia en pacientes sigue siendo baja. Como evidencia clínica, un estudio publicado en *Journal of clinical oncology*, el 2011, en donde se describió el caso de un hombre de 38 años con melanoma y BRAF mutado, que además tenía metástasis subcutáneas generadas por la neoplasia primaria (melanoma), el paciente recibió un tratamiento con PLX4032, inhibidor de BRAF. Luego de unas semanas, tuvo una disminución evidente de las metástasis de melanoma, sin embargo, a las 23 semanas presentó una recidiva mucho más agresiva. Otros hallazgos han señalado que STAT3 regula la actividad del eje PD-1/PD-L1 (Tumeh, P. C., et al; 2014). Dejando en evidencia que, en células de melanoma, cuando STAT3 está presente la expresión de PD-L1 aumenta en comparación de cuando este no se encuentra. Estos datos son muy interesantes, pero en general las diferentes neoplasias se comportan de manera distinta. Específicamente, en relación con la tesis presentada, en CCR, que podría ocurrir que la respuesta sea diferente. Por ejemplo, la expresión de marcadores inmunes como PD-L1 es alrededor de un 50% más baja en CCR que la observada en melanoma (*JCI Insight* 2019; 4 (6): e126908). Además, en CCR, se ha descrito el mecanismo de activación de STAT3, cuando STAT3 se activa, este homodimeriza y es capaz de translocar al núcleo para cumplir su función oncogénica. Nuestros resultados mostrados en esta tesis, específicamente en células de CCR pudo evidenciar que la respuesta depende de la estirpe celular y por ende, del grado de malignidad de la lesión. Esto debido a que observamos que cuando STAT3 está fosforilado o acetilado no se encuentra en su totalidad en el citoplasma o en el núcleo en una condición control, pero cuando se estimula la vía de activación de STAT3, la localización de pSTAT3 se encuentra mayormente en el núcleo. La función de HDAC6 y lo que se ha descrito de las modificaciones de STAT3, no se esperaba que un inhibidor de HDAC6 pudiera disminuir los niveles de fosforilación. Sin embargo, es lo que observamos, también observamos que cuando se aplica el HDAC6i la localización de pSTAT3 es mayormente citoplasmática. Aunque esta respuesta no es total, mejor dicho, no todo pSTAT3 se localiza en el citoplasma, pero si en su mayoría y esto queda en evidencia en nuestros resultados, sobre todo en la línea celular HT-29.

En relación a la expresión de HDAC6 en distintos tipos de cáncer, se ha descrito en algunos cánceres, como en mama, glioblastoma, ovario, entre otros, que HDAC6 aumenta su expresión en comparación con el tejido normal. En el mismo estudio describieron que en CCR, HDAC6 disminuye su expresión en comparación con el tejido normal (Ruijter, AJD, et al., 2003). Sin embargo, lo importante es que se sigue expresando HDAC6 en este tipo de tumores. Además, nosotros observamos que en las líneas celulares de colon tanto normal, como carcinoma y adenocarcinoma los niveles de expresión de HDAC6 son constantes. En nuestro estudio, además analizamos cómo la inhibición de HDAC6 mediante el uso de Next A, un inhibidor selectivo de HDAC6, disminuye los niveles de pSTAT3 en modelos celulares de CCR, y además se exploró el desenlace de la inhibición de HDAC6 en la actividad del factor de transcripción STAT3. En este trabajo mostramos cómo varían los niveles de fosforilación dependiendo de las condiciones, como, por ejemplo, cuando HDAC6 está inhibido ocurre de forma proporcional un aumento de la acetilación conforme disminuye la fosforilación de STAT3. Al tener el efecto en la expresión y el comportamiento de los factores STAT3 y HDAC6, realizamos citometría de flujo para modificaciones post-traduccionales de activación de STAT3, donde mostramos un aumento de los niveles de fosforilación de STAT3 en un contexto celular pro-inflamatorio al tratar las células con IL-6. Este resultado, se puede relacionar con la hiperactivación de STAT3 en cáncer y que cuando utilizamos Next A en este contexto inflamatorio, estos disminuyen similar a lo observado en una condición basal (**Figura 19**).

