



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN

FACULTAD DE MEDICINA.

MODULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS EN EL CÁNCER COLORRECTAL.

Yanitza Gutiérrez Monsalve

Tutor: Dr. Matías Hepp

Departamento de Ciencias Básicas y Morfología Facultad de Medicina

Universidad Católica de la Santísima Concepción

Co- Tutora: Dra. Pía Vidal

Departamento de Ciencias Básicas y Morfología Facultad de Medicina

Universidad Católica de la Santísima Concepción

Evaluador externo: Dra. Estefanía Nova

Universidad de Concepción.

Evaluador interno: Dr. Alejandro Villagra

Universidad Católica de la Santísima Concepción.

2026

Concepción, Chile



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE LA SANTÍSIMA CONCEPCIÓN

FACULTAD DE MEDICINA.

MODULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS EN EL CÁNCER COLORRECTAL.

Yanitza Gutiérrez Monsalve.

Tutor: Dr. Matías Hepp

Departamento de Ciencias Básicas y Morfología Facultad de Medicina

Universidad Católica de la Santísima Concepción

Co- Tutora: Dra. Pía Vidal

Departamento de Ciencias Básicas y Morfología Facultad de Medicina

Universidad Católica de la Santísima Concepción

Evaluator externo: Dra. Estefanía Nova

Universidad de Concepción.

Evaluator interno: Dr. Alejandro Villagra

Universidad Católica de la Santísima Concepción.

2026

Concepción, Chile

Acta de Tesis.

A mi tutor, por su confianza en mí; a mi familia, por su apoyo incondicional; a mis amigos, por hacer el camino más agradable; y, sobre todo, a Dios, quien hizo todo esto posible.

Resumen:

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las neoplasias malignas con mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial. Su microambiente tumoral (TME) se caracteriza por una alta infiltración de células inmunológicas, entre las cuales los macrófagos destacan por su abundancia y marcada plasticidad. Según los estímulos presentes en el TME, estos pueden polarizarse hacia un fenotipo M1, de perfil antitumoral, o hacia un fenotipo M2, asociado a funciones protumorales y de reparación tisular. El factor de transcripción STAT3, frecuentemente activado en CCR, promueve la polarización hacia el fenotipo M2. Evidencias recientes sugieren que dicha activación puede ser modulada epigenéticamente mediante la inhibición de la histona desacetilasa 6 (HDAC6), lo que abre nuevas posibilidades terapéuticas para reprogramar la función de los macrófagos en el TME. El objetivo del presente estudio fue evaluar si la inhibición de HDAC6 modula la polarización de macrófagos asociados al CCR mediante la regulación del eje HDAC6/STAT3, favoreciendo un perfil M1 con características antitumorales. Para ello, se utilizó la línea de monocitos humana THP-1, diferenciada a macrófagos mediante PMA y posteriormente polarizada hacia los fenotipos M1 o M2 mediante la adición de citoquinas. Las células fueron tratadas con el inhibidor selectivo de HDAC6 Nexturastat A. La expresión y activación de HDAC6/STAT3 se evaluó mediante Western blot, mientras que la expresión de marcadores de polarización se determinó mediante RT-qPCR, inmunocitoquímica y citometría de flujo. Además, se analizó el efecto del medio condicionado de los macrófagos sobre la expresión génica de células HCT-116 y se evaluó la capacidad fagocítica de los macrófagos mediante cocultivos con células tumorales. Los resultados sugieren que la inhibición de HDAC6 aumentó la acetilación de α -tubulina y disminuyó la fosforilación de STAT3, sin modificar sus niveles totales. A nivel transcripcional, se observaron tendencias compatibles con una disminución de marcadores asociados al fenotipo M2 y un incremento de marcadores M1, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. El análisis proteico mostró un aumento significativo de CD86 y una disminución de CD163 en macrófagos M2 tratados con Nexturastat A, marcadores de fenotipo M1 y M2 respectivamente. Asimismo, el medio condicionado de macrófagos tratados moduló la expresión de genes relacionados con vías inmunomoduladoras y de progresión tumoral en células HCT-116, incluyendo IRAK1, MAPK12, MLST8 y TRIP6. Finalmente, la inhibición de HDAC6 incrementó la capacidad fagocítica de los macrófagos M1. Los resultados obtenidos respaldan parcialmente la hipótesis planteada, sugiriendo que la inhibición selectiva de HDAC6 modula el eje HDAC6/STAT3 y favorece una reprogramación parcial de los macrófagos hacia un fenotipo con características más proinflamatorias. Estos hallazgos posicionan al eje HDAC6/STAT3 como un potencial blanco terapéutico para la modulación del microambiente tumoral en cáncer colorrectal y respaldan la realización de estudios adicionales.

Palabras clave: Cáncer colorrectal, macrófagos, HDAC6, STAT3, polarización, microambiente tumoral.

Abstract:

Colorectal cancer (CRC) is one of the leading causes of cancer incidence and mortality worldwide. Its tumor microenvironment (TME) is characterized by extensive infiltration of immune cells, among which macrophages are particularly abundant and exhibit remarkable functional plasticity. Depending on the stimuli present within the TME, macrophages can polarize toward either an M1 phenotype, characterized by antitumor functions, or an M2 phenotype, associated with protumor activities and tissue repair. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), which is frequently activated in CRC, promotes macrophage polarization toward the M2 phenotype. Recent evidence suggests that STAT3 activation can be epigenetically regulated through inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6), providing a potential therapeutic strategy for reprogramming macrophage function within the TME. The aim of this study was to evaluate whether HDAC6 inhibition modulates the polarization of CRC-associated macrophages through regulation of the HDAC6/STAT3 axis, promoting an M1 phenotype with antitumor characteristics. Human THP-1 monocytes were differentiated into macrophages using phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and subsequently polarized toward M1 or M2 phenotypes. Cells were treated with the selective HDAC6 inhibitor Nexturastat A. HDAC6 and STAT3 expression and activation were assessed by Western blot, whereas macrophage polarization markers were analyzed by RT-qPCR, immunocytochemistry, and flow cytometry. In addition, the effects of macrophage-conditioned media on gene expression in HCT-116 colorectal cancer cells were evaluated, and macrophage phagocytic activity was assessed using tumor cell co-culture assays. The results suggest that HDAC6 inhibition increased α -tubulin acetylation and reduced STAT3 phosphorylation without affecting total STAT3 protein levels. At the transcriptional level, expression profiles showed trends toward reduced M2-associated markers and increased M1-associated markers, although these differences did not reach statistical significance. Protein analysis revealed a significant increase in CD86 expression and a decrease in CD163 expression in M2 macrophages treated with Nexturastat A. Furthermore, conditioned media from treated macrophages modulated the expression of genes involved in immunomodulatory and tumor progression pathways in HCT-116 cells, including IRAK1, MAPK12, MLST8, and TRIP6. Finally, HDAC6 inhibition enhanced the phagocytic activity of M1 macrophages. Overall, the findings partially support the proposed hypothesis, suggesting that selective HDAC6 inhibition modulates the HDAC6/STAT3 axis and promotes partial macrophage reprogramming toward a more pro-inflammatory phenotype. These findings identify the HDAC6/STAT3 axis as a potential therapeutic target for remodeling the tumor microenvironment in colorectal cancer and provide a rationale for further preclinical and translational studies.

Keywords: colorectal cancer, macrophages, polarization, STAT3, HDAC6, tumor microenvironment

Índice

Portada	2
Acta	3
Agradecimientos	4
Resumen	5
Abstract	6
I. Introducción	10
II. Cáncer colorrectal (CCR)	11
III. Microambiente Tumoral y macrófagos	16
IV. Transductor de señales y activador de la transcripción 3 (STAT3)	20
V. Epigenética y	22
VI. Hipótesis y	24
VII. Materiales y Métodos	25
• Cultivo y líneas celulares	26
• Diferenciación de monocitos	26
• Inhibidores enzimáticos	26
• Polarización de macrófagos	26
• Obtención de extractos totales de proteínas	27
• Electroforesis de proteínas y western blot	27
• Inmunocitoquímica directa	27
• Citometría de flujo	28
• Aislamiento de ARN y RT-qPCR	28
• Co-cultivo CCR y macrófagos	29
• Análisis estadístico	29
Resultados	29
• Estandarización	29
• Evaluación de la polarización de macrófagos mediante expresión génica	37
• Evaluación de marcadores proteicos de polarización mediante inmunocitoquímica y citometria de flujo	39
• Efecto de la inhibición de HDAC6 sobre la expresión génica de marcadores de polarización de macrófagos	42
• Expresión génica en células HCT-116 expuestas a medio condicionado derivado de macrófagos polarizados	44
• Evaluación de la captación de células tumorales HCT116 por macrófagos polarizados..	46
Discusion y Conclusiones	48
Referencias	62

Índice de Figuras

Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial (2022).	12
Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer colorrectal en Chile (2022)	13
Figura 3. Etapas y desarrollo del cáncer colorrectal (CCR)	15
Figura 4. Resumen de la composición del microambiente tumoral en lesiones primarias de CCR	16
Figura 5. Estados de polarización de macrófagos y diversidad funcional en el microambiente tumoral	19
Figura 6. Estandarización de Western blot mediante uso de concentraciones crecientes de proteína total	29
Figura 7. Activación de STAT3 por fosforilación tras estimulación con IL-6, IFN- γ	30
Figura 8. Efecto de la inhibición de HDAC6 mediante Nexturastat A sobre la acetilación de α -tubulina y la activación de STAT3.	31
Figura 9. Efecto de IL-6 y Nexturastat A sobre la expresión proteica en monocitos	33
Figura 10. Diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos tras estimulación con PMA.	33
Figura 11. Polarización de macrófagos hacia fenotipo M1.	35
Figura 12. Polarización de macrófagos hacia fenotipo M2.	35
Figura 13. Evaluación de la polarización de macrófagos mediante RT-qPCR.	38
Figura 14. Evaluación de la expresión de marcadores de polarización de macrófagos mediante inmunocitoquímica.	40
Figura 15. Evaluación de la expresión de CD86 en macrófagos polarizados mediante citometría de flujo.	41
Figura 16. Efecto de la inhibición de HDAC6 sobre la expresión génica de marcadores de polarización de macrófagos.	43
Figura 17. Expresión génica en células HCT-116 expuestas a medio condicionado derivado de macrófagos polarizados	45
Figura 18. Evaluación de la captación de células tumorales HCT116 por macrófagos polarizados.	47

Índice de Tablas

Curva estándar y eficiencia de partidores

36

I. Introducción:

El sistema inmune cumple un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis tisular, contribuyendo al control de la proliferación celular y a la eliminación de células que presentan alteraciones. A través de mecanismos de vigilancia inmunológica, células del sistema inmune innato y adaptativo son capaces de reconocer y eliminar células transformadas, limitando así el desarrollo tumoral en etapas tempranas.

Este proceso dinámico entre el sistema inmune y las células tumorales ha sido conceptualizado como immunoedición del cáncer, un modelo que describe tres fases principales: eliminación, equilibrio y escape. En la fase de eliminación, el sistema inmune detecta y destruye eficazmente células tumorales incipientes. Sin embargo, algunas de estas células pueden sobrevivir y entrar en una fase de equilibrio, donde las células inmunes controlan su crecimiento sin erradicarlas completamente. Finalmente, las células tumorales que adquieren mecanismos para evadir el reconocimiento inmunológico progresan hacia la fase de escape, dando origen a un tumor clínicamente detectable.

Una vez establecido, el tumor se desarrolla inmerso en un microambiente tumoral, caracterizado por una compleja red de interacciones entre células cancerígenas y diversas poblaciones celulares no malignas, incluyendo fibroblastos, células endoteliales y células del sistema inmune. Estas interacciones influyen de manera decisiva en la progresión tumoral, la angiogénesis, la invasión y la respuesta a terapias. Dentro de las poblaciones inmunes presentes en el microambiente tumoral, los macrófagos asociados a tumor (TAMs) representan un componente abundante y funcionalmente relevante. Los macrófagos desempeñan funciones clave en la fagocitosis, la presentación antigénica y la secreción de citoquinas y quimioquinas, modulando la respuesta inmune local. Además, su plasticidad funcional les permite adoptar fenotipos con actividades tanto antitumorales como protumorales, dependiendo de las señales presentes en el microambiente, lo que ha impulsado un creciente interés en el desarrollo de estrategias terapéuticas orientadas a modular estas interacciones entre células tumorales y TAMs.

Entre los mecanismos emergentes de regulación de la función inmunitaria destacan los cambios epigenéticos. En este contexto, la histona desacetilasa 6 (HDAC6) ha adquirido especial relevancia debido a su rol en la regulación de proteínas no histónicas y su participación en procesos como la señalización celular, la respuesta inflamatoria y la función de células inmunes. HDAC6 ha sido descrita como un modulador clave de la activación de la vía mediada por el factor de transcripción STAT3, una ruta estrechamente asociada a la supervivencia celular, la inflamación crónica y la polarización de macrófagos hacia fenotipos protumorales.

En conjunto, la comprensión de cómo la inhibición de HDAC6 modula la activación de STAT3 y afecta la diferenciación y polarización de macrófagos en el microambiente tumoral representa una aproximación prometedora para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a reprogramar la respuesta inmune antitumoral.

II. Cáncer colorrectal (CCR):

El cáncer colorrectal (CCR) es una neoplasia maligna que compromete el colon y/o recto, esta neoplasia representa un problema de salud a nivel mundial debido a su alta incidencia y mortalidad. (Islam et al., 2023) Es el tercer tipo de cáncer más frecuente en el mundo y la segunda causa de muerte por neoplasias malignas (Fig.1) (Chen et al., 2023). Durante las últimas décadas, se ha observado un aumento sostenido en la incidencia de esta patología, estimándose que para el año 2035 su incidencia global podría duplicarse (Hossain et al., 2022) lo que pone de manifiesto la urgente necesidad de desarrollar nuevas estrategias de prevención y tratamientos más eficaces.

Si bien los principales factores de riesgo del CCR incluyen la edad avanzada, factores genéticos, ambientales y de estilo de vida, las alteraciones genéticas y epigenéticas —como la activación de oncogenes y señales proliferativas derivadas de un microambiente anormal— desempeñan un rol endógeno en su desarrollo. A la vez, factores exógenos como la obesidad, la inactividad física, el consumo de tabaco o alcohol y la ingesta de carnes procesadas interactúan de manera sinérgica con los factores endógenos, promoviendo tanto la aparición como la progresión del CCR, esto se ve reflejado en el aumento sostenido de las tasas de incidencia del CCR en países en vías de desarrollo, incluyendo regiones de Europa del Este, Asia del Sudeste y América del Sur, una tendencia asociada a cambios en la dieta y el estilo de vida, como una mayor ingesta de alimentos de origen animal y un incremento del sedentarismo, ambos relacionados con el aumento de la prevalencia del sobrepeso y la obesidad (Bray et al., 2024; H. Wang et al., 2021)

En relación con los factores demográficos, la edad constituye el principal factor de riesgo para el CCR, observándose un incremento de la incidencia desde 6 casos por cada 100.000 personas entre los 30 y 34 años, hasta 228 por cada 100.000 en individuos de 80 a 84 años. En promedio, el diagnóstico se realiza alrededor de los 63 años, y el riesgo de desarrollar esta enfermedad es comparable entre mujeres y hombres (4,1 % y 4,4 %, respectivamente), aunque el aumento específico por edad en incidencia y mortalidad tiende a manifestarse de manera más tardía en mujeres (Gupta, 2022; Hossain et al., 2022)

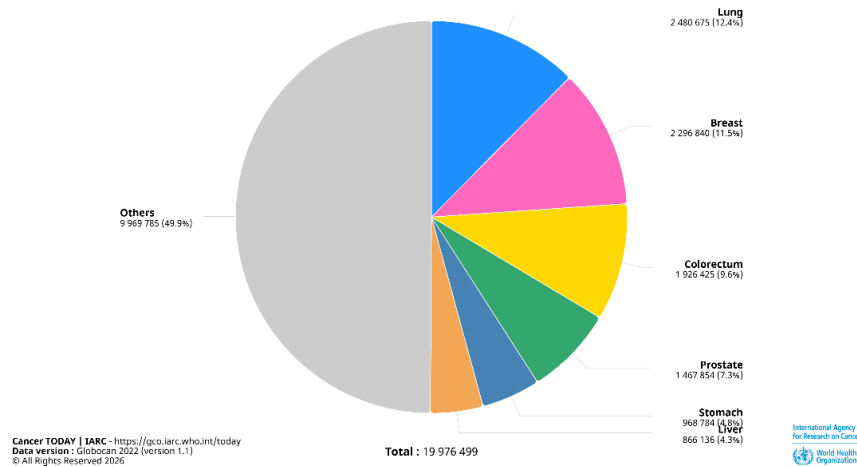
Se estima que, para el período 2030–2035, la incidencia del cáncer colorrectal en América Latina aumentará aproximadamente en un 60 %, alcanzando cerca de 396.000 nuevos casos por año. Asimismo, se proyecta que, para el año 2035, el número total de muertes atribuibles al CCR aumentará en un 71,5 %, tanto para cáncer de colon como de recto, fenómeno que se atribuye en parte al crecimiento y envejecimiento de la población. (Mondschein et al., 2022)

En Chile, las estadísticas indican que las tasas de incidencia de cáncer colorrectal son de 10,8 y 9,6 por cada 100.000 habitantes en hombres y mujeres, respectivamente (Fig.2). En cuanto a la mortalidad, durante el año 2016 las muertes atribuibles al cáncer colorrectal representaron aproximadamente el 9 % del total de fallecimientos por causas oncológicas en el país. (Ministerio Salud, 2018)

Incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial (2022)

A)

Absolute numbers, Incidence, Both sexes, in 2022
Continents



B)

Absolute numbers, Mortality, Both sexes, in 2022
Continents

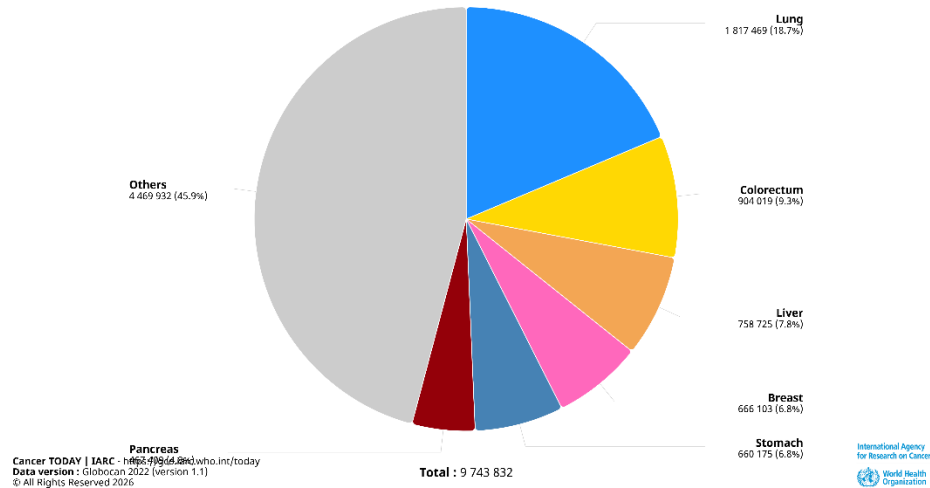
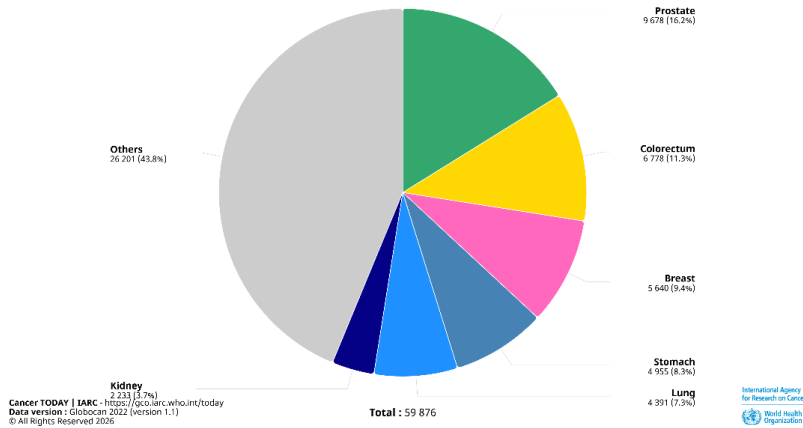


Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial (2022). A) Datos de incidencia publicados por GLOBOCAN 2022, que muestran la distribución de los distintos tipos de cáncer, donde el cáncer colorrectal (CCR) se posiciona como la tercera neoplasia con mayor número de casos nuevos a nivel mundial. B) Datos de mortalidad por cáncer publicados por GLOBOCAN 2022, que posicionan al CCR como la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial. En ambos casos, los datos corresponden a ambos sexos y consideran todas las edades.

Incidencia y mortalidad por Cáncer Colorrectal Chile (2022)

A)

Absolute numbers, Incidence, Both sexes, in 2022
Chile



B)

Absolute numbers, Mortality, Both sexes, in 2022
Chile

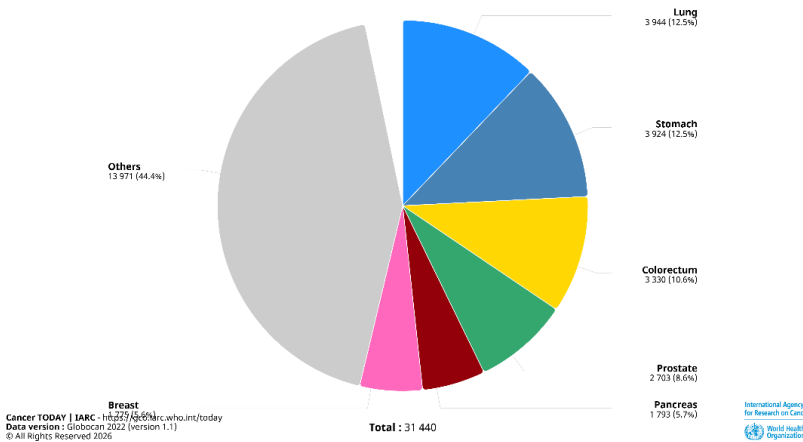


Figura 2. Incidencia y mortalidad por cáncer colorrectal en Chile (2022). A) Datos de incidencia publicados por GLOBOCAN 2022, que muestran la distribución de los distintos tipos de cáncer, donde el cáncer colorrectal (CCR) se posiciona como la segunda neoplasia con mayor número de casos a nivel nacional. B) Datos de mortalidad por cáncer publicados por GLOBOCAN 2022, que posicionan al CCR como la tercera causa de muerte por cáncer a nivel nacional. En ambos casos, los datos corresponden a ambos sexos y consideran todas las edades.

Para comprender los mecanismos celulares que subyacen al desarrollo del CCR, es necesario considerar primero la organización del epitelio intestinal normal. La mucosa normal del intestino grueso se organiza en criptas, denominadas criptas de Lieberkuhn, un epitelio de tipo cilíndrico simple, que aumentan la superficie de absorción. Estas están cubiertas por una monocapa de células epiteliales de diferentes tipos, cada una con una función específica: enterocitos, células caliciformes, células enteroendocrinas, células de Paneth, entre otras. Al fondo de la cripta se encuentran las células madre intestinales, responsables de la alta capacidad de autorrenovación del epitelio (Testa et al., 2018)

En el caso del cáncer colorrectal (CCR), este se desarrolla cuando las células epiteliales del colon o del recto adquieren alteraciones genéticas y epigenéticas que les confieren ventajas proliferativas y de supervivencia. Como consecuencia, se inicia la formación de un adenoma benigno que, tras la acumulación progresiva de nuevas alteraciones moleculares, puede evolucionar hacia un adenocarcinoma invasivo y, eventualmente, desarrollar capacidad metastásica, proceso conocido como secuencia adenoma-carcinoma (Figura 3). Esta evolución tumoral puede seguir distintas vías moleculares, como la inestabilidad microsatélite (MSI), la inestabilidad cromosómica (CIN) o la vía serrada (Hossain et al., 2022)

La vía de inestabilidad de microsatélites (MSI) está presente en aproximadamente el 15–20% de los casos de cáncer colorrectal (CCR) esporádico y en cerca del 95% de los casos asociados al síndrome de Lynch. Esta vía se caracteriza por la acumulación de mutaciones en secuencias repetitivas cortas de ADN, denominadas microsatélites, presentes en las células tumorales, pero ausentes en el ADN de la línea germinal. De acuerdo con el grado de inestabilidad observado, los tumores se clasifican como MSI alto (MSI-H) o MSI bajo (MSI-L), según el número de loci de microsatélites alterados. A nivel molecular, este fenómeno se produce como consecuencia de mutaciones o del silenciamiento epigenético de genes del sistema de reparación de errores de apareamiento del ADN (mismatch repair, MMR), lo que favorece la acumulación progresiva de mutaciones durante la replicación del ADN. La vía de inestabilidad cromosómica (Chromosomal Instability, CIN) es responsable de aproximadamente el 65–70% de los casos de cáncer colorrectal (CCR) esporádico. Se caracteriza por la ganancia o pérdida de grandes regiones de material genético, lo que genera alteraciones cromosómicas tanto estructurales como numéricas. Molecularmente, esta vía suele iniciarse con mutaciones de pérdida de función en el gen APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), lo que provoca una activación constitutiva de la vía de señalización Wnt/ β -catenina y favorece la proliferación celular. Posteriormente, es frecuente la aparición de mutaciones activadoras en el oncogén KRAS, que conducen a una activación persistente de la vía RAS/MAPK, promoviendo la proliferación y supervivencia celular. Finalmente, la acumulación de alteraciones genéticas incluye mutaciones de pérdida de función en el gen supresor tumoral TP53, lo que compromete el control del ciclo celular, favoreciendo la progresión hacia un carcinoma invasivo. La vía del fenotipo metilador de islas CpG (CpG Island Methylator Phenotype, CIMP), también conocida como vía serrada, se encuentra asociada principalmente a lesiones serradas precursoras del cáncer colorrectal. Esta vía se caracteriza por la acumulación de modificaciones epigenéticas, particularmente la hipermetilación de islas CpG ubicadas en las regiones promotoras de diversos genes. Como consecuencia, se produce el silenciamiento transcripcional de genes involucrados en procesos fundamentales como la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la reparación del ADN y la angiogénesis. La inactivación de estos genes favorece la transformación maligna y contribuye a la progresión tumoral. (Pierantoni et al., 2024)

En la secuencia clásica adenoma–carcinoma, los tumores avanzan desde lesiones benignas hacia lesiones malignas mediante la acumulación progresiva de mutaciones, los adenomas pueden evolucionar hacia un fenotipo maligno, siendo los adenocarcinomas responsables del 96 % de todos los CCR, se estima que el proceso de progresión desde un adenoma temprano hasta un CCR establecido puede durar no menos de diez años. La primera mutación “driver” suele ocurrir en el gen APC, otorgando a la célula una ventaja de

crecimiento y dando origen a un adenoma inicial. Luego, mutaciones adicionales en oncogenes como KRAS impulsan nuevas rondas de expansión clonal e hiperproliferación celular. Este proceso continúa con la adquisición de alteraciones en genes involucrados en la supervivencia, proliferación y evasión del control del ciclo celular, como PIK3CA, SMAD4 y TP53, lo que finalmente conduce a un tumor maligno con capacidad de invadir la membrana basal subyacente y diseminarse a ganglios linfáticos y órganos distantes, generando metástasis, proceso que requiere aproximadamente nueve años. (Hossain et al., 2022; Islam et al., 2023; Vogelstein et al., 2013)

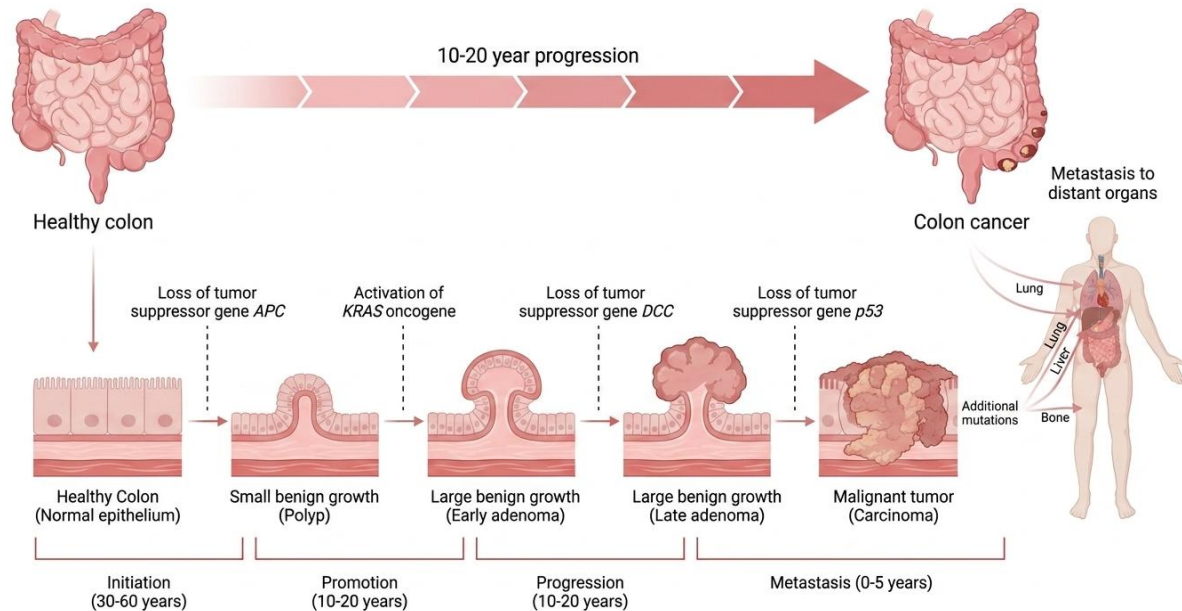


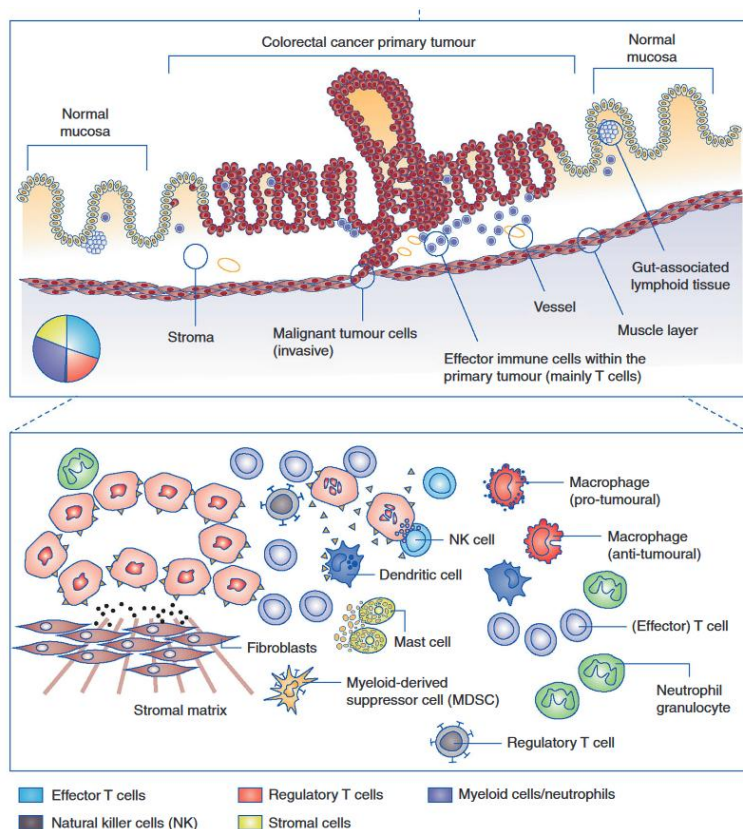
Figura 3. Etapas y desarrollo del cáncer colorrectal (CCR). Existen cuatro etapas en el proceso de carcinogénesis del CCR: iniciación, promoción, progresión y metástasis. El hígado es el sitio metastásico más común, seguido por el pulmón y el hueso. Aunque es difícil determinar la duración específica de cada etapa, es probable que se requieran décadas para que el CCR se desarrolle completamente. Figura reproducida de (Hossain et al., 2022). Edición gráfica asistida por inteligencia artificial.

III. Microambiente tumoral y macrófagos:

Desde el año 2000, Hanahan y Weinberg han estudiado y definido los hallmarks o características funcionales que comparten todos los tipos de cáncer, los cuales describen la habilidad de células cancerosas para formar tumores malignos. En la actualidad, se reconocen ocho hallmarks, clasificados en: (1) mantener la señalización proliferativa, (2) evadir los supresores de crecimiento, (3) resistir la muerte celular, (4) inducir la angiogénesis, (5) activar la invasión y metástasis, (6) habilidad de replicación ilimitada, (7) metabolismo celular y (8) evasión del sistema inmunitario.

Además de estas propiedades distintivas, se han definido características habilitadoras que facilitan su adquisición, al crear un entorno biológico favorable; entre ellas destacan la inestabilidad genómica y la inflamación promovida por el tumor. De esta manera, las neoplasias establecidas suelen presentar un microambiente inmunosupresor que deteriora la inmunidad antitumoral y favorece la progresión del cáncer (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000; Xiang et al., 2025). En este contexto, el microambiente tumoral (TME) surge como un componente clave para comprender la biología del cáncer. El TME es un sistema altamente complejo que se establece cuando el tumor progresa en un entorno dominado por interacciones inducidas por las propias células tumorales, en este ocurren interacciones dinámicas entre células malignas, componentes del estroma, y componente inmune. Está compuesto por una amplia variedad de elementos, incluyendo fibroblastos, células endoteliales, plaquetas, citoquinas, proteínas de matriz extracelular y células del sistema inmune tanto innato como adaptativo (Figura 4). En consecuencia, en este entorno dinámico

desempeña un rol crucial en la tumorigénesis, progresión tumoral, y metástasis, pudiendo ejercer funciones tanto protumorales como antitumorales. Actualmente, se reconoce que su influencia en la iniciación, progresión y metástasis del cáncer es tan determinante como las alteraciones genéticas y epigenéticas que afectan a las células malignas. (Hanahan, 2022; Huang et al., 2024; Kather & Halama, 2019; H. Wang et al., 2021; J. Xu et al., 2025; Yahaya et al., 2019) **Figura 4. Resumen de la composición del microambiente tumoral en lesiones primarias de CCR.** El grafico circular muestra un ejemplo de la composición de células inmunitarias dentro del microambiente local. Figura reproducida de (Kather & Halama, 2019)



Entre los diversos componentes del TME, los macrófagos asociados a tumores (TAMs) destacan por su abundancia y relevancia funcional. De hecho, los macrófagos pueden constituir hasta la mitad de la masa celular total del tumor, siendo de las células inmunes infiltrantes más abundantes en el TME del CCR. (Xiang et al., 2025) En tumores de etapas avanzadas los TAMs corresponden principalmente a fenotipos protumorales (M2) y cumplen un rol fundamental en la progresión tumoral al secretar citoquinas y quimiocinas que promueven el crecimiento, la invasión, la metástasis, la angiogénesis y la inmunosupresión (Yahaya et al., 2019)

Por consiguiente, las células tumorales utilizan a los TAMs para favorecer su propio crecimiento, mientras que los TAMs, dependiendo de su estado de polarización y distribución espacial, pueden actuar como una “espada de doble filo”, ejerciendo tanto funciones promotoras como supresoras del tumor. Además, interactúan con prácticamente todos los tipos de células inmunes —incluyendo linfocitos T, células NK y células dendríticas— modulando las respuestas efectoras a través de la secreción de citoquinas, la expresión de ligandos de puntos de control inmunitario y la competencia metabólica (H. Wang et al., 2021; J. Xu et al., 2025)

La relevancia de los TAMs en el cáncer colorrectal ha sido respaldada por evidencia reciente, tales como Kather et al. (2019) sostienen que al analizar la composición celular de tumores sólidos como el CCR, las células mieloides constituyen una proporción elevada del microambiente tumoral (Kather & Halama, 2019). Esto ha sido corroborado experimentalmente por Tang et al. (2024), quienes, utilizando análisis de single-cell RNA-seq para estudiar la heterogeneidad del microambiente tumoral en 60 pacientes con CCR, observaron que, en comparación con el tejido normal, los tejidos neoplásicos presentan un aumento en la población de células mieloides, destacando los macrófagos como una subpoblación con un incremento particularmente notorio (Tang et al., 2024) De forma consistente, Huang et al. (2024) demostraron mediante single-cell RNA-seq que los cambios más significativos en las poblaciones inmunes intratumorales se observan en macrófagos y monocitos, en comparación con otras células inmunes como linfocitos B, células NK y linfocitos T. (Huang et al., 2024) Estas variaciones se relacionan con características clínicas, lo que sugiere que estas células desempeñan un papel crucial en el TME y la progresión del CCR.