En este contexto, se ha informado previamente que la inhibición de HDAC6 puede modular la expresión génica en varios modelos de cáncer mediante el factor de transcripción STAT3 (Keremu et al., 2019; Lienlaf et al., 2016). Por ello investigamos mediante RT-qPCR si en nuestro modelo ocurre de forma similar. Se pudo comprobar que en células de cáncer colorrectal HT-29 y HCT-116 existe una correlación con lo publicado en investigaciones anteriores, observando una notoria disminución de los niveles de PD-L1 a nivel de ARNm dependiendo del tiempo y concentración con el tratamiento con Next A, mientras que en células CCD-841-CoN, no se observó efectos en los niveles de PD-L1. Además, se observó que los niveles de ARNm de STAT3 no son alterados bajo la inhibición de HDAC6 en ninguna de las condiciones analizadas, resultados que son concordantes con lo descrito en la literatura en modelos de melanoma y osteosarcomas respaldando, que HDAC6 es capaz de modular la expresión de PD-L1 indirectamente (Keremu et al., 2019). El rol de HDAC6 en la regulación de la vía STAT3 se ha informado anteriormente en células presentadoras de antígeno (APC) y células de melanoma (Cheng, Lienlaf, Wang, et al., 2014; Lienlaf et al., 2016). Aunque el mecanismo de regulación exacto no se comprende completamente, se ha demostrado que la eliminación genética y la inhibición farmacológica de HDAC6

disminuirían la fosforilación de STAT3 afectando la expresión transcripcional de varios blancos del factor de transcripción, incluidos PD-L1. Sin embargo, STAT3 solo sería reclutado al promotor si es fosforilado y activado previamente (Fang et al., 2014; Fujita et al., 2015; Lienlaf et al., 2016).

Además, de lo ya discutido, a través de la secuenciación 3' de ARNm por BRBseq confirmamos, en las condiciones de tratamiento que utilizamos, que son múltiples genes los que ven modificada su expresión, ya sea de forma directa o indirecta y algunos de estos cumplen una función en vías inmunomoduladoras (innateDB), lo cual se ve afectado por la acetilación/fosforilación de STAT3. Es así como, finalmente gracias al análisis de BRBseq, logramos tener una cohorte de 10 genes con función en respuesta inmune e inflamatoria que estarían presentes en las líneas celulares de CCR. Nueve de estos genes presentan sitios de unión para STAT3 en su región promotora (2000 pb), hallados por análisis *in silico*, con lo cual se sugiere que STAT3 podría estar regulándolos de forma directa. Solo un gen (TRIP6) no presentó sitios de unión para STAT3 en la región promotora analizada, lo que podría sugerir, que este gen sea modulado de forma indirecta, o poseer sitios de unión más distales dentro de la región promotora. Además, podemos proponer que estos promotores tienen alta capacidad de ser acetilados, así como se observa en el genoma browser, considerando las 7 líneas celulares diferentes que están incorporadas en la base de datos. De esta forma, sugerimos que el mecanismo transcripcional que ocurre al momento de activar o inhibir la vía a diferentes niveles está regulada por la acción inicial de HDAC6.