Ahora bien, considerando que los macrófagos son de las células no neoplásicas más abundantes dentro del TME resulta esencial comprender su origen y posteriores interacciones con las células neoplásicas y el resto de los componentes del TME. Existen dos fuentes principales de macrófagos intestinales: aquellos residentes y los derivados de monocitos. Los macrófagos residentes son derivados de precursores embrionarios, y se alojan en el intestino previo al nacimiento manteniendo su número durante el desarrollo y adultez. (Lu et al., 2021) Mientras que los macrófagos derivados de monocitos se originan de células madre hematopoyéticas en la médula ósea, ahí los monocitos maduran por un periodo de 24 horas para luego migrar al torrente sanguíneo, donde pueden ser reclutados hacia tejidos en respuesta a daño o inflamación, para diferenciarse a macrófagos. (Xia et al., 2023)

Sin embargo, más allá de su origen, la importancia de su función dentro del TME depende en gran medida de su estado de polarización, una característica fundamental de los macrófagos, es decir, la capacidad para modificar su fenotipo en respuesta a señales del entorno. Este fenómeno, permite que los macrófagos adopten diferentes perfiles funcionales según los estímulos presentes en el TME (Xia et al., 2023) Tradicionalmente los macrófagos han sido clasificados en dos extremos de polarización, M1 (proinflamatorios) y M2 (antiinflamatorios), sin embargo, con el desarrollo continuo de la tecnología y la profundización en la comprensión de los macrófagos, se ha demostrado que estos poseen un alto grado de plasticidad y heterogeneidad. Por lo tanto, resulta simplista clasificarlos únicamente como M1 y M2, siendo más bien un

espectro de fenotipos entre estos dos extremos (Tang et al., 2024; J. Xu et al., 2025). Además, es importante considerar que los TAM están expuestos a múltiples estímulos dentro del TME, lo que les permite adoptar fenotipos mixtos que no se clasifican estrictamente como M1 o M2. Su plasticidad, característica distintiva, hace que su fenotipo no sea estático ni definitivo, pudiendo repolarizarse bajo la influencia de determinados factores, y viceversa.(Väyrynen et al., 2021; Zhao et al., 2019)

Los TAMs constituyen un componente principal de las células inmunológicas presentes en el microambiente tumoral. Estos son reclutados a partir de monocitos circulantes, los cuales son atraídos al sitio tumoral por quimioquinas como CCL2, CCL5 y CSF-1. Una vez en el TME, y mediante su interacción con otros elementos del microambiente, los TAMs son capaces de promover el desarrollo tumoral, la invasión, la metástasis, la angiogénesis y la inmunosupresión. En el contexto del CCR, las células tumorales favorecen la diferenciación de los TAMs hacia fenotipos M2, caracterizados por un perfil antiinflamatorio y protumoral. Sin embargo, considerando que los tumores se inician en un microambiente inflamatorio, los TAMs presentan inicialmente un fenotipo M1 proinflamatorio. A medida que la patología progresa, estos macrófagos experimentan una transición hacia un fenotipo M2. (Huang et al., 2024; H. Wang et al., 2021)

En cuanto a sus estados de polarización, el interferón (IFN γ) y los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) inducen la polarización hacia macrófagos M1, los cuales liberan moléculas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral (TNF)- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, así como las quimioquinas C-X-C motif chemokine ligand 9 (CXCL9) y CXCL10, entre otras. Además, los macrófagos M1 expresan en su superficie CD40, CD80, CD86 y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II). Estos macrófagos tienen la capacidad de promover respuestas Th1, fagocitar y destruir células tumorales, así como favorecer la presentación antigénica mediante la secreción de citoquinas proinflamatorias, principalmente TNF- α e IL-12, contribuyendo así a la activación de la inmunidad antitumoral. Asimismo, los macrófagos M1 inhiben la supervivencia y la metástasis tumoral mediante tres mecanismos principales: (1) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, (2) fagocitosis celular dependiente de anticuerpos y (3) modulación indirecta de la respuesta inmunitaria a través de la liberación de mediadores proinflamatorios. (H. Wang et al., 2021; Xia et al., 2023; J. Xu et al., 2025)

Por otro lado, los macrófagos M2 son inducidos principalmente por IL-4 e IL-13, y secretan diversas moléculas antiinflamatorias y promotoras de la reparación tisular, como IL-10, transforming growth factor- β (TGF- β), IL-1 β , insulin-like growth factor-1 (IGF-1), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), entre otras. Este fenotipo se caracteriza por la expresión superficial de arginasa 1 (Arg1), CD163, CD204 y CD206, y desempeña funciones clave en la angiogénesis, la remodelación tisular y la reparación de tejidos. Típicamente, los macrófagos M2 se subdividen en cuatro subpoblaciones de acuerdo con los estímulos que los inducen: M2a (inducidos por IL-4 e IL-23), M2b (inducidos por complejos inmunes junto con IL-1 β o LPS), M2c (inducidos por IL-10, TGF- β y glucocorticoides) y M2d (inducidos por IL-6) (Fig5) (Wang et al., 2021). Además, estudios in vitro han demostrado que células de CCR aumentan la expresión de RGC-32 en macrófagos, lo que favorece su migración y, posteriormente, la proliferación de células tumorales. Los macrófagos M2 también secretan IL-19 y TGF- β , citoquinas que inhiben la citotoxicidad de los linfocitos T, y reclutan células T reguladoras (Treg) mediante la liberación de CCL5, CCL22 y CCL20, contribuyendo a establecer un microambiente inmunosupresor. Asimismo, promueven la resistencia a la apoptosis en las células tumorales a través de la secreción de IL-10 e IL-6.(H. Wang et al., 2021; Xiang et al., 2025; J. Xu et al., 2025)

Para que un tumor localizado pueda crecer es necesario que ocurra angiogénesis, TAMs favorecen este proceso al producir VEGD, IL-8, metaloproteinasas de matriz entre otros. Estudios realizados en muestras de tejido humano demuestran que el número de TAMs se correlaciona positivamente con la formación de vasos sanguíneos. (Komohara et al., 2014)

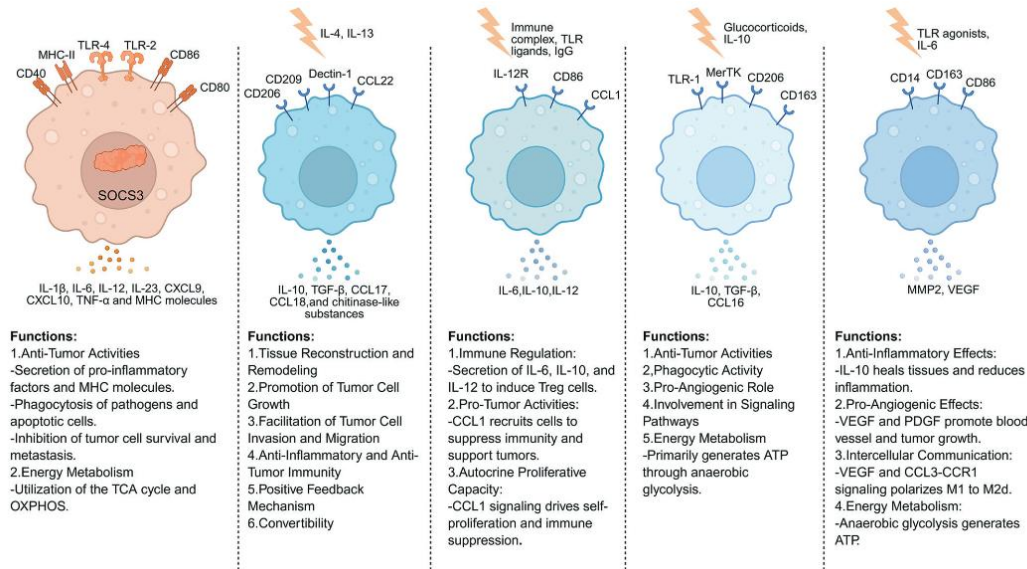


Figura 5. Estados de polarización de macrófagos y diversidad funcional en el microambiente tumoral. Los macrófagos M1, activados por ligandos de TLR, producen citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- α) y ejercen funciones antitumorales dependientes de OXPHOS. En contraste, los macrófagos M2, inducidos por IL-4 e IL-13, promueven la remodelación tisular, el crecimiento tumoral y respuestas antiinflamatorias. Macrófagos reguladores y macrófagos inducidos por glucocorticoides contribuyen a la inmunosupresión y a la angiogénesis. Los macrófagos asociados a tumores (TAMs) favorecen la angiogénesis y la evasión inmune mediante factores como VEGF y MMP2. Figura reproducida de (J. Xu et al., 2025)

En la mayoría de los tumores sólidos, una alta densidad de infiltración de macrófagos se ha asociado con un pronóstico significativamente desfavorable. (Zhao et al., 2019) Sin embargo, los efectos de los TAMs en la progresión del cáncer colorrectal en humanos siguen siendo controversiales e incluso contradictorios. Majid et al. 2024 demuestra que el rol pronóstico de los TAMs depende de la cantidad de linfocitos T CD8 $^{+}$ presentes en el TME, una de las razones es que los linfocitos producen altas cantidades de IFN- γ , citoquina que promueve la fagocitosis y presentación antigénica, destacando una vez más la importancia de las interacciones del TME. (Majid et al., 2024) Li et al, 2020 realizaron un metaanálisis de 27 estudios, que incluyó 6.115 pacientes con CCR, en el cual se reporta que una alta densidad de macrófagos asociados a tumor (TAMs) se asocia con una mejor supervivencia global a 5 años. Este efecto se observó de manera independiente del fenotipo M1 o M2, considerando únicamente la infiltración total de TAMs identificados por el marcador CD68 $^{+}$. (J. Li et al., 2020) De modo contrario Yang et al, 2020 realizaron un metaanálisis incluyendo 29 estudios, con 5575 pacientes, afirman que no existe correlación entre TAMs CD68 $^{+}$ y supervivencia global si se considera la infiltración en el centro del tumor (Yang et al., 2020)

En sumatoria, diversos estudios sugieren que el rol de los TAMs en el TME puede resultar contradictorio, (Pinto et al., 2019; Shin et al., 2021; H. Wang et al., 2021; Zhong et al., 2018) esto puede deberse a el uso del marcador CD68, clásico marcador de macrófagos, pero este puede expresarse en el estroma y no diferencia entre el fenotipo del macrófago, los resultados también varían dependiendo de la localización de los TAM, ya sea en el centro tumoral o en el margen, y finalmente, la identificación de los estados de polarización fenotípica y su diversidad es compleja. (H. Wang et al., 2021)

En conjunto, estas evidencias refuerzan la idea de que el impacto pronóstico de los macrófagos asociados a tumor no depende únicamente de su abundancia o localización, sino fundamentalmente de su estado funcional y de las interacciones dinámicas que establecen con otros componentes del microambiente tumoral (TME). Estos cambios funcionales están mediados por la activación diferencial de vías de transducción de señales, entre las que destacan STAT1 y STAT3, NF- κ B y PI3K/AKT, las cuales integran estímulos mediados por citoquinas, metabólicos e inflamatorios del entorno tumoral. En particular, la activación sostenida de STAT3 en macrófagos ha sido ampliamente asociada a la adquisición de un fenotipo inmunosupresor. De este modo, un mejor entendimiento de la activación selectiva de estas vías resulta fundamental para explicar la heterogeneidad funcional de los TAMs.

IV. Transductor de señales y activación de la transcripción 3 (STAT3)

Las vías de transducción de señales, incluyendo nuclear factor kappa B (NF- κ B), STAT3, STAT6, c-Myc y el factor regulador de interferón 4 (IRF4), participan activamente en la diferenciación de macrófagos hacia el fenotipo M2. Asimismo, NF- κ B y STAT3 se encuentran fuertemente involucrados en el crecimiento y supervivencia de células tumorales (Komohara et al., 2014)

De acuerdo con Gargalionis et al. (2021), los factores de transcripción (TF) son proteínas que integran complejas redes de transducción de señales tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, regulando la actividad transcripcional mediante su unión a regiones promotoras o *enhancer* del ADN de genes específicos.(Gargalionis et al., 2021) Su activación ocurre en respuesta a citoquinas, factores de crecimiento y otros ligandos peptídicos, y su función principal es inducir la transcripción de genes diana a través de la transmisión de señales desde la membrana celular hacia el núcleo (Xia et al., 2023) En el contexto del CCR, alteraciones genéticas y epigenéticas pueden conducir a la hiperactivación de estos factores de transcripción.

STAT3 (transductor de señales y activador de la transcripción 3) es un factor de transcripción citoplasmático perteneciente a la familia STAT, la cual está conformada por siete proteínas estructuralmente similares: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6 (Gargalionis et al., 2021) STAT3 está compuesto por entre 750 y 795 aminoácidos y presenta un peso molecular aproximado de 89 kDa. Su activación ocurre principalmente mediante fosforilación, un proceso estrictamente regulado y de corta duración en tejidos normales. Se ha documentado que el peak de fosforilación de STAT3 se produce entre 15 y 60 minutos posteriores a la estimulación por citoquinas u otros factores, disminuyendo posteriormente de manera progresiva (Xia et al., 2023). La funcionalidad y la localización subcelular de STAT3 están reguladas por modificaciones postraduccionales, tales como la fosforilación del residuo de tirosina 705 y de la serina 727, las cuales participan directamente en su activación. Asimismo, la acetilación de STAT3 en la

lisina 685 (Lys685) ha sido descrita como un mecanismo responsable de bloquear la dimerización de STAT3 (Mardones et al., 2023)

La vía JAK/STAT constituye una de las principales rutas de señalización para la activación de más de 70 citoquinas y desempeña un papel fundamental en numerosos procesos biológicos clave, tales como la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y la regulación de la respuesta inmune. En la vía de señalización JAK/STAT, las señales extracelulares, principalmente citoquinas y factores de crecimiento, inducen la dimerización de los receptores, lo que acerca entre sí a las quinasas JAK asociadas. Esta proximidad permite la activación de las JAK mediante fosforilación cruzada de residuos de tirosina. Posteriormente, las JAK activadas catalizan la fosforilación de residuos de tirosina en los receptores dimerizados, lo que facilita el reclutamiento de las proteínas STAT presentes en el citoplasma. Las STAT se unen a los receptores y son fosforiladas por las JAK activadas. Finalmente, las STAT fosforiladas se disocian de los receptores, forman dímeros en el citoplasma y translocan al núcleo, donde se unen a las regiones promotoras de los genes diana para activar su transcripción (Xia et al., 2023).

STAT3 se encuentra sobreactivado en la mayoría de los tumores malignos, y se asocia a un peor pronóstico. (Xia et al., 2023) El CCR no es la excepción, ya que STAT3 está altamente activado y corresponde al miembro de la familia STAT más estrechamente asociado con la iniciación y progresión de esta patología. Su rol en la tumorigénesis se vincula al aumento en la transcripción de genes que favorecen la proliferación celular, la resistencia a la apoptosis, la angiogénesis, la inflamación promovida por el tumor, así como la invasión y la metástasis, procesos atribuibles a una activación aberrante inducida por el exceso de citoquinas y factores de crecimiento presentes en el microambiente tumoral (Gargalionis et al., 2021)

En concordancia con esto, muchos de los genes regulados por STAT3 codifican citoquinas, factores de crecimiento y factores angiogénicos, tales como IL-6, IL-10 o VEGF, los cuales a su vez activan la señalización mediada por STAT3, promoviendo la generación de un circuito de retroalimentación positiva (*feed-forward loop*) entre las células tumorales y las células inmunes dentro del microambiente tumoral (Y. Wang et al., 2018)

Diversos estudios han demostrado que la activación de la vía JAK/STAT3 favorece la polarización de los macrófagos asociados a tumor (TAMs) hacia el fenotipo M2. Mediante un ensayo *in vivo*, Komohara et al. demostraron que la inhibición de STAT3 mediante ácido oleanólico impide dicha polarización y estimula la producción de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-12. Este tratamiento mostró efectos tanto a nivel de los TAMs como de las células tumorales, sugiriendo que la inhibición de STAT3 contribuye a la supresión del crecimiento tumoral en gliomas (Komohara, 2011). De manera similar, en el contexto del CCR, se ha reportado que el uso de fármacos capaces de reducir los niveles de fosforilación de STAT3 mediante el bloqueo de la vía JAK/STAT3 disminuye su translocación nuclear y, consecuentemente, reduce la polarización M2 de los TAMs. (Zhang et al., 2021)

En conjunto, estos antecedentes indican que la activación de la vía JAK/STAT3 no solo ocurre en células tumorales, sino también en los macrófagos asociados a tumor, afectando indirectamente el desarrollo de la neoplasia mediante la generación de un microambiente protumoral dominado por macrófagos con fenotipo M2 (Xia et al., 2023) Esto permite plantear que la inhibición dirigida de esta vía podría reducir o revertir la polarización M2 de los macrófagos, con el objetivo de enlentecer la progresión tumoral y potenciar la respuesta inmune antitumoral.

Este factor de transcripción está implicado en la respuesta antiinflamatoria, se ha observado que la activación de STAT3 por estímulo de IL-10 conduce a disminución en la expresión de genes que codifican citoquinas proinflamatorias como TNF- α , I- β , IL-12 e IFN- γ . Sin embargo, la activación de STAT3 no siempre se asocia a respuestas antiinflamatorias, esto depende del estímulo, pues se ha visto que la activación de STAT3 por IL-6 o INF- β promueve respuestas inflamatorias en macrófagos. (Tugal et al., 2013).

En conjunto, estos antecedentes indican que el papel de STAT3 en la activación y polarización de los macrófagos es complejo y depende del contexto biológico y de los estímulos presentes en el microambiente.

V. Epigenética y HDAC6:

“Epigenética” es definido como modificaciones en la expresión génica, estas son hereditarias y reversibles, no implican cambios de la secuencia de ADN, tienen un rol fundamental en la patogénesis de varios tipos de cáncer, incluyendo el CCR. (Jung et al., 2020). Se manifiestan principalmente como metilación/demetilación del ADN, modificaciones postraduccionales de histonas como acetilación, u otras como micro-ARN, small-non-coding ARN. (Chen et al., 2023; El-Sayed et al., 2021)

La acetilación y desacetilación de histonas se encuentran entre los mecanismos clave de regulación transcripcional. Es catalizada por enzimas histonas acetiltransferasas (HAT) o histonas desacetiltransferasas (HDAC) respectivamente. Inicialmente las histonas desacetilasas (HDAC) fueron descritas como enzimas que remueven grupos acetilos de histonas, sin embargo, se ha observado que actúan sobre un espectro más amplio de sustratos, y se ven envueltas en varios procesos celulares más allá de regulación de cromatina (Knox et al., 2019)

La histona desacetilasa 6 (HDAC6) es una proteína de 1215 aminoácidos perteneciente a las HDAC de clase II (proteasas dependientes de Zn^{2+}) (Li et al., 2018). HDAC6 se diferencia de otras proteínas HDAC en que se localiza principalmente en el citoplasma con la capacidad de desacetilar varias proteínas no histonas, se ha demostrado que HDAC6 regula las funciones proinflamatorias y antiinflamatorias en macrófagos (Gracia-Hernandez et al., 2024)

HDAC6 tiene múltiples blancos citoplasmáticos para desacetilación, entre ellos se han identificado: α -tubulina, cortactina, proteína de choque térmico (Hsp) 90, factor de transcripción de choque térmico-1 (HSF-1), Ku70, p53, peroxirredoxinas, transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) 3, proteína de caja de horquilla O1 (FOXO1) y β -catenina. (Vuletić et al., 2023)

Cheng et al., (2014) afirma que en células presentadoras de antígenos (APC), HDAC6 se une a STAT3, el complejo luego transloca al núcleo y se une a la región promotora del gen que codifica para IL-10, promoviendo la expresión de esta citoquina antiinflamatoria e inmunosupresora. En el caso contrario, la disminución de la expresión de HDAC6 resulta en menor fosforilación de STAT3, y menor expresión de IL-10. (Cheng, Lienlaf, Pérez-Villarroel, et al., 2014)

Se han utilizado inhibidores de HDAC (HDACi) no selectivos, los cuales han demostrado tener actividad antitumoral, sobre todo en cánceres hematológicos, pero en tumores sólidos sus resultados son poco consistentes, pues, el hecho de ser no selectiva implica que su blanco puede ser cualquiera de las 18 isoformas de HDACs, lo cual se traduce en efectos mixtos. Es por lo que el uso de inhibidores selectivos son una estrategia terapéutica prometedora. (Knox et al., 2019)

En este contexto, se ha estudiado el efecto del inhibidor selectivo (NextA) de HDAC6 en combinación con anti-PD-L1, este estudio se realizó en melanoma de modelos de ratón ex vivo. Se observó que cuando solo se utiliza anti-PD-L1, la cantidad de macrófagos M2 se eleva, disminuyendo al ser tratado en conjunto con NextA, además, informa que la razón M1:M2 era la más alta cuando se realizaba tratamiento anti-PD-L1 y NextA en conjunto, y el tejido presentaba mayor concentración de citoquinas proinflamatorias que antiinflamatorias. Además, para estudiar si HDAC6i es capaz de modificar el fenotipo de macrófagos en el TME se observó el efecto tras tratamiento con NextA, donde la razón M1:M2 aumentó. Para corroborar este efecto se utilizaron macrófagos aislados del ratón, y se indujo fenotipo M2 mediante el uso de citoquinas IL-4 y IL-13, este proceso se vio afectado negativamente en presencia de NextA, mientras que la polarización M1 inducida por LPS o INF- γ se vio favorecida en presencia de NextA, lo que sugiere que la inhibición de HDAC6 promueve un fenotipo antitumoral e impide la expresión de un fenotipo protumoral. (Knox et al., 2019)

Respecto al CCR, Mardones et al., (2023) estudiaron el rol de la vía inmunomoduladora HDAC6-STAT3 en células de CCR, donde HDAC6 es necesaria para la activación de STAT3. El estudio se basó en la inhibición farmacológica de HDAC6, mediante la utilización de un inhibidor selectivo (NextA), lo cual conlleva a una menor activación de STAT3, reflejado en un menor índice de fosforilación y una mayor acetilación, y, por ende, afectando la expresión de sus genes blanco. En este estudio se logró observar que luego de utilizar NextA los niveles de expresión de PD-L1 disminuyeron, potenciando la actividad antitumoral (Mardones et al., 2023).

Teniendo en consideración la información presentada, proponemos la utilización de un inhibidor selectivo para HDAC6 con el fin de disminuir la activación del factor de transcripción STAT3, por lo tanto, evitaría la transcripción de genes blanco. En el caso del CCR, considerando la abundante población de macrófagos asociados a tumores presentes en el microambiente tumoral, proponemos a estas células como target. Con el objetivo de evitar la polarización de macrófagos hacia el extremo M2, de esta manera es posible generar un ambiente antitumoral y proinflamatorio, que en conjunto evitan la progresión tumoral.

VI. Hipótesis:

“La inhibición de HDAC6 suprime la polarización de los macrófagos del fenotipo M2 al disminuir la activación del factor de transcripción STAT3 en macrófagos asociados a CCR”

VII. Objetivo general:

Evaluar cómo el bloqueo del eje HDAC6/STAT3 mediante el uso de un inhibidor selectivo de HDAC6 modula la polarización de los macrófagos en el CCR.

VIII. Objetivos específicos:

1. Evaluar como la inhibición de HDAC6 modula la activación de STAT3 afectando la polarización de macrófagos (M1 y M2).

Para evaluar los cambios de polarización de macrófagos frente al tratamiento con inhibidor de HDAC6 y tratamiento con sus respectivas citoquinas se realizó inmunocitoquímica, con marcadores específicos para cada estado de polarización, para M1 CD86 y para M2 CD163.

2. Evaluar el efecto de la inhibición de HDAC6 sobre la expresión de genes representativos de los fenotipos M1 y M2, como indicador de cambios en la polarización de macrófagos.

Se realizó mediante RT-qPCR, donde previamente los macrófagos fueron tratados con el inhibidor de HDAC6 y luego polarizados hacia el fenotipo M1 y M2, se comparó los cambios de expresión génica para cada estado de polarización.

Para M1: CD80, CD86, IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL6

Para M2: Arg1, CD206, CD209, TGF- β .

3. Evaluar cambios de expresión génica y funcionales en células de CCR asociadas a macrófagos polarizados (M1 y M2) con y sin tratamiento de inhibición de HDAC6.

Se realizó co-cultivo de macrófagos polarizados y células de cáncer colorrectal de la línea HCT-116 para evaluar fagocitosis. Además, se realizó cultivo de las células HCT-116 con medio condicionado obtenido de macrófagos para evaluar expresión génica.

IX. Materiales y métodos:

Cultivo y líneas celulares:

Se trabajó con las líneas celulares HCT-116, derivada de un carcinoma colorrectal humano, y THP-1, proveniente de monocitos humanos de una leucemia mieloide monocítica aguda.

Las células HCT-116 se cultivaron en placas utilizando Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 4 mM de L-glutamina, 1,5 mg/mL de bicarbonato de sodio, 4,5 mg/mL de glucosa, y 50 U/mL de penicilina-estreptomicina para prevenir la contaminación bacteriana.

Las células THP-1 se cultivaron en frascos de cultivo con Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640), suplementado con 10% de FBS, 4 mM de L-glutamina, 1,5 mg/mL de bicarbonato de sodio, 4,5 mg/mL de glucosa, y 50 U/mL de penicilina-estreptomicina.

Todas las líneas celulares se mantuvieron en incubadora a 37 °C, bajo una atmósfera controlada de 5% de CO₂.

Diferenciación de monocitos:

El protocolo de diferenciación de macrófagos fue adaptado de Tedesco et al., (2018) en el cual las células THP-1 se sometieron a tratamiento de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) a una concentración final de 80 ng/mL. Las células se sembraron a una densidad inicial de 5×10^5 células/mL, con el fin de asegurar una confluencia adecuada para la diferenciación.

El tratamiento con PMA se mantuvo durante 16 horas, tras lo cual el medio fue reemplazado por medio fresco, permitiendo un período de reposo de 24 horas adicionales antes de iniciar los tratamientos o experimentos posteriores. (Tedesco et al., 2018)

Inhibidores enzimáticos:

Se empleó el inhibidor selectivo de HDAC6, Nexturastat A (NextA). Los compuestos fueron inicialmente donados por el Dr. Alejandro Villagra (Georgetown University, EE. UU.) y posteriormente adquiridos en MedChemExpress (EE. UU.) o Santa Cruz Biotechnology (EE. UU.). Las células se trataron con una concentración final de 5 μ M de NextA durante 4 horas, tiempo determinado para evaluar los efectos del inhibidor sobre las células experimentales.

Polarización de macrófagos:

Los macrófagos derivados de THP-1 se polarizaron hacia fenotipos M1 o M2.

- Para la polarización M1, las células se estimularon con lipopolisacárido (LPS, 50 ng/mL) e interferón gamma (IFN- γ , 50 ng/mL).
- Para la polarización M2, el medio se suplementó con interleucina-4 (IL-4, 20 ng/mL) e interleucina-13 (IL-13, 20 ng/mL).

La polarización se mantuvo durante 24 horas para M1 y 48 horas para M2, tras lo cual las células se utilizaron para los experimentos correspondientes.

Las condiciones de polarización se obtuvieron de una versión modificada de Kovalovsky et al., (2024). (Kovalovsky et al., 2024)

Obtención de extractos totales de proteína:

Una vez completados los tratamientos celulares, las células se lavaron dos veces con PBS 1 $\times$ y se recolectaron mediante tripsinización. Se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos, y el sobrenadante se descartó.

El pellet se resuspendió en buffer de lisis RIPA (suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa), ajustando el volumen de acuerdo con la cantidad de células. Los lisados se incubaron en agitación constante durante 15 minutos a 4 °C.

Posteriormente se realizó sonicación, 10 ciclos de 30 segundos de frecuencia alta y posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se separó el sobrenadante del pellet celular y se almacenó a -80°C.

El contenido proteico del sobrenadante se determinó mediante el método de Bradford, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Electroforesis de proteínas y Western blot:

Las muestras proteicas se desnaturalizaron en un buffer de carga compuesto por 50 mM Trizma·Cl (pH 6,8), 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol y 10% glicerol, mediante calentamiento a 95 °C durante 3 minutos.

Posteriormente, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida (29:1) con SDS al 0,1%, al 8% para la separación de proteínas de alto peso molecular (>200 kDa) y al 12% para proteínas de bajo peso molecular (<200 kDa).

La electroforesis se realizó en condiciones de corriente constante de 700 mA por gel, utilizando un buffer de corrida compuesto por 25 mM Trizma·Cl, 250 mM glicina y 0,1% SDS, en una minicámara Mini-PROTEAN 3 System (Bio-Rad).

Al finalizar la corrida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad) empleando un buffer de transferencia con 39 mM glicina, 48 mM Trizma, 0,037% SDS y 20% metanol, a 30 V de corriente constante durante 16–18 h.

La eficiencia de transferencia se verificó mediante tinción con Ponceau S (0,1% en ácido acético al 5%). Luego, la membrana se lavó con agua destilada y se bloqueó con TBS-Tween 0,1% suplementado con 2,5–5% de leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios específicos en TBS-Tween 0,1%, ya sea durante 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C, según el anticuerpo. Luego, se realizaron tres lavados de 5 minutos con TBS-Tween 0,1%, seguidos de la incubación con el anticuerpo secundario conjugado durante 1 hora en agitación.

La detección se efectuó mediante reactivos de quimioluminiscencia, y la señal fue visualizada en un sistema de fotodocumentación para quimioluminiscencia (OmegaLum, Aplegen).

Para este procedimiento se emplearon los siguientes anticuerpos: anti-HDAC6, anti-STAT3 total, anti-STAT3 fosforilado, anti- α -tubulina total, anti- α -tubulina acetilada y anti- β -actina como control de carga. Las diluciones utilizadas fueron las siguientes: HDAC6 (1:100, M), STAT3 (1:500, M), p-STAT3 (1:500, M), α -tubulina (1:1.000, M), acetil- α -tubulina (1:1.000, R) y β -actina (1:10.000, M). (M=mouse; R=rabbit)

Inmunocitoquímica directa:

Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron tres veces con PBS 1×.

Luego, se realizó la permeabilización y bloqueo mediante incubación en una solución de BSA al 4% y Triton X-100 al 0,5% en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios específicos en una cámara húmeda, toda la noche a 4 °C, protegidas de la luz.

Al día siguiente, las muestras se lavaron tres veces con PBS 1× y se incubaron con el marcador nuclear DAPI (1:1000) durante 5 minutos, seguido nuevamente de tres lavados con PBS 1×.

Finalmente, las preparaciones se montaron con resina DAKO y se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E600.

La inmunofluorescencia se realizó utilizando anticuerpos primarios conjugados a fluoróforos, dirigidos contra CD86, marcador característico de macrófagos M1, y CD163, marcador representativo de macrófagos M2, en una dilución 1:50.

Citometría de flujo:

La expresión de marcadores asociados a macrófagos fue evaluada mediante citometría de flujo. Para la tinción intracelular se utilizó el Conjunto de tampones de tinción de factor de transcripción/Foxp3 eBioscience™ (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las células fueron incubadas con anticuerpos monoclonales conjugados a fluoróforos específicos para la detección de los marcadores de interés: CD11b-Brilliant Violet 421, CD86-PE/Cyanine7 y CD163-PE (BioLegend). Se utilizó un volumen de 0,7 µL de cada anticuerpo, preparados a partir de soluciones stock con una concentración de 0,2 mg/Ml. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a un proceso de fijación y permeabilización mediante los tampones incluidos en el kit mencionado.

Tras la tinción intracelular, las células fueron mantenidas a 4 °C en oscuridad hasta el momento de la adquisición. El análisis se realizó recolectando al menos 10.000 eventos por muestra mediante citometría de flujo.

Aislamiento de ARN y RT-qPCR

La extracción de ARN mensajero (ARNm) se realizó mediante el método TRIzol–cloroformo–isopropanol, siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN obtenido se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific), evaluando tanto la concentración como la pureza mediante la relación A260/A280.

A partir de cada muestra, se utilizó 1 µg de ARN total para la síntesis de ADN complementario (cDNA), empleando la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Promega) según las instrucciones del proveedor.

La amplificación por PCR en tiempo real (qPCR) se realizó utilizando SYBR Green como agente intercalante de doble hebra, bajo condiciones previamente optimizadas para cada par de oligonucleótidos. Los ensayos se efectuaron en un termociclador en tiempo real, siguiendo las recomendaciones del fabricante para el programa de amplificación y análisis de curvas de disociación (melt curve).

Se evaluó la expresión génica asociada a los fenotipos M1 y M2 de macrófagos:

M1: CD86, CD80, IL12, TNF-α, IFN-γ, IL6.

M2: ARG1, CD206, TGF-β, IL10, y CD209.

Además, se analizó la expresión génica en líneas celulares de carcinoma colorrectal (CCR), HCT-116, considerando los siguientes genes de interés: TRIP6, TYMS, MLST8, IFITM2, y MAPK12 (Mardones et al., 2023).

Co-cultivo CCR y macrófagos:

I. Medio condicionado: Se realizó el tratamiento de polarización previamente descrito durante 24 horas, posteriormente, fueron tratadas Nexturastat A por un periodo de 4 horas, tras lo cual se realizó un cambio de medio y se cultivaron los macrófagos durante 4 horas extra con medio fresco, se recolectó el medio condicionado (CM, conditioned medium). Posteriormente, las células HCT-116 se cultivaron en presencia de este medio condicionado durante 24 horas adicionales. Finalizado este período de exposición, las células se lisaron y se procedió a la extracción de ARN total, seguida de la síntesis de cDNA y el análisis de expresión génica mediante RT-qPCR, utilizando los genes previamente descritos: TRIP6, TYMS, LRRC41, MLST8, IFITM2, PSMB5, KEAP1, SEC61A1 y MAPK12 (Mardones et al., 2023).

II. Ensayo de fagocitosis:

La tinción celular se realizó utilizando el colorante fluorescente CellTrace™ CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester, Invitrogen).

A un vial del reactivo liofilizado se le adicionaron 18 μ L de DMSO para su disolución, obteniéndose una solución stock. Esta se diluyó posteriormente en 20 mL de PBS (pH 7,4), previamente templado a 37 °C, para obtener una solución de tinción a una concentración de 5 μ M.

Las células HCT-116 se recolectaron y transfirieron a un tubo Falcon de 50 mL conteniendo 10 mL de medio de cultivo. Las muestras se centrifugaron a 300 g durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 10 mL de la solución de tinción CFSE.

Las células se incubaron durante 20 minutos a 37 °C en baño termostático, protegidas de la luz. Finalizada la tinción, se lavaron con PBS 1X y se cultivaron en placas de 10 mm de diámetro, en presencia de macrófagos polarizados M1 y M2 durante 24 horas.

Posteriormente, las células se recolectaron y se tiñeron con anticuerpo Brilliant Violet 785 anti-CD11b (BioLegend) para la identificación de macrófagos. La fagocitosis se evaluó mediante citometría de flujo (según el protocolo descrito anteriormente), determinándose como el porcentaje de células CFSE⁺CD11b⁺ respecto al total de células CD11b⁺, correspondiente a macrófagos que internalizaron células de carcinoma colorrectal (CCR).

Análisis estadístico:

Todos los ensayos corresponden al promedio de tres experimentos biológicos independientes, realizados en duplicado o triplicado técnico. Para cada experimento se calculó la desviación estándar, la cual se presenta en las figuras correspondientes. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism. La normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba de Shapiro–Wilk. Para la comparación entre dos grupos se empleó la prueba t de Student no pareada y, cuando los datos presentaron varianzas desiguales, se aplicó la corrección de Welch. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$, representado como * ($p < 0,05$), ** (* $p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$).

X. Resultados

Estandarización:

Se realizó cultivo celular seguido de lisis para la obtención del lisado proteico total. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis mediante Western blot con el objetivo de estandarizar las condiciones experimentales para futuros ensayos, evaluando la concentración mínima óptima de proteínas totales por carril necesaria para detectar adecuadamente la expresión de las proteínas de interés.

Para este propósito, se analizaron concentraciones crecientes de proteína total, desde 10 µg hasta 80 µg por carril. Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios: HDAC6 (1:100, M), STAT3 (1:500, M), p-STAT3 (1:500, M), α -tubulina (1:1.000, M), acetyl- α -tubulina (1:1.000, R) y β -actina (1:10.000, M).

Estandarización western blot:

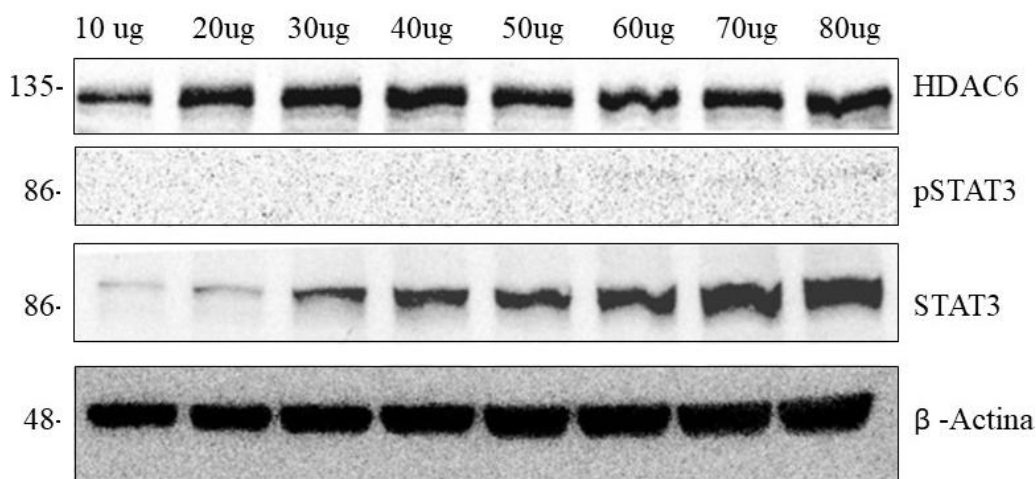


Figura 6. Estandarización de Western blot mediante el uso de concentraciones crecientes de proteína total (10–80 µg por carril) para la detección de proteínas de interés. Se evaluaron cantidades crecientes de proteína (de 10µg a 80 µg, y concentración óptima de Ac 1°HDAC6 1:100, STAT3 1:500, pSTAT3 1:500, 1:1000, B-Actina 1:10.000

Con el objetivo de verificar la activación de la vía de señalización de STAT3 mediante fosforilación, se realizó una estimulación celular con IL-6 e IFN- γ durante 24 horas. Posteriormente, se obtuvieron lisados proteicos totales y se analizó la expresión de STAT3 total y STAT3 fosforilado (p-STAT3) mediante Western blot, utilizando una carga de 30 μ g de proteína por carril, previamente definida como óptima. Este análisis permitió evaluar el efecto de la estimulación con IL-6 e IFN- γ sobre la activación de la vía STAT3 a nivel proteico.