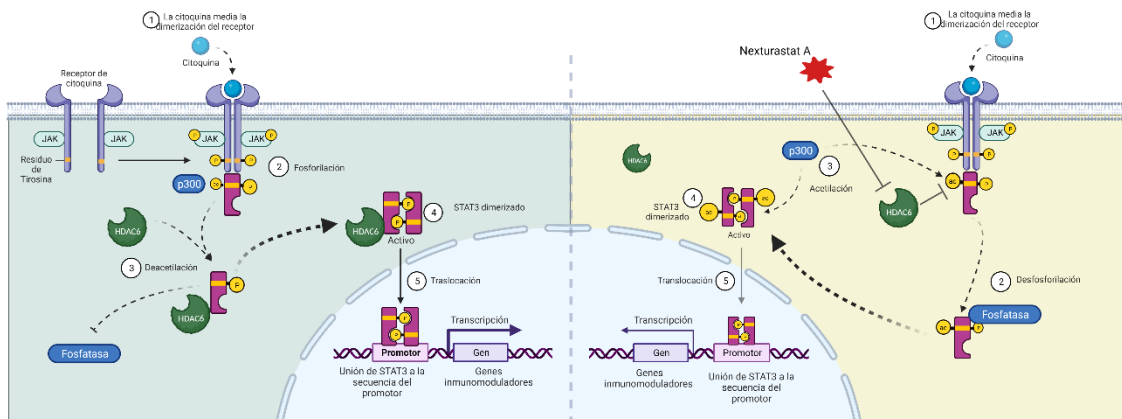


Figura 19: El rol del eje HDAC6/STAT3. (Izquierda) Observamos que cuando una citoquina se une al receptor JAK este se fosforila, promoviendo la fosforilación del residuo de tirosina 705 de STAT3, para que esto suceda HDAC6 debe remover el grupo acetilo del residuo de lisina 685. Hecho esto STAT3 dimeriza y transloca al núcleo para unirse a su promotor y potenciar la expresión de genes inmunomoduladores, en cáncer esta vía se encuentra hiperactivada, potenciando la proliferación exacerbada de células cancerígenas. (Derecha) Una forma de disminuir la función de STAT3, es que no ocurra una hiperactivación de STAT3 y esto lo podemos regular de forma exógena a través de un inhibidor de HDAC6 llamado Nexturastat A. Esto generaría que no se removiera el grupo acetilo de el residuo de lisina 685, obteniendo como resultado que la actividad de STAT3 se verá disminuida.

XVII Conclusión y proyecciones.

Los resultados de este trabajo de tesis apuntan a que el efecto que produce la inhibición selectiva de HDAC6 es capaz de inducir apoptosis y disminuir la viabilidad celular de ambos modelos celulares de cáncer colorrectal, estudiados. Sin embargo, la eficacia de esto depende del contexto celular, de la dosis y el tiempo de tratamiento. Analizando el efecto de otro inhibidor no selectivo de HDAC6, sobre la viabilidad celular pudimos observar que Next A tiene mejor respuesta tanto sobre la viabilidad celular como en el crecimiento celular en la línea celular normal de colon.

Para comprender la funcionalidad del eje HDAC6/STAT3 en un contexto similar al cáncer, generamos un ambiente pro-inflamatorio y luego intervinimos la vía para observar el efecto del inhibidor de HDAC6 en un contexto más cercano con el microambiente tumoral, así dilucidar cómo este afecta la fosforilación de STAT3, esto lo cuantificamos a través de citometría de flujo, se observó el cambio en su localización a través de inmunocitoquímica y fraccionamiento celular (núcleo/citoplasma). Además, confirmamos que el tratamiento utilizado no afecta la expresión del factor de transcripción en células de cáncer colorrectal.

A lo largo de este trabajo logramos comprender que STAT3 es un regulador de múltiples genes en las células de cáncer colorrectal, y si bien esto ya se dilucida en otros trabajos, nosotros ahora sabemos cuáles son los genes que se ven afectados en estos modelos de cáncer colorrectal, y cuales están involucrados en respuesta inmune. Esto lo realizamos utilizando el método de secuenciación del extremo 3' del ARNm, conocido como BRBseq, el cual es un método innovador, que permite obtener una secuenciación de ARN de una forma rápida. Logrando obtener la regulación transcripcional general en las condiciones de tratamientos, así como los genes que están involucrados en vías inmunomoduladoras en las células de cáncer colorrectal.

Finalmente, para lograr descifrar mejor el mecanismo de acción del eje HDAC6/STAT3 a nivel transcripcional sobre las vías inmunomoduladoras, además, de haber realizado ensayos donde se evidencia que la activación de STAT3, ya sea por presencia de acetilaciones y/o fosforilaciones específicas que se ven afectada por la inhibición de HDAC6 y búsqueda *in silico* de sitios de unión para STAT3 en la región promotora de algunos genes. Se torna necesario como proyección, definir y testear las regiones promotoras por qPCR y después de realizar ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) para el factor de transcripción STAT3.