Medición de expresión proteica post estimulación:

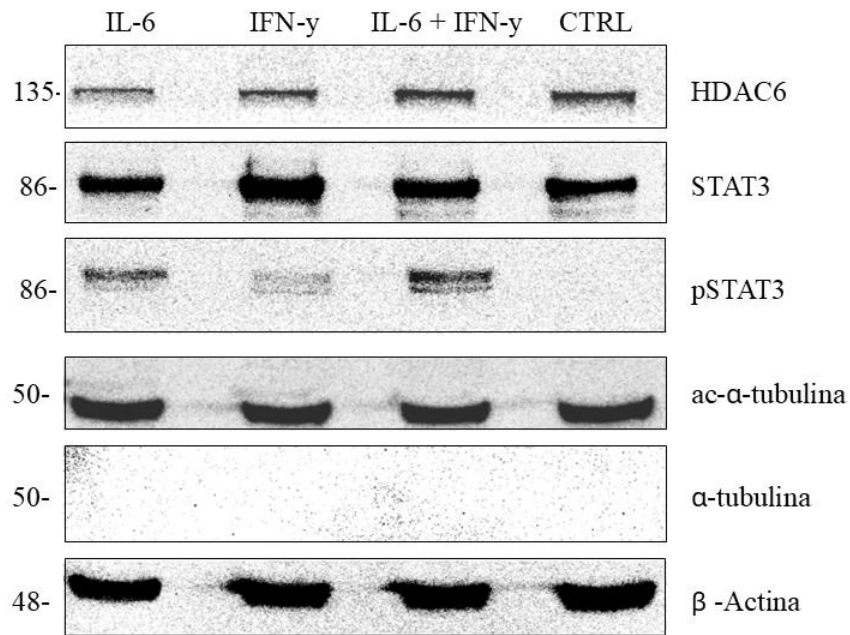


Figura 7. Activación de STAT3 por fosforilación tras estimulación con IL-6 (30 ng/ml), IFN- γ (100ng/ml) durante 24 horas evaluada por Western blot utilizando 30 μ g de proteína total por carril.

Las células fueron tratadas con el inhibidor selectivo de HDAC6 Nexturastat A a una concentración de 5 μ M durante 2 y 4 horas, con el objetivo de evaluar su efecto inhibitor sobre la actividad de HDAC6. Dado que la α -tubulina acetilada es un blanco reconocido de HDAC6 según la literatura, el efecto del tratamiento fue evaluado mediante el análisis de los niveles de acetil- α -tubulina por Western blot. Los resultados evidenciaron un aumento de la acetilación de α -tubulina dependiente del tiempo de tratamiento, observándose un efecto más marcado a las 4 horas, condición que fue seleccionada para los experimentos posteriores.

Medición de expresión proteica post tratamiento con NextA:

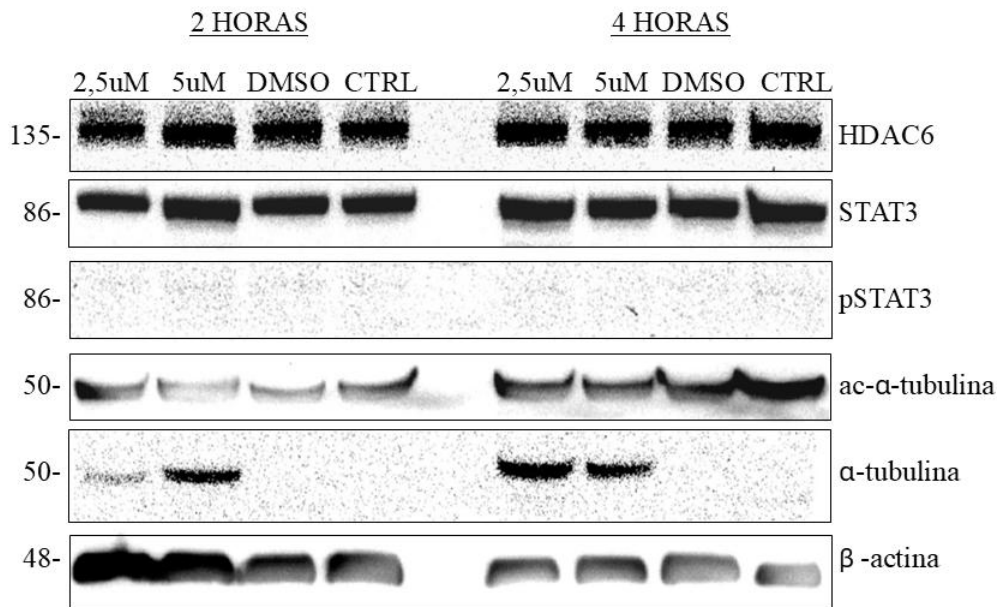


Figura 8. Efecto de la inhibición de HDAC6 mediante Nexturastat A sobre la acetilación de α -tubulina y la activación de STAT3. Las células fueron tratadas con Nexturastat A (5 μ M) durante 2 y 4 h. Posteriormente, se extrajeron proteínas totales y se analizaron 13 μ g de proteína por carril mediante western blot. Se evaluaron los niveles de HDAC6, STAT3, pSTAT3, α -tubulina acetilada (Ac- α -tubulina), α -tubulina total y β -actina como control de carga. La inhibición de HDAC6 fue determinada mediante el aumento de los niveles de α -tubulina acetilada

Con el objetivo de evaluar el efecto de la inhibición de HDAC6 sobre la activación de la vía STAT3 inducida por IL-6, células THP-1 diferenciadas fueron estimuladas con IL-6 (30 ng/mL) y tratadas con Nexturastat A (5 μ M). La activación de STAT3 fue analizada mediante western blot utilizando 15 μ g de proteína total por carril, observándose un aumento en los niveles de STAT3 fosforilado tras la estimulación con IL-6, mientras que el tratamiento con Nexturastat A redujo su fosforilación en comparación con la condición estimulada únicamente con IL-6 (Figura 9). De manera consistente, se evidenció un aumento en los niveles de α -tubulina acetilada, utilizada como marcador de la inhibición funcional de HDAC6. El análisis densitométrico, normalizado respecto a β -actina, confirmó el efecto modulador de Nexturastat A sobre la activación de la vía STAT3 inducida por IL-6.

Activación de la vía STAT3 tras estimulación con IL-6 y efecto de la inhibición de HDAC6:

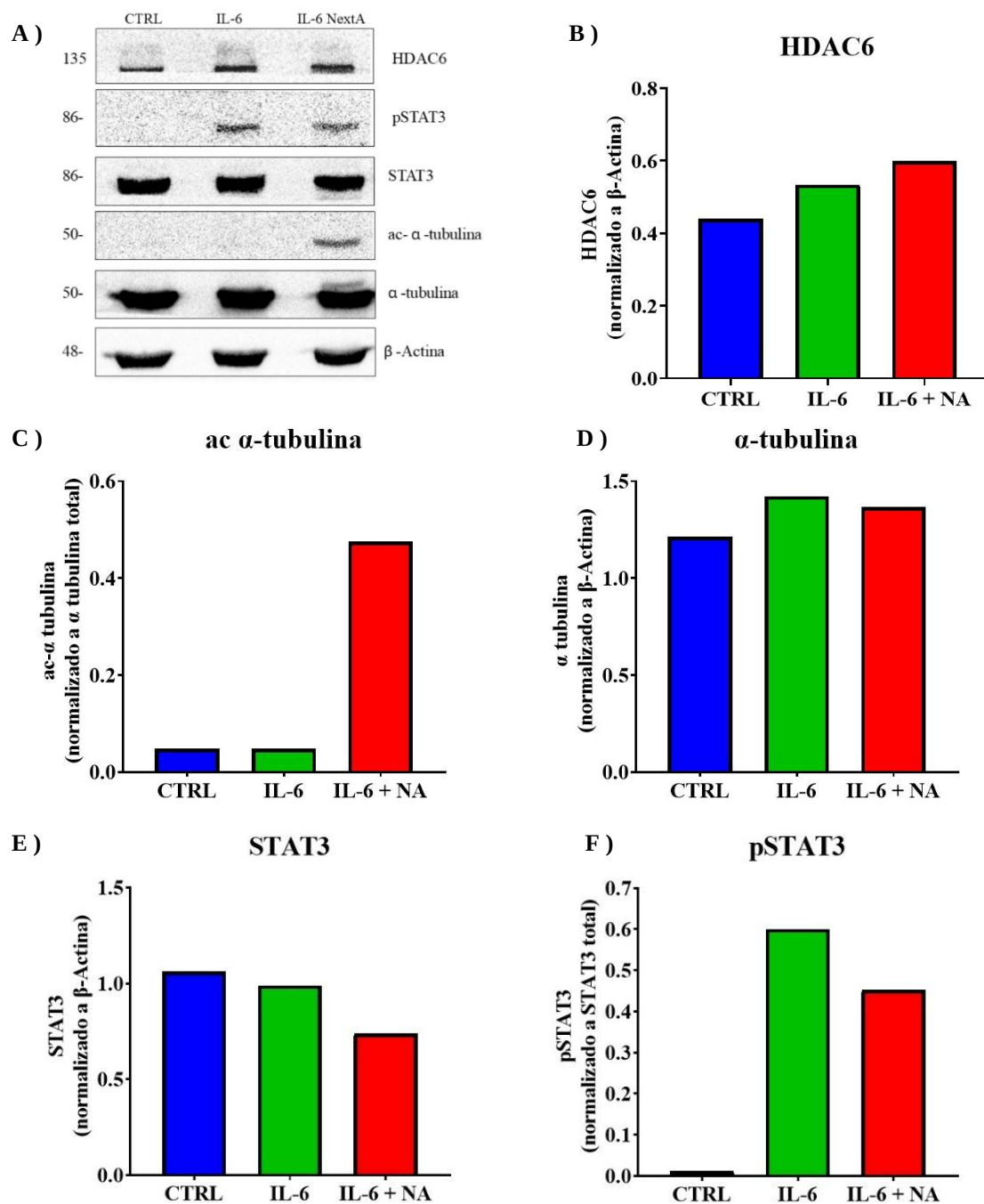


Figura 9. Efecto de IL-6 y Nexturastat A sobre la expresión proteica en monocitos. Efecto combinado de IL-6 y Nexturastat A sobre la expresión proteica en monocitos. Las células fueron tratadas con IL-6 (30 ng/mL) y/o Next A (5 μ M) durante 1 h. Se incluyeron grupos control sin tratamiento (CTRL), IL-6 solo y con tratamiento IL-6 + Next A. Los niveles proteicos fueron evaluados mediante western blot y analizados densitométricamente.

Para la diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos, las células fueron tratadas con phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) a una concentración de 80 ng/mL, de acuerdo con lo reportado en la literatura. El tratamiento se realizó durante 18 horas, tras lo cual se efectuó un cambio de medio y las células se mantuvieron en cultivo hasta las 48 horas. En este periodo, las células adquirieron adherencia a la placa y presentaron cambios morfológicos característicos de la diferenciación a macrófagos, pasando de una morfología redondeada, típica de las células THP-1, a una forma alargada.

Polarización de macrófagos:

THP-1 tratamiento PMA 80 ng/mL (18hrs)

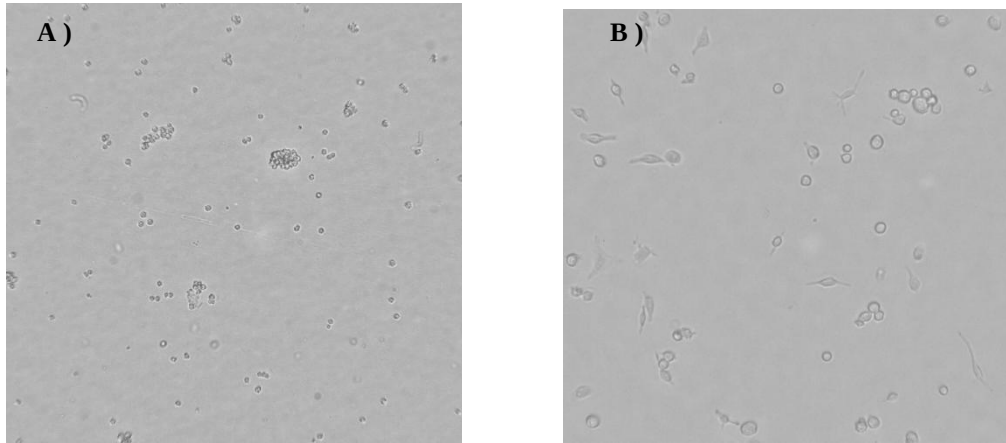


Figura 10. Diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos tras estimulación con PMA. Las células THP-1 fueron incubadas con PMA (80 ng/mL) para inducir diferenciación macrofágica. Posteriormente, se observaron cambios morfológicos característicos, incluyendo aumento de adherencia celular, expansión citoplasmática y pérdida del patrón de crecimiento en suspensión. Las imágenes representativas fueron adquiridas utilizando el sistema CytoSMART.

Con el objetivo de evaluar cómo la inhibición de HDAC6 modula la activación de STAT3, y cómo este efecto impacta en la diferenciación y polarización de macrófagos, se realizó inmunofluorescencia utilizando marcadores asociados a macrófagos M1 (CD86) y M2 (CD163). La técnica fue estandarizada de la siguiente manera:

Inmunofluorescencia macrófagos polarizados

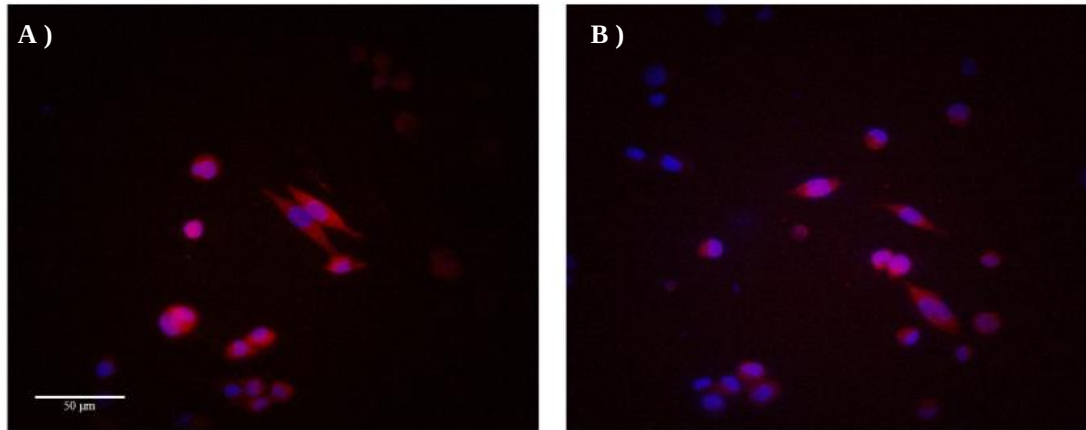


Figura 11. Polarización de macrófagos hacia fenotipo M1. Las células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos mediante tratamiento con PMA (80 ng/mL) durante 48 h y posteriormente estimuladas con LPS e IFN- γ para inducir polarización hacia un fenotipo M1. La polarización celular fue evaluada mediante inmunofluorescencia utilizando el marcador CD86 conjugado a PE/Cy7 (1:50). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las imágenes corresponden a la estandarización experimental de las condiciones de polarización M1.

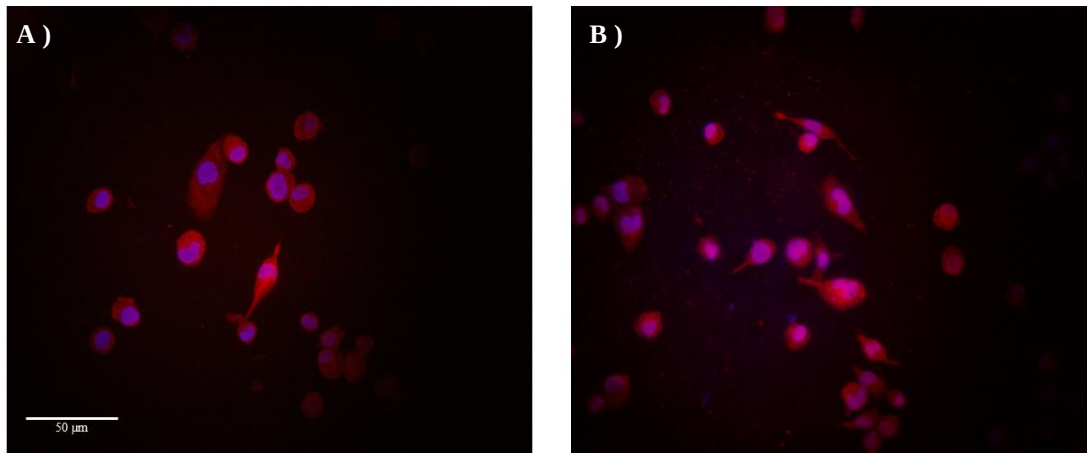


Figura 12. Polarización de macrófagos hacia fenotipo M2. Las células THP-1 fueron diferenciadas a macrófagos mediante tratamiento con PMA (80 ng/mL) durante 48 h y posteriormente estimuladas con IL-4 e IL-13 para inducir polarización hacia un fenotipo M2. La polarización celular fue evaluada mediante inmunofluorescencia utilizando el marcador CD163 conjugado a PE (1:50). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las imágenes corresponden a la estandarización experimental de las condiciones de polarización M2.

Curva estándar y eficiencia de partidores

La eficiencia de los partidores fue evaluada mediante diluciones seriadas para generar curvas estándar. El gen de referencia (18S) fue incluido para normalizar los niveles de expresión. Se consideraron aceptables eficiencias de partidores entre 90% y 110%. Las curvas estándar fueron realizadas en un sistema QuantStudio3 Real-Time PCR de Thermo Fisher Scientific.

Gen	Eficiencia
18S	102,3%
CD86	122,2%
CD80	110,8%
IL-12	91,1%
TNF-a	121,5%
IFN- γ	86,3%
IL-6	125,9%
ARG-1	91,3%
CD206	94,6%
CD209	114,5%
TGF- β	102,2%
IL-10	94,654%
IRAK1	105.1%
IFITM2	106.0%
MAPK12	93.3%
MLST8	78.5%
TRIP6	105.0%
TYMS	64.8%

Objetivo específico 1

Evaluar como la inhibición de HDAC6 modula la activación de STAT3 afectando la polarización de macrófagos.