Además, como ya hemos señalado gracias a nuestros hallazgos respaldamos nuestra hipótesis de que la inhibición de HDAC6 promueve la disminución de la función de STAT3, ya que cuando añadimos un inhibidor selectivo y cuantificamos la fosforilación de STAT3 esta disminuye en comparación a cuando HDAC6 no está inhibido, incluso añadiendo un agente estimulante para su activación de STAT3 como es IL-6 y por ende, disminuye la expresión de las vías inmunomoduladoras, por ejemplo, un blanco conocido asociado al control inmunitario en células de cáncer colorrectal como PD-L1 donde observamos que este disminuye su expresión conforme aumentaban los niveles de acetilación de STAT3. Ante esto es que nosotros afirmamos nuestra hipótesis y proponemos el hallazgo de nuevas vías de estudio, como método de innovación para tratar de forma más específica y eficaz y poder apoyar de forma más dirigida el tratamiento a personas con cáncer colorrectal.

XVIII Bibliografía

Alsaab, H. O., Sau, S., Alzhrani, R., Tatiparti, K., Bhise, K., Kashaw, S. K., & Iyer, A. K. (2017). Inhibición de la señalización del punto de control PD-1 y PD-L1 para la inmunoterapia del cáncer: mecanismo, combinaciones y resultados clínicos. *Fronteras en farmacología*, 8, 561.

Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2016). Los sellos moleculares del control epigenético. *Nature Reviews Genetics*, 17(8), 487-500.

Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulación de la cromatina por modificaciones de las histonas. *Cell Research*, 21(3), 381-395.

Banik, D., Noonpalle, S., Hadley, M., Palmer, E., Gracia-Hernández, M., Zevallos-Delgado, C., ... & Villagra, A. (2020). HDAC6 juega un papel no canónico en la regulación de las respuestas inmunes antitumorales, la diseminación y la invasividad del cáncer de mama. *Cancer research*, 80(17), 3649-3662.

Bakaris, S., Cetinkaya, A., Ezberci, F. y Ekerbicer, H. (2008). Expresión de la proteína del homeodominio CDX2 en adenoma y adenocarcinoma colorrectal. *Histología e histopatología*.

Bleier, J. I. y Wilkins, K. B. (2016). Fisiología del colon. En el libro de texto ASCRS de colon y cirugía rectal (pp. 27-35). Springer, Cham.

Bolden, J. E., Peart, M. J. y Johnstone, R. W. (2006). Actividades anticancerígenas de los inhibidores de histona desacetilasa. *Reseñas de Nature Drug discovery*, 5(9), 769-784.

Bonnefoy, N., Olive, D., & Vanhove, B. (2019). Próxima generación de anticuerpos contra los puntos de control inmunitarios. *Ciencias de la medicina: M/S*, 35(12), 966-974.

Chao, H., Wang, L., Hao, J., Ni, J., Chang, L., Graham, P. H., ... Li, Y. (2013). El inhibidor de la histona desacetilasa en dosis bajas, LBH589, potencia el efecto anticancerígeno de docetaxel en el cáncer de ovario epitelial a través de la vía PI3K/Akt in vitro. *Cartas de Cáncer*, 329(1), 17-26.

Cheng, F., Lienlaf, M., Wang, H. W., Pérez-Villarroel, P., Lee, C., Woan, K. y Sotomayor, E. M. (2014). Un papel novedoso para la histona desacetilasa 6 en la regulación de la vía tolerogénica STAT3/IL-10 en APC. *The Journal of Immunology*, 193(6), 2850-2862.

Cheng, C., Shan, W., Huang, W., Ding, Z., Cui, G., Liu, F., ... & Yin, Z. (2019). ACY-1215 exhibe efectos antiinflamatorios y condroprotectores en condrocitos humanos con osteoartritis a través de la inhibición de las vías de señalización STAT3 y NF- κ B. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 2464-2471.

Cosenza, M., Civallero, M., Marcheselli, L., Sacchi, S., & Pozzi, S. (2020). Citarinostat y Momelotinib co-objetivo HDAC6 y JAK2/STAT3 en líneas celulares malignas linfoides: una nueva combinación terapéutica potencial. *Apoptosis*, 25(5), 370-387.

Coutzac, C., Adam, J., Soularue, E., Collins, M., Racine, A., Mussini, C., ... & Chaput, N. (2017). Eventos adversos relacionados con la inmunidad del colon: el bloqueo anti-CTLA-4 y anti-PD-1 inducen entidades inmunopatológicas distintas. *Revista de Crohn y Colitis*, 11(10), 1238-1246.

Darvin, P., Toor, S. M., Nair, V. S., & Elkord, E. (2018). Inhibidores del punto de control inmunitario: avances recientes y biomarcadores potenciales. *Medicina experimental y molecular*, 50(12), 1-11.

Dees, S., Pontiggia, L., Jasmin, J. F. y Mercier, I. (2020). STAT3 fosforilado (Tyr705) como biomarcador de respuesta al tratamiento con pimezida en cáncer de mama triple negativo. *Biología y terapia del cáncer*, 21(6), 506-521.

Dyck, L., & Mills, K. H. G. (2017). Puntos de control inmunitarios y su inhibición en el cáncer y las enfermedades infecciosas. *European Journal of Immunology*, 47(5), 765-779.

Edwards, A., Li, J., Atadja, P., Bhalla, K. y Haura, E. B. (2007). Efecto del inhibidor de histona desacetilasa LBH589 contra células de cáncer de pulmón humano dependientes del receptor del factor de crecimiento epidérmico. *Terapéutica Molecular del Cáncer*, 6(9), 2515-2524.

Gao, L., Cueto, M. A., Asselbergs, F. y Atadja, P. (2002). Clonación y caracterización funcional de HDAC11, un nuevo miembro de la familia de las histonas desacetilasas humanas. *Revista de Química Biológica*, 277(28), 25748-25755.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: La siguiente generación. *cell*, 144(5), 646-674.

Hannibal, M. C., Ruzzo, E. K., Miller, L. R., Betz, B., Buchan, J. G., Knutzen, D. M., & Chance, P. F. (2009). El análisis de secuenciación del gen SEPT9 revela mutaciones recurrentes en la amiotrofia neurálgica hereditaria. *Neurology*, 72(20), 1755-1759.

Helland, Ø., Popa, M., Bischof, K., Gjertsen, B. T., McCormack, E. y Bjørge, L. (2016). El panobinostat HDACi muestra inhibición del crecimiento tanto in vitro como en un modelo de xenoinjerto quirúrgico ortotópico bioluminiscente de cáncer de ovario. *PLoS ONE*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158208>

Iwai, Y., Terawaki, S. y Honjo, T. (2005). El bloqueo de PD-1 inhibe la propagación hematológica de células tumorales poco inmunogénicas mediante un mayor reclutamiento de células T efectoras. *Inmunología internacional*, 17(2), 133-144.

Jung, G., Hernández-Illán, E., Moreira, L., Balaguer, F., & Goel, A. (2020). Epigenética del cáncer colorrectal: biomarcador y potencial terapéutico. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(febrero), 111-130.

Kandel, S., Adhikary, P., Li, G. y Cheng, K. (2021). La vía de señalización TIM3/GA19: un objetivo emergente para la inmunoterapia contra el cáncer. *Cartas de Cáncer*, 510, 67-78.

Keremu, A., Aimaiti, A., Liang, Z., & Zou, X. (2019). Papel de la vía HDAC6/STAT3 en la regulación de la expresión de PD-L1 en líneas celulares de osteosarcoma. *Quimioterapia y farmacología del cáncer*, 83(2), 255-264.

Kube, D., Rieth, H., Eskdale, J., Kreamsner, P. G. y Gallagher, G. (2001). Caracterización estructural de la región flanqueante 5' distal del gen de la interleucina-10 humana. *Genes & Immunity*, 2(4), 181-190.

Li, X., Chen, Y., Liu, X., Zhang, J., He, X., Teng, G. y Yu, D. (2017). Las interacciones Tim3/GA19 entre las células T y los monocitos dan como resultado un bucle de retroalimentación inmunosupresora que inhibe las respuestas Th1 en pacientes con osteosarcoma. *Inmunofarmacología internacional*, 44, 153-159.