Evaluación de la polarización de macrófagos mediante expresión génica:

Con el fin de evaluar la polarización de los macrófagos inducida por citoquinas, se determinó mediante RT-qPCR la expresión génica de marcadores asociados a los fenotipos M1 y M2.

Los macrófagos sometidos a condiciones de polarización M1 mostraron una tendencia a una mayor expresión de genes asociados a un perfil proinflamatorio, incluyendo *IL-12*, *IL-6*, *IFN- γ* , *CD80*, *CD86* y *TNF- α* , en comparación con los macrófagos polarizados hacia M2 (Figura 13A-F). De manera similar, los macrófagos polarizados hacia M2 presentaron una tendencia a una mayor expresión de genes asociados a un perfil antiinflamatorio y de reparación tisular, tales como *TGF- β* , *ARG1*, *CD206* y *CD209* (Figura 13G-J).

Sin embargo, las diferencias no alcanzaron significancia estadística en los genes analizados ($p > 0,05$).

En conjunto, los resultados mostraron tendencias diferenciales en la expresión de genes asociados a los fenotipos M1 y M2, concordantes con los perfiles de polarización esperados para cada condición experimental.

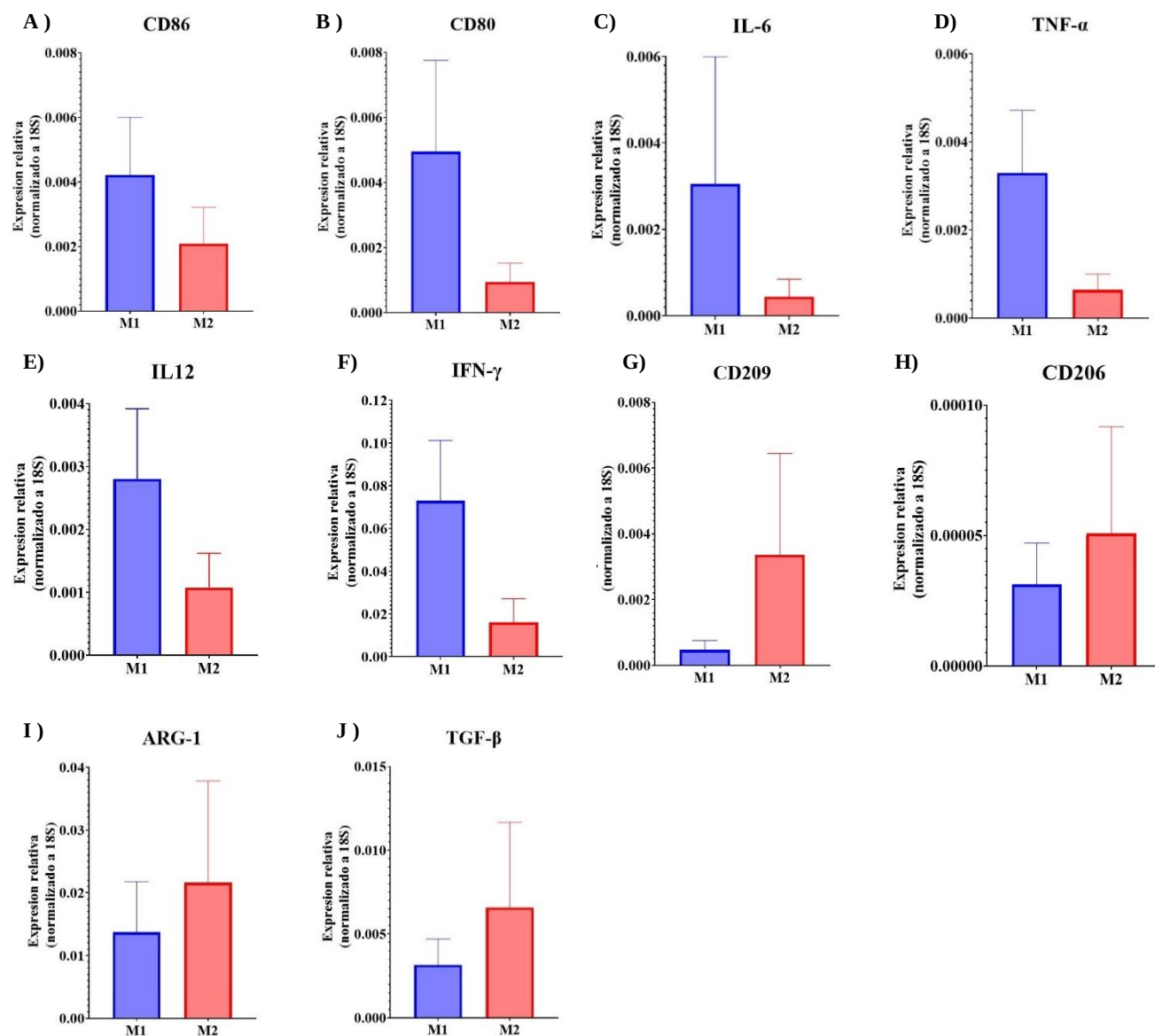


Figura 13. Evaluación de la polarización de macrófagos mediante RT-qPCR.

La expresión de genes característicos de los fenotipos M1 y M2 fue determinada mediante RT-qPCR y expresada como número de copias normalizado al gen de referencia 18S. Las barras azules y rojas representan macrófagos polarizados hacia los fenotipos M1 y M2, respectivamente. Los paneles A-F muestran la expresión de genes asociados a un perfil de polarización M1, mientras que los paneles G-J muestran la expresión de genes asociados a un perfil de polarización M2

Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar (SEM) y fueron analizados mediante t-test no pareado con corrección de Welch para la comparación entre los grupos M1 y M2. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. (n=3)

Evaluación de marcadores proteicos de polarización mediante inmunocitoquímica:

Con el fin de complementar los análisis de expresión génica, se evaluó expresión proteica mediante inmunocitoquímica de los marcadores CD86 y CD163, asociados a los perfiles de polarización M1 y M2, respectivamente. La inmunocitoquímica permitió evaluar la expresión de ambos marcadores en macrófagos polarizados hacia M1 y M2, en ausencia o presencia de Nexturastat A (NA) (Figura 14).

Para determinar las diferencias en la expresión de CD86 entre las condiciones experimentales (M1, M1+NA, M2 y M2+NA), se realizó un análisis de varianza de dos vías (Two-way ANOVA), considerando como factores el perfil de polarización y el tratamiento con Nexturastat A. (Figura 14A). El análisis reveló una interacción significativa entre ambos factores ($p = 0,0230$), indicando que el efecto de NA sobre la expresión de CD86 dependió del estado de polarización de los macrófagos. Asimismo, se observó un efecto significativo del tratamiento ($p = 0,0010$), mientras que el efecto principal del perfil de polarización no fue significativo ($p = 0,1229$). El análisis post hoc de Tukey mostró una mayor expresión de CD86 en macrófagos M1 respecto a M2 en ausencia de tratamiento ($p = 0,0461$). En presencia de NA, estas diferencias desaparecieron ($p = 0,9065$). Además, los macrófagos M2 tratados con NA presentaron una mayor expresión de CD86 en comparación con los macrófagos M2 control ($p = 0,0018$), alcanzando niveles similares a los observados en macrófagos M1 tratados con NA.

Por otra parte, el análisis de la intensidad media de fluorescencia de CD163 no evidenció una interacción significativa entre el tratamiento con Nexturastat A y el perfil de polarización ($p = 0,6401$). Asimismo, no se observaron efectos significativos asociados al tratamiento ($p = 0,3752$) ni al perfil de polarización ($p = 0,2170$). En concordancia con estos resultados, las comparaciones múltiples realizadas mediante la prueba de Tukey no mostraron diferencias significativas entre ninguna de las condiciones experimentales evaluadas. A pesar de no tener significancia estadística, es posible observar que tras el tratamiento con Nexturastat A, la expresión proteica del marcador CD163 experimentó una tendencia a la baja en macrófagos M2, sugiriendo un proceso de repolarización (Figura 14B).

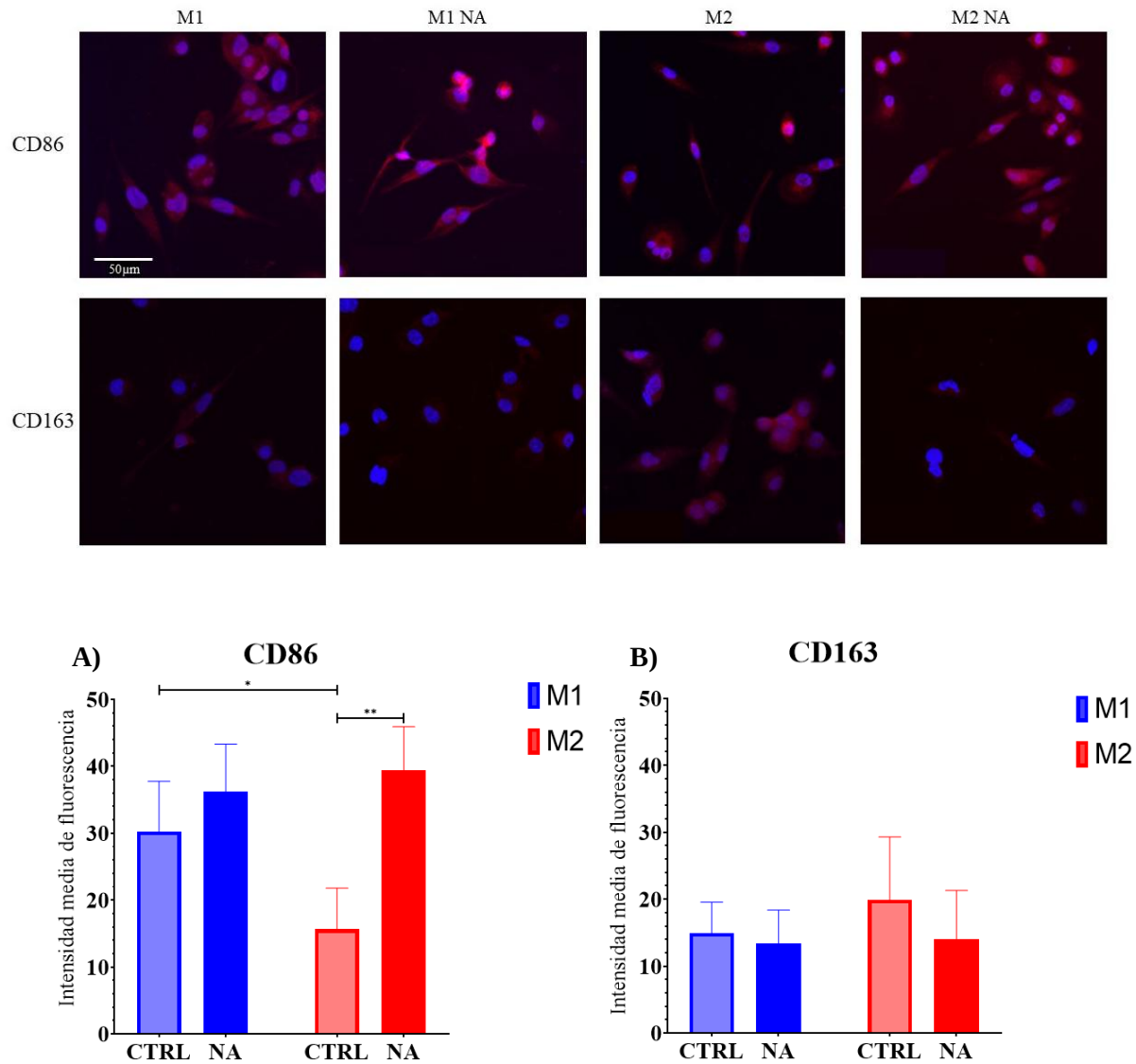


Figura 14. Evaluación de la expresión de marcadores de polarización de macrófagos mediante inmunocitoquímica. Los paneles A y B muestran la intensidad media de fluorescencia de CD86 y CD163 en macrófagos expuestos a estímulos de polarización M1 o M2, en ausencia o presencia de Nexturastat A. La intensidad media de fluorescencia fue corregida por el fondo y utilizada como medida relativa de la expresión proteica. La detección se realizó mediante inmunotinción directa empleando anticuerpos conjugados a fluoróforo. Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar (DE) fueron analizados mediante t-test no pareado con corrección de Welch para la comparación entre los grupos M1 y M2, M1 y M1 NA, M2 y M2 NA. Las barras azules y rojas representan macrófagos M1 y M2, respectivamente, mientras que los tonos claros y oscuros corresponden a las condiciones control (CTRL) y tratadas con NA. * $p < 0,05$. (n=4)

Por su parte, la citometría de flujo permitió cuantificar la expresión de CD86 a nivel de célula individual. Los macrófagos polarizados hacia M1 presentaron una mayor proporción de células CD86+ en comparación con los macrófagos M2. Asimismo, en los macrófagos M2 tratados con Nexturastat A se observó una tendencia al aumento en el porcentaje de células CD86+ respecto a su condición control. Sin embargo, estas diferencias no alcanzaron significancia estadística ($p > 0,05$) (Figura 15).

En conjunto, los resultados obtenidos mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo muestran patrones compatibles con una mayor expresión de CD86 en macrófagos M1 y sugieren que el tratamiento con Nexturastat A podría modular la expresión de este marcador, particularmente en macrófagos M2.

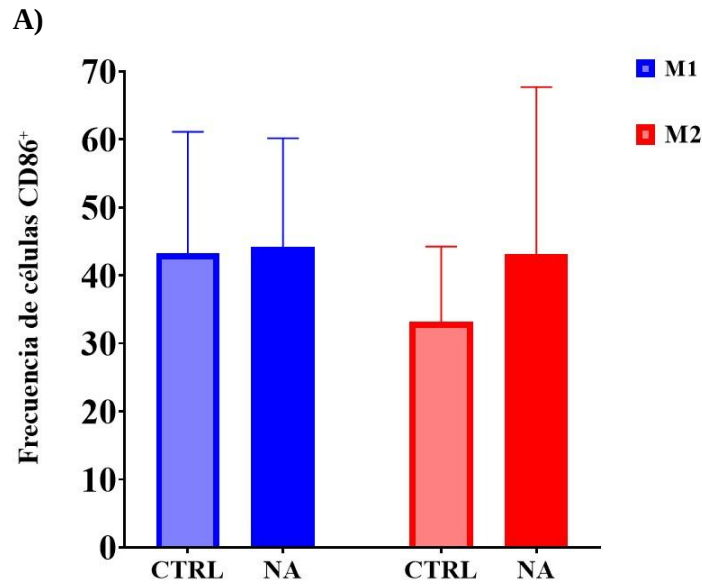


Figura 15. Evaluación de la expresión de CD86 en macrófagos polarizados mediante citometría de flujo. (A) Porcentaje de células CD86+ en macrófagos polarizados hacia los fenotipos M1 y M2, en ausencia (CTRL) o presencia de Nexturastat A (NA). La expresión de CD86 fue determinada mediante citometría de flujo y expresada como porcentaje de células positivas para este marcador. Las barras azules y rojas representan macrófagos M1 y M2, respectivamente, mientras que los tonos claros y oscuros corresponden a las condiciones control (CTRL) y tratadas con NA. Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar (DE) y fueron analizados mediante t-test no pareado con corrección de Welch para la comparación entre los grupos M1 y M2, M1 y M1 NA, M2 y M2 NA. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. (n=3)

Objetivo específico 2

Evaluar el efecto de la inhibición de HDAC6 sobre la expresión de genes representativos de los fenotipos M1 y M2, como indicador de cambios en la polarización de macrófagos.

Efecto de la inhibición de HDAC6 sobre la expresión génica de marcadores de polarización de macrófagos

A continuación, se evaluó el efecto de la inhibición de HDAC6 sobre el perfil de expresión génica de los macrófagos utilizando el inhibidor selectivo Nexturastat A. Para ello, se analizaron los mismos marcadores asociados a los fenotipos M1 y M2 previamente descritos mediante RT-qPCR.

En términos generales, el tratamiento con Nexturastat A se asoció con una disminución en la expresión de marcadores característicos del fenotipo M2, particularmente CD209, CD206, TGF- β y ARG-1. Asimismo, se observó una tendencia al aumento de algunos marcadores asociados al fenotipo M1 (IL12, IL6, IFN- γ , CD80, CD86, TNF- α) en las células polarizadas hacia M2 tratadas con Nexturastat A. Aunque estas variaciones no alcanzaron significancia estadística, los resultados sugieren que la inhibición de HDAC6 podría modular parcialmente el programa transcripcional asociado al fenotipo M2.