Liu, L., Wang, Y., Miao, L., Liu, Q., Musetti, S., Li, J., & Huang, L. (2018). La inmunoterapia combinada de nanovacuna de ARNm de MUC1 y bloqueo de CTLA-4 inhibe eficazmente el crecimiento del cáncer de mama triple negativo. *Molecular Therapy*, 26(1), 45-55.

Lienlaf, M., Pérez-Villarroel, P., Knox, T., Pabon, M., Sahakian, E., Powers, J., ... & Villagra, A. (2016). Papel esencial de HDAC6 en la regulación de PD-L1 en melanoma. *Oncología molecular*, 10 (5), 735-750.

Matsuguma, H., Nakahara, R., Igarashi, S., Ishikawa, Y., Suzuki, H., Miyazawa, N., ... & Yokoi, K. (2008). Cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio patológico I con niveles elevados de antígeno carcinoembrionario sérico preoperatorio: características clinicopatológicas y pronóstico. *Revista de cirugía torácica y cardiovascular*, 135(1), 44-49.

Migheli, F., & Migliore, L. (2012). Epigenetics of colorectal cancer, 312-318. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01829.x>

Ministerio Salud. (2018). Informe de evaluación científica basada en la evidencia disponible. Condición de Salud: Cáncer Colorectal Tecnología Sanitaria Evaluada: Bevacizumab, Cetuximab y Panitumumab. Retrieved from MINSAL website: <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/10/Cáncer-Colorectal.pdf>

Menter, D. G., Davis, J. S., Broom, B. M., Overman, M. J., Morris, J., & Kopetz, S. (2019). De vuelta al futuro del subtipo molecular de consenso del cáncer colorrectal. *Informes actuales de gastroenterología*, 21(2).

Moufarrij, S., Srivastava, A., Gomez, S., Hadley, M., Palmer, E., Austin, P. T., ... & Chiappinelli, K. B. (2020). La combinación de inhibidores de DNMT y HDAC6 aumenta la señalización inmune antitumoral y disminuye la carga tumoral en el cáncer de ovario. *Informes científicos*, 10(1), 1-12.

Oszukowski, P., y Pięta-Dolińska, A. (2011). Tratamiento del retraso del crecimiento fetal intrauterino. *Ginecología y Obstetricia-proyecto médico*, 2(20), 26-34.

Patel, S. P., & Kurzrock, R. (2015). La expresión de PD-L1 como biomarcador predictivo en la inmunoterapia del cáncer. *Molecular cancer therapeutics*, 14(4), 847-856.

Rowshanravan, B., Halliday, N., & Sansom, D. M. (2018). CTLA-4: un objetivo en movimiento en inmunoterapia. *Blood, Revista de la Sociedad Americana de Hematología*, 131(1), 58-67.

Ruijter, A. J. D., GENNIP, A. H. V., Caron, H. N., Kemp, S. y KUILENBURG, A. B. V. (2003). Histona desacetilasas (HDAC): caracterización de la familia HDAC clásica. *Revista bioquímica*, 370(3), 737-749.

Ruijter, AJD, GENNIP, AHV, Caron, HN, Kemp, S. y KUILENBURG, ABV (2003). Histona desacetilasas (HDAC): caracterización de la familia HDAC clásica. *Revista bioquímica*, 370 (3), 737-749.

Sánchez-Vega, F., Mina, M., Armenia, J., Chatila, W. K., Luna, A., La, K. C., Schultz, N. (2018). Vías de señalización oncogénica en The Cancer Genome Atlas. *Cell*, 173(2), 321-337.e10.

Shao, W., Growney, J., Feng, Y., Wang, P., Yan-Neale, Y., O'Connor, G., ... Atadja, P. (2008). Potente actividad anticancerígena de un inhibidor de la pan-desacetilasa panobinostat (LBH589) como agente único en modelos tumorales in vitro e in vivo. *Investigación del Cáncer*, 68(9 Suplemento).

Saraswati, A. P., Relitti, N., Brindisi, M., Osko, J. D., Chemi, G., Federico, S., ... & Campiani, G. (2020). Inhibidores selectivos de HDAC6 cubiertos con espiroindolina: diseño, síntesis, análisis estructural y evaluación biológica. *Cartas de química médica de ACS*, 11(11), 2268-2276.