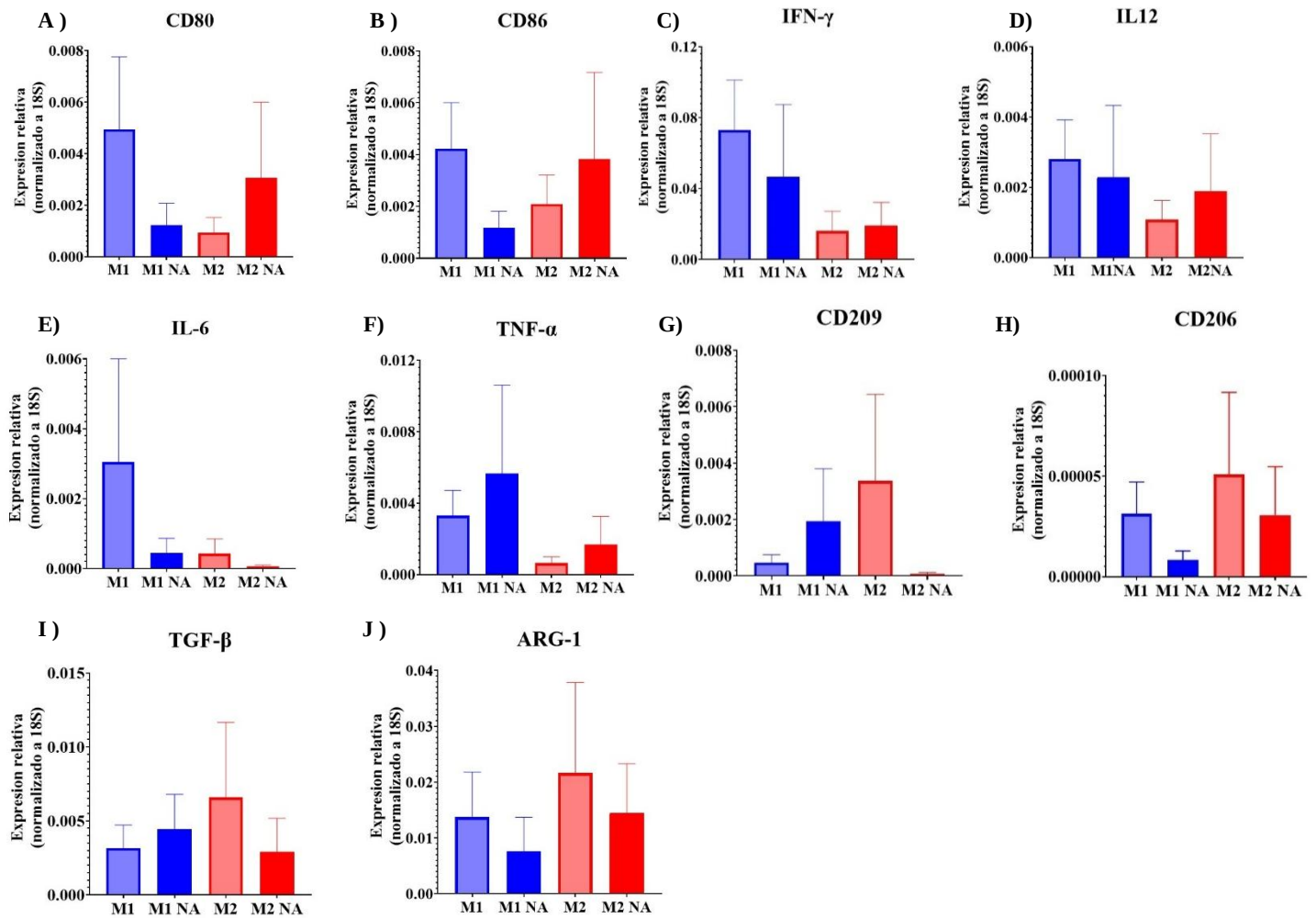


Figura 16. Efecto de la inhibición de HDAC6 sobre la expresión génica de marcadores de polarización de macrófagos. La expresión génica de marcadores característicos de los fenotipos M1 y M2 (IL12, IL6, IFN- γ , CD80, CD86, TNF- α , TGF- β , ARG1, CD206 y CD209) fue evaluada mediante RT-qPCR y expresada como número de copias normalizado al gen de referencia 18S. Las condiciones experimentales incluyeron macrófagos polarizados hacia M1 y M2 en presencia o ausencia del inhibidor selectivo de HDAC6 (Nexturastat A), correspondientes a los grupos M1, M1+NA, M2 y M2+NA. Los paneles A–F muestran la expresión de genes asociados al fenotipo M1, mientras que los paneles G–J corresponden a genes característicos del fenotipo M2. Los datos se presentan como media $\pm$ error estándar (SEM) y fueron analizados mediante t-test no pareado con corrección de Welch para la comparación entre los grupos M1 y M2, M1 y M1 NA, M2 y M2 NA. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. (n=3)

Objetivo específico 3

Evaluar cambios de expresión génica y funcionales en células de CCR asociadas a macrófagos polarizados (M1 y M2) tras la inhibición de HDAC6.

Expresión génica en células HCT-116 expuestas a medio condicionado derivado de macrófagos polarizados

Con el objetivo de evaluar el efecto del microambiente inflamatorio generado por macrófagos sobre células de cáncer colorrectal (CCR), se analizó la expresión génica de un conjunto de genes previamente asociados a procesos de proliferación, respuesta inflamatoria y señalización intracelular. Para ello, células HCT-116 fueron cultivadas en presencia de medio condicionado obtenido de macrófagos polarizados hacia fenotipo M1 o M2, en presencia o ausencia de Nexturastat A. Posteriormente, se evaluó mediante RT-qPCR la expresión de los genes IRAK1, IFITM2, MAPK12, TYMS, TRIP6 y MLST8. Los resultados permitieron determinar el efecto de los factores solubles derivados de macrófagos sobre el perfil de expresión génica tumoral, proporcionando evidencia del rol modulador del microambiente inmune en el comportamiento de células de CCR.

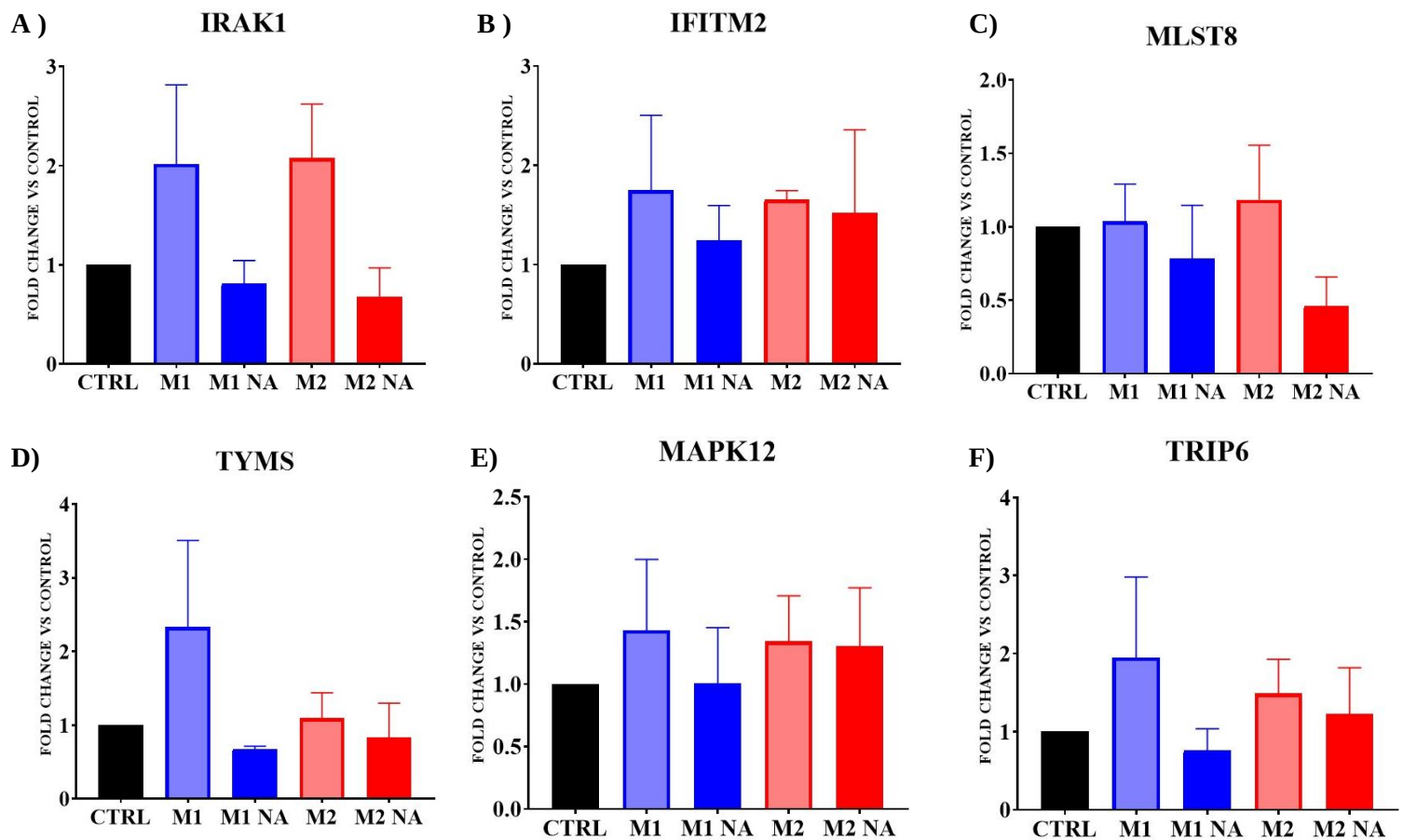


Figura 17. Expresión génica en células HCT-116 expuestas a medio condicionado derivado de macrófagos polarizados. Las células HCT-116 fueron cultivadas con medio condicionado obtenido de macrófagos M1, M1+NA, M2 y M2+NA. Posteriormente, se evaluó mediante RT-qPCR la expresión relativa de los genes IRAK1, IFITM2, MAPK12, TRIP6, TYMS y MLST8. Los niveles de expresión fueron normalizados respecto al gen de referencia 18S y expresados como fold change relativo al control. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM de tres experimentos biológicos independientes realizados en días distintos. Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar (DE) fueron analizados mediante t-test no pareado con corrección de Welch para la comparación entre los grupos M1 y M2, M1 y M1 NA, M2 y M2 NA. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. (n=3)

Evaluación de la captación de células tumorales HCT116 por macrófagos polarizados

Con el fin de evaluar el impacto funcional de la polarización y la inhibición de HDAC6 sobre la capacidad fagocítica de los macrófagos derivados de células THP-1, se realizó un ensayo de co-cultivo entre macrófagos y células de cáncer colorrectal HCT116 bajo condiciones de polarización M1 y M2, en presencia o ausencia del inhibidor selectivo Nexturastat A. Posteriormente, la fagocitosis fue evaluada mediante citometría de flujo, cuantificando la proporción de macrófagos capaces de internalizar células tumorales, los macrófagos fueron marcados con CD11b (BrilliantViolet), y las células tumorales con CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) (FITC), este es un colorante fluorescente permeable y estable, que se une covalentemente a los grupos amino libres presentes en proteínas de la superficie y del interior celular, permitió identificar las células tumorales durante los ensayos de co-cultivo y cuantificar la fagocitosis mediante citometría de flujo. Debido a variaciones en la expresión de CD11b entre macrófagos M1 y M2, las comparaciones de fagocitosis se realizaron dentro de cada condición de polarización.

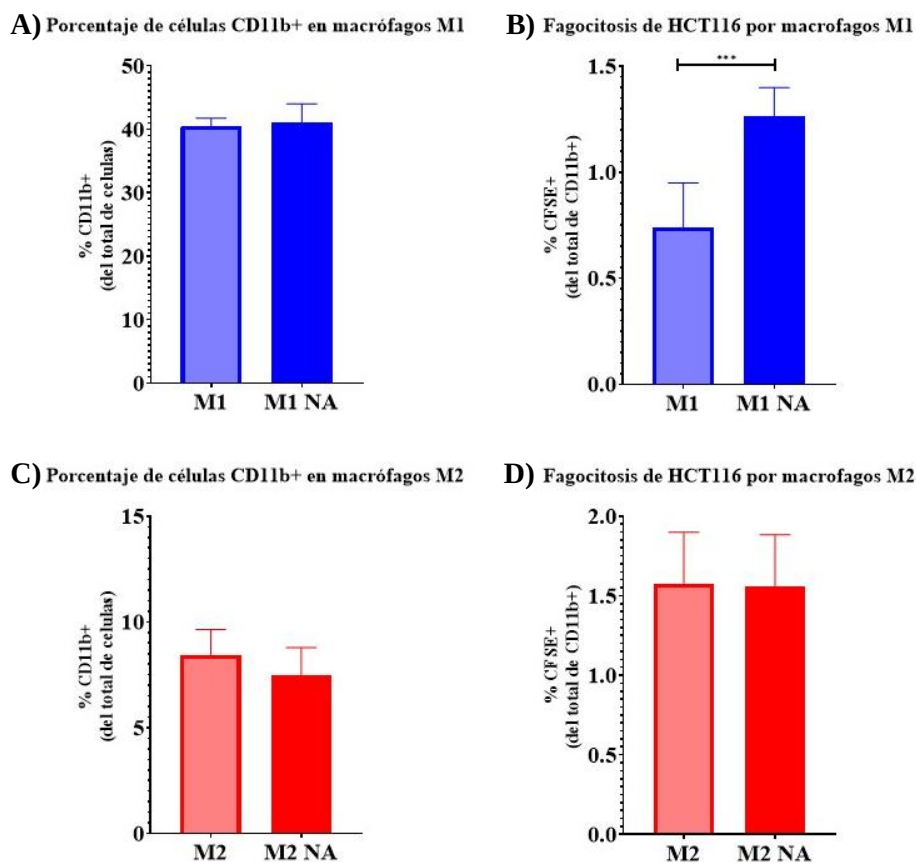


Figura 18. Evaluación de la captación de células tumorales HCT116 por macrófagos polarizados. Las células HCT116 fueron marcadas con CFSE y co-cultivadas con macrófagos M1, M1+NA, M2 y M2+NA. Los macrófagos fueron identificados mediante marcaje con CD11b conjugado a BrilliantViolet y analizados por citometría de flujo. La capacidad de captación/fagocitosis fue determinada cuantificando el porcentaje de células CD11b+CFSE+ respecto al total de células CD11b+.

Debido a variaciones en la expresión de CD11b entre los fenotipos M1 y M2, las comparaciones estadísticas se realizaron dentro de cada condición de polarización. Los datos se expresan como media $\pm$ DE de 3 experimentos independientes. Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar (DE) fueron analizados mediante t-test no pareado con corrección de Welch para la comparación entre los grupos M1 y M2, M1 y M1 NA, M2 y M2 NA. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

XI. Discusión:

Las células THP-1 corresponden a una línea celular humana derivada de una leucemia monocítica aguda y constituyen uno de los modelos *in vitro* más utilizados para el estudio de la biología de los macrófagos. Estas presentan características morfológicas y funcionales similares a las de los monocitos humanos primarios en comparación con otras líneas celulares de leucemia, como HL-60 y ML-1. (T. Liu et al., 2023) Además, poseen ventajas experimentales como la facilidad de cultivo y expansión *in vitro*, así como una mayor estabilidad genética, lo que favorece la reproducibilidad. Su utilización en el presente estudio se justifica por ventajas recién mencionadas. No obstante, es importante considerar que este modelo presenta limitaciones inherentes que pueden influir en la interpretación de los resultados. En este sentido, Daigneault et al. (2010) señalaron que el estado de diferenciación de las células THP-1 puede condicionar su comportamiento biológico, por lo que las observaciones obtenidas en este modelo no siempre reflejan con precisión las respuestas de los macrófagos tisulares diferenciados. (Daigneault et al., 2010) Tedesco et al., (2015) sostiene que debido al background maligno de las células THP-1 es posible obtener respuestas diferentes en comparación con macrófagos obtenidos de monocitos primarios en su entorno natural. Es decir, debido a sus distintos orígenes de desarrollo y atributos fenotípicos, los dos modelos celulares podrían no superponerse en todo el espectro de respuestas. (Tedesco et al., 2018) Por lo tanto, aunque las células THP-1 constituyen una herramienta valiosa para el estudio de la función de macrófagos, los resultados obtenidos deben interpretarse con cautela, considerando las limitaciones propias del modelo experimental y su posible impacto sobre las respuestas observadas.

Para inducir la diferenciación de monocitos THP-1 a macrófagos se utiliza comúnmente PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). Los protocolos descritos en la literatura presentan una elevada variabilidad, empleando concentraciones que oscilan entre 5 y 200 ng/mL y tiempos de exposición que varían entre 24 y 48 horas. (T. Liu et al., 2023) Esta heterogeneidad metodológica evidencia la ausencia de un protocolo universalmente estandarizado para la diferenciación de células THP-1. Asimismo, se ha descrito que las condiciones de cultivo, incluyendo los protocolos de diferenciación y la composición del medio, pueden influir significativamente en el fenotipo final de los macrófagos obtenidos (Shiratori et al., 2017). En consecuencia, las diferencias en las condiciones de cultivo y diferenciación pueden influir sobre las características fenotípicas y funcionales de los macrófagos obtenidos, dificultando la comparación directa de resultados entre estudios y contribuyendo a la variabilidad observada en la literatura.

En este contexto, el protocolo de diferenciación empleado en el presente estudio se basó en lo reportado por Liu et al. (2023), quienes demostraron que concentraciones de PMA inferiores a 300 ng/mL no afectan la proliferación de las células THP-1. Además, mediante análisis por citometría de flujo, los autores determinaron que la exposición a 80 ng/mL de PMA durante 24 h induce la mayor expresión de CD14, un marcador utilizado para evaluar la diferenciación monocito-macrófago de células THP-1. (T. Liu et al., 2023) Sobre la base de estos antecedentes, se seleccionó dicha concentración, con el objetivo de favorecer una diferenciación eficiente sin comprometer la viabilidad celular. No obstante, considerando la amplia variabilidad de concentraciones y tiempos de exposición descritos en la literatura, no puede descartarse que las diferencias observadas entre estudios estén influenciadas, al menos en parte, por las condiciones experimentales utilizadas durante el proceso de diferenciación de las células THP-1.

A pesar de las consideraciones previamente descritas, al evaluar la expresión génica de marcadores clásicos de polarización se observó una tendencia concordante con lo esperado (Fig. 13). Específicamente, la estimulación con LPS e IFN- γ indujo una mayor expresión de genes asociados al fenotipo M1 (CD86, CD80, IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ), y una menor expresión de genes M2 (CD209, CD206, ARG-1, TGF- β),

mientras que el tratamiento con IL-4 e IL-13 promovió un incremento en la expresión de genes característicos del fenotipo M2, acompañado de una menor expresión de genes asociados al fenotipo M1.

En concordancia con la literatura, se ha descrito que tanto macrófagos derivados de THP-1 como de PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) presentan un claro perfil de polarización hacia M1 tras la estimulación con LPS e IFN- γ , caracterizado por un aumento en la expresión de marcadores proinflamatorios, particularmente durante las primeras 24 h de estimulación (Shiratori et al., 2017). De manera similar, en el presente estudio se observó un incremento en la expresión de IL-12, IL-6, CD86, TNF- α , IFN- γ y CD80, respaldando la consistencia de estos resultados con estudios previos.

Sin embargo, pese a que los perfiles de expresión observados fueron concordantes con el estímulo de polarización aplicado, las diferencias entre las condiciones experimentales no alcanzaron significancia estadística. Estos resultados coinciden con lo reportado por Tedesco et al. (2018), quienes al comparar macrófagos derivados de THP-1 y PBMC humanos observaron que, aunque ambos modelos presentaban cambios de expresión esperados, las respuestas inducidas en células THP-1 eran menos pronunciadas y, en varios casos, no alcanzaban significancia estadística, particularmente para genes como IL-6, TNF- α e IL-10. (Tedesco et al., 2018) En conjunto, estos antecedentes sugieren que las respuestas de polarización en células THP-1 pueden ser más atenuadas y variables que aquellas observadas en macrófagos primarios.