Siskova, A., Cervena, K., Kral, J., Hucl, T., Vodicka, P. y Vymetalkova, V. (2020). Adenomas colorrectales-genética y búsqueda de nuevos biomarcadores de cribado molecular. *Revista internacional de ciencias moleculares*, 21(9), 3260.

Stephanou, A. y Latchman, DS (1999). Regulación transcripcional de los genes de proteínas de choque térmico por factores de transcripción de la familia STAT. *Expresión génica The Journal of Liver Research*, 7(4-5), 311-319.

Sugie, T. (2018). Inmunoterapia para el cáncer de mama metastásico. *Oncología clínica china*, 7(3), 28-28.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Estadísticas mundiales sobre el cáncer 2020: Estimaciones de GLOBOCAN de la incidencia y mortalidad mundial de 36 cánceres en 185 países. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.

Sweeney, C., Boucher, K. M., Samowitz, W. S., Wolff, R. K., Albertsen, H., Curtin, K., ... y Slattery, M. L. (2009). Modelo de árbol oncogenético de mutaciones somáticas y metilación del ADN en tumores de colon. *Genes, cromosomas y cáncer*, 48(1), 1-9.

Thanki, K., Nicholls, M. E., Gajjar, A., Senagore, A. J., Qiu, S., Szabo, C., Chao, C. (2017). Subtipos moleculares consensuados de cáncer colorrectal y sus implicaciones clínicas. *Revista internacional de biología y biomedicina*, 3(3), 105-111.

Tesoriere, A., Dinarello, A. y Argenton, F. (2021). Los roles de las modificaciones postraduccionales en las actividades y funciones biológicas de stat3. *Biomedicina*, 9(8), 956.

Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J., Robert, L., ... & Ribas, A. (2014). El bloqueo de PD-1 induce respuestas al inhibir la resistencia inmunitaria adaptativa. *Naturaleza*, 515(7528), 568-571.

Valente, S., & Mai, A. (2014). Inhibidores de moléculas pequeñas de histona deacetilasa para el tratamiento del cáncer y enfermedades no cancerosas: una revisión de patentes (2011-2013). *Opinión experta sobre patentes terapéuticas*, 24(4), 401-415.

Villagra, V. G., Bhuvu, B., Coman, E., Smith, D. O., & Fifield, J. (2019). Alfabetización en seguros de salud: disparidades por raza, etnia y preferencia de idioma. *Am J Manag Care*, 25(3), e71-e75.

Wang, B., Liu, T., Wu, J. C., Luo, S. Z., Chen, R., Lu, L. G., & Xu, M. Y. (2018). STAT3 aggravates TGF- β 1-induced hepatic epithelial-to-mesenchymal transition and migration. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 214-221.

Yang, X. J., & Seto, E. (2003). Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Current opinion in genetics & development*, 13(2), 143-153.

Yan, B., Xie, S., Liu, Z., Luo, Y., Zhou, J., Li, D., & Liu, M. (2015). STAT3 association with microtubules and its activation are independent of HDAC6 activity. *ADN y Biología Celular*, 34(4), 290-295.

Yang, R., Sun, L., Li, C. F., Wang, Y. H., Yao, J., Li, H., ... & Hung, M. C. (2021). GAlectin-9 interactúa con PD-1 y TIM-3 para regular la muerte de células T y es una diana para la inmunoterapia del cáncer. *Nature communications*, 12(1), 1-17.

Yarchoan, M., Albacker, L. A., Hopkins, A. C., Montesion, M., Murugesan, K., Vithayathil, T. T., ... & Jaffee, E. M. La expresión de PD-L1 y la carga mutacional tumoral son biomarcadores independientes en la mayoría de los cánceres. *JCI Insight* 2019; 4 (6): e126908.

Yoon, S., & Eom, G. H. (2016). HDAC and HDAC inhibitor: Para cáncer y enfermedades cardiovasculares. *Revista médica de Chonnam*, 52(1), 1-11.

Zhao, C., Dong, H., Xu, Q. y Zhang, Y. (2020). Inhibidores de la histona desacetilasa (HDAC) en el cáncer: revisión de una patente (2017-presente). *Opinión de expertos sobre patentes terapéuticas*, 30 (4), 263-274.