Adicionalmente, la elevada variabilidad observada podría estar asociada al reducido tamaño muestral, a la heterogeneidad inherente del modelo THP-1 y a la marcada plasticidad funcional de los macrófagos. Actualmente se reconoce que los estados M1 y M2 representan extremos de un continuo de activación, existiendo fenotipos mixtos.(Väyrynen et al., 2021)

Otro aspecto que podría haber contribuido a la ausencia de diferencias significativas es la naturaleza dinámica de la expresión génica. Diversos genes asociados a la polarización de macrófagos presentan patrones de expresión transitorios, alcanzando niveles máximos de expresión en distintos tiempos tras la estimulación. En este contexto, Melton et al., (2015) sostiene que en el caso de TNF- α , la acumulación sostenida de esta proteína en el medio condicionado se asociaba con una disminución en los niveles de ARNm, sugiriendo la existencia de mecanismos de retroalimentación, observaciones similares fueron descritas para IL-6 e IL-12 (Melton et al., 2015) Asimismo, utilizando macrófagos derivados de médula ósea, Melton et al. (2015) observaron que, a pesar de que las células respondían a los estímulos de polarización de manera consistente con el fenotipo esperado, citoquinas como IFN- γ , IL-4 e IL-10 alcanzaban sus máximos niveles de producción y liberación al medio extracelular en distintos tiempos posteriores a la estimulación. (Melton et al., 2015)

En otro estudio realizado con macrófagos derivados de PBMC, se evaluó la expresión génica de marcadores característicos de los distintos estados de polarización en diferentes tiempos posteriores a la estimulación. Los autores observaron que la expresión de TNF- α alcanzaba un máximo aproximadamente a las 4 horas postestimulación, mientras que IL-1 β presentaba una respuesta más sostenida a lo largo del tiempo. En el caso de IL-12, se evidenció un aumento inicial de la expresión a las 4 horas, seguido de un segundo incremento entre las 48 y 72 horas posteriores a la estimulación. (Unuvar Purcu et al., 2022)

Estos resultados demuestran que cada citoquina presenta una cinética de respuesta específica y no necesariamente alcanzan su máximo nivel de transcripción de manera simultánea, por lo que no puede descartarse que el punto temporal seleccionado en el presente estudio haya correspondido a una fase en la que algunos genes ya hubiesen superado su máxima expresión o estuvieran disminuyendo su tasa de transcripción como consecuencia de mecanismos de retroalimentación.

Adicionalmente, la polarización de los macrófagos está regulada por una compleja red de señalización que involucra múltiples vías, incluyendo las familias IRF, STAT, NF- κ B y PPAR (Shiratori et al., 2017). Si bien en el presente estudio el análisis se centró en la modulación de la vía STAT3 mediante la inhibición de HDAC6, la existencia de posibles mecanismos compensatorios mediados por otras vías no evaluadas podría haber contribuido a atenuar los efectos esperados sobre la expresión génica.

Una observación relevante descrita por Melton et al. (2015) es que la estimulación de macrófagos con LPS e IFN- γ indujo, además de una respuesta proinflamatoria, una elevada producción de IL-10. Esta citoquina promueve la polarización hacia el fenotipo M2c y ejerce sus efectos principalmente mediante la activación de la vía JAK/STAT3, generando la adquisición de características antiinflamatorias. (Melton et al., 2015). Si bien en el presente estudio no se evaluó la expresión de IL-10, no puede descartarse que un fenómeno similar ocurra en macrófagos derivados de THP-1 o en macrófagos asociados a tumores (TAMs), donde la producción secundaria de IL-10 podría favorecer mecanismos de repolarización, destinados a limitar la respuesta inflamatoria y promover una transición hacia un estado más inmunosupresor. En este contexto, la inhibición de HDAC6 mediante Nexturastat A podría representar una estrategia capaz de modular la activación de STAT3 inducida por IL-10, limitando la repolarización de macrófagos con características M1 hacia fenotipos M2 inmunosupresores. Aunque esta hipótesis requiere validación experimental adicional, plantea un mecanismo potencial mediante el cual la inhibición del eje HDAC6/STAT3 podría contribuir a mantener un microambiente tumoral más immunoestimulador.

En conjunto, los resultados obtenidos muestran perfiles de expresión consistentes con las tendencias descritas previamente en la literatura (Gracia-Hernandez et al., 2024), sin observarse resultados discordantes entre marcadores proinflamatorios y antiinflamatorios. Esto respalda la efectividad del protocolo de diferenciación y polarización empleado.

Con el fin de caracterizar de manera más completa los cambios inducidos por la inhibición de HDAC6, se emplearon tanto citometría de flujo como inmunocitoquímica para evaluar la expresión de CD86 y CD163, marcadores característicos de los estados de polarización M1 y M2 respectivamente. Aunque ambas técnicas permiten analizar la expresión proteica, proporcionan información complementaria, incluyendo el porcentaje de células positivas para un marcador y la intensidad media de fluorescencia (MFI), esto cobra especial importancia al considerar que se ha descrito que las células positivas para un determinado marcador no necesariamente corresponden a aquellas que presentan la mayor intensidad de señal, por lo que ambos parámetros no siempre se correlacionan directamente (L. Liu et al., 2022).

En este contexto, se esperaba que la estimulación con LPS e IFN- γ promoviera una mayor expresión de CD86, marcador asociado al fenotipo M1, mientras que la estimulación con IL-4 e IL-13 favoreciera la expresión de CD163, marcador comúnmente asociado al fenotipo M2. Adicionalmente, considerando el papel descrito de HDAC6 en la regulación de la polarización de macrófagos, se planteó que su inhibición mediante Nexturastat A podría reducir la expresión de CD163 en macrófagos M2, reflejando una posible modulación del fenotipo antiinflamatorio (M2). (Fig 14.)

Los resultados obtenidos mediante inmunocitoquímica mostraron una respuesta parcialmente concordante con esta hipótesis. En primer lugar, los macrófagos M1 presentaron una mayor expresión de CD86 que los M2 en ausencia de tratamiento, lo que confirma la adecuada respuesta a los estímulos de polarización. Esta diferencia significativa disminuye tras la inhibición de HDAC6, debido principalmente a un aumento significativo de la expresión de CD86 en los macrófagos M2 tratados con Nexturastat A, lo que sugiere una modulación del estado de estas células hacia un perfil más immunoestimulador, aunque no permite concluir una repolarización completa desde un fenotipo protumoral hacia uno antitumoral. Por otra parte, aunque se

observó una disminución de la expresión de CD163 en los macrófagos M2 tratados con NA, este cambio no alcanzó significancia estadística.

Adicionalmente, los macrófagos M1 tratados con Nexturastat A también mostraron un incremento en la expresión de CD86 respecto de su condición control. Si bien este efecto no había sido considerado inicialmente, podría indicar que la inhibición de HDAC6 favorece la expresión de moléculas co-estimuladoras asociadas a la activación macrófagos, potenciando determinadas características proinflamatorias. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren una repolarización parcial del fenotipo, caracterizada por una mayor expresión de CD86 y una tendencia a la disminución de CD163.

En cuanto a los resultados de expresión proteica evaluados mediante citometría de flujo, se analizó la expresión de CD86. Los resultados fueron consistentes con los obtenidos mediante inmunocitoquímica; en los macrófagos M1, los niveles de CD86 se mantuvieron relativamente estables con y sin tratamiento, mientras que en los macrófagos M2 el porcentaje de células positivas para CD86 aumentó aproximadamente un 10 % tras el tratamiento con Nexturastat A, alcanzando valores similares a los observados en las células M1. Aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, respaldan la tendencia observada mediante inmunocitoquímica.

Estudios realizados en macrófagos RAW 264.7 demostraron que la estimulación con IFN- γ y LPS incrementa significativamente la expresión de CD86, alcanzando valores aproximadamente un 40% superiores a los observados en células no estimuladas, mientras que en macrófagos M2 la expresión de este marcador se mantiene cercana o ligeramente inferior a los niveles basales. (L. Liu et al., 2022)

Tedesco et al. (2018) estudiaron los cambios en la expresión de CD206 y CD163, ambos marcadores ampliamente utilizados para caracterizar el fenotipo M2, comparando macrófagos derivados de PBMC y de THP-1. Los autores observaron que ambas proteínas aumentaban significativamente tras la estimulación con IL-4 e IL-13 en macrófagos derivados de PBMC, mientras que en células THP-1 estos cambios no fueron evidentes. De hecho, CD206 presentó una mayor expresión en macrófagos M1 que en M2, y CD163 resultó indetectable, lo que sugiere una respuesta atípica en este modelo experimental (Tedesco et al., 2018) Estos antecedentes podrían explicar la ausencia de cambios significativos en la expresión de CD163 observada en el presente estudio, aun cuando se observa una tendencia hacia su disminución tras la inhibición de HDAC6.

En 2022 se estudiaron los cambios de expresión de marcadores de polarización en el tiempo, a partir de macrófagos derivados de PBMC. El marcador CD86 en macrófagos M1 aumenta de manera sostenida hasta las 12 horas posteriores al tratamiento de estimulación con citoquinas, luego disminuye a las 24 horas hasta niveles comparables con la condición basal y posteriormente vuelve a aumentar levemente entre las 48 y 72 horas. Para los macrófagos M2, los marcadores CD206 y CD163 mostraron un incremento sostenido entre las 24 y 72 horas posteriores a la estimulación. (Unuvar Purcu et al., 2022) Estos hallazgos ponen de manifiesto la naturaleza dinámica de la expresión de los marcadores de polarización y sugieren que el tiempo de evaluación puede influir significativamente en los resultados obtenidos.

En la Figura 16 se evaluó la expresión génica de marcadores representativos de los fenotipos M1 y M2 en macrófagos polarizados, en ausencia y presencia de Nexturastat A. En términos generales, se observó que varios marcadores asociados al fenotipo M1 (CD80, CD86, IL-6, IFN- γ y TNF- α) tendieron a aumentar su expresión en los macrófagos M2 tratados con el inhibidor, alcanzando en algunos casos niveles comparables a los observados en macrófagos M1, como ocurrió con CD80, CD86 e IL-12. De manera complementaria, los genes característicos del fenotipo M2 (CD209, CD206, TGF- β y ARG-1) mostraron una tendencia a disminuir su expresión tras el tratamiento con Nexturastat A, aproximándose en la mayoría de los casos a los niveles observados en macrófagos M1. Aunque estas diferencias no alcanzaron significancia estadística, los

resultados sugieren una modulación parcial del programa transcripcional asociado al fenotipo M2 y la adquisición de determinadas características propias de un perfil más proinflamatorio, más que una repolarización completa hacia el fenotipo M1.

Un fenómeno adicional observado fue la disminución en la expresión de algunos genes asociados al fenotipo M1 en los macrófagos tratados con Nexturastat A. Una posible explicación para este comportamiento corresponde a la naturaleza dinámica y transitoria de la expresión génica durante la polarización de macrófagos. Como se discutió previamente, diversos mediadores inflamatorios presentan mecanismos de retroalimentación negativa y patrones temporales específicos de expresión, por lo que el punto temporal seleccionado para el análisis podría haber coincidido con una fase de disminución transcripcional posterior a un aumento inicial inducido por la estimulación.

En conjunto, el tratamiento con Nexturastat A se asoció con una tendencia a la disminución de marcadores característicos del fenotipo M2, particularmente CD209, CD206, TGF- β y ARG-1, así como con un aumento de algunos marcadores M1 en células polarizadas hacia M2. Aunque estas variaciones no alcanzaron significancia estadística, los resultados respaldan la hipótesis de que la inhibición de HDAC6 podría modular parcialmente las características asociadas al fenotipo M2 y favorecer un estado funcional más inmunoestimulador.

Con el propósito de evaluar si la modulación de los macrófagos mediante la inhibición de HDAC6 era capaz de influir sobre las células tumorales, las células HCT116 fueron cultivadas con medio condicionado proveniente de macrófagos M1 y M2, tratados o no con Nexturastat A. Se planteó que las diferencias en la composición del secretoma de los macrófagos podrían modificar la expresión de genes asociados a vías inmunomoduladoras y de progresión tumoral en las células de cáncer colorrectal.

Para ello, se analizaron los niveles de expresión de IFITM2, IRAK1, MAPK12, MLST8, TYMS y TRIP6 (Fig 17). Estos genes fueron seleccionados con base en la observación de Mardones et al., (2023) quienes, mediante análisis transcriptómico (BRB-seq) y estudios de expresión diferencial en líneas celulares de CCR tratadas con IL-6 y el inhibidor selectivo de HDAC6 Nexturastat A, identificaron un conjunto de genes potencialmente regulados por el eje STAT3/HDAC6. Posteriormente, a través de análisis de ontología génica y redes de interacción funcional, estos autores determinaron que IRAK1, TRIP6, TYMS, MLST8, IFITM2 y MAPK12 participan en vías relacionadas con la respuesta inmune e inflamatoria, incluyendo la señalización mediada por citoquinas. (Mardones et al., 2023) En conjunto, estos antecedentes sugieren que la expresión de dichos genes podría estar influenciada por factores solubles presentes en el microambiente tumoral y, particularmente, por modificaciones en el secretoma de macrófagos inducidas por la inhibición de HDAC6, lo que justifica su evaluación en el presente estudio.

En este contexto, era esperable que los medios condicionados derivados de macrófagos M1 contuvieran predominantemente citoquinas proinflamatorias, mientras que los provenientes de macrófagos M2 presentarían mediadores antiinflamatorios y factores promotores del crecimiento tumoral. En concordancia con esta hipótesis, Tedesco et al. (2018) caracterizaron el secretoma de macrófagos derivados tanto de THP-1 como de PBMC y observaron que los macrófagos M1 secretaban principalmente citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α , IL-6, GM-CSF y VEGF-A, mientras que los macrófagos M2 se caracterizaban por una mayor producción de TGF- α e IL-4, entre otros mediadores asociados a un fenotipo inmunorregulador. Asimismo, Unuvar Purcu et al. (2022) demostraron que la secreción de estas citoquinas es un proceso dinámico, observándose una liberación temprana de TNF- α e IL-1 β en macrófagos M1, mientras que citoquinas características del fenotipo M2, como IL-10 y TGF- β , alcanzan sus máximos niveles de secreción en etapas más tardías. (Tedesco et al., 2018; Unuvar Purcu et al., 2022)

Dado que no se realizó una caracterización directa del secretoma mediante cuantificación de citoquinas o análisis proteómico, la composición del medio condicionado no pudo determinarse experimentalmente. Sin embargo, los cambios observados en la expresión génica de las células HCT116 permiten inferir que la inhibición de HDAC6 en los macrófagos modifica la señalización transmitida por su secretoma, afectando la expresión de genes involucrados en la progresión tumoral y la respuesta inmunitaria.

IRAK1 (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1) es una proteína con actividad serina/treonina quinasa que desempeña un papel clave en la transducción de señales mediadas por los receptores de interleucina-1 (IL-1R) y los receptores tipo Toll (TLR), ambas vías fundamentales para la regulación de la inmunidad innata y la respuesta inflamatoria. Tras la activación de estos receptores, IRAK1 promueve la activación de diversas cascadas de señalización intracelular, incluyendo NF- κ B, JNK y p38 MAPK, regulando procesos como la inflamación, la supervivencia y la proliferación celular. Además, se ha descrito que la activación del complejo de señalización en el que participa IRAK1 favorece la fosforilación y activación de STAT3, estableciendo un vínculo entre estas vías inflamatorias y la regulación transcripcional mediada por este factor. La sobreexpresión de IRAK1 ha sido descrita en diversos tumores sólidos, incluido el cáncer colorrectal, donde se ha asociado con un peor pronóstico. En este contexto, Hozaka et al. (2021) demostraron que la inhibición de IRAK1 disminuye la proliferación y la capacidad invasiva de células de cáncer colorrectal, destacando su potencial como diana terapéutica. (Hozaka et al., 2021; Kim et al., 2024) De acuerdo con los resultados obtenidos (Fig 17A), la exposición de las células HCT-116 al medio condicionado proveniente de macrófagos M1 y M2 se asoció con un aumento en la expresión de IRAK1 respecto al grupo control. En contraste, cuando las células fueron cultivadas con medio condicionado de macrófagos tratados con Nexturastat A, la expresión de este gen tendió a disminuir, alcanzando niveles similares a los observados en la condición control. Estos hallazgos son de particular interés, considerando que la sobreexpresión de IRAK1 se ha asociado con un peor pronóstico en cáncer colorrectal, así como con un aumento en la proliferación, capacidad invasiva y potencial metastásico de las células tumorales (Hozaka et al., 2021). En este contexto, la disminución de la expresión de IRAK1 observada tras la inhibición de HDAC6 sugiere que las modificaciones inducidas en el secretoma de los macrófagos podrían atenuar la activación de vías de señalización proinflamatorias y protumorales en las células de cáncer colorrectal.

IFITM2 (Interferon-Induced Transmembrane Protein 2) es una proteína transmembrana inducida por interferones, clásicamente relacionada con la respuesta antiviral innata. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que también desempeña un papel relevante en la progresión tumoral. En cáncer colorrectal, tanto su expresión génica como proteica se encuentran aumentadas y su sobreexpresión se ha asociado con un peor pronóstico y una menor supervivencia de los pacientes. Asimismo, el silenciamiento (knockdown) de IFITM2 disminuye la proliferación y la migración de células tumorales, sugiriendo un papel promotor del crecimiento y la progresión del cáncer. Adicionalmente, una elevada expresión de IFITM2 se ha asociado con un mayor infiltrado de células inmunes en el microambiente tumoral, incluyendo células dendríticas (DC), células NK, neutrófilos y macrófagos, así como con una menor respuesta a inmunoterapias, lo que indica que esta proteína podría participar en mecanismos de inmunosupresión y evasión inmune. (Y. Liu et al., 2024) La expresión de IFITM2 (Fig 17B) en células HCT-116 mostró una tendencia al aumento tras la exposición al medio condicionado proveniente de macrófagos M1 y M2, siendo la condición M1 la que presentó el mayor nivel de expresión. En ambos casos, el tratamiento de los macrófagos con Nexturastat A tendió a disminuir la expresión de este gen, aproximándola a los niveles observados en la condición control. Sin embargo, estas variaciones no alcanzaron significancia estadística, por lo que no es posible concluir un efecto consistente del tratamiento sobre la regulación de IFITM2 bajo las condiciones evaluadas.

MLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8), también conocido como G β L, es una proteína que forma parte de los complejos mTORC1 y mTORC2. Esta subunidad es esencial en la actividad quinasa de mTOR,

ya que contribuye a la estabilización de su sitio catalítico. En cáncer colorrectal, tanto la expresión génica como proteica de MLST8 se encuentran aumentadas, lo que se ha asociado con la activación de la vía mTOR y con la promoción de procesos como la proliferación, el crecimiento tumoral, la invasión y la progresión de las células tumorales. (Kakumoto et al., 2015) La expresión de MLST8 (Fig 17C) en células HCT-116 se mantuvo cercana a los niveles observados en la condición control tras la exposición a los medios condicionados provenientes de macrófagos M1, M1 tratados con Nexturastat A y M2. Sin embargo, las células expuestas al medio condicionado de macrófagos M2 tratados con Nexturastat A mostraron una tendencia a una menor expresión de MLST8, alcanzando niveles aproximadamente un 50 % inferiores al control. Aunque esta disminución no alcanzó significancia estadística, resulta de interés debido a que la sobreexpresión de MLST8 se ha asociado con la activación de la vía mTOR, favoreciendo el crecimiento, la supervivencia y la invasión de las células de cáncer colorrectal. En este contexto, la reducción observada sugiere que la inhibición de HDAC6 en macrófagos M2 podría modificar su secretoma de manera que atenúe la activación de vías protumorales en las células HCT-116.

TYMS (thymidylate synthase) es el gen que codifica para la enzima timidilato sintasa, una proteína esencial para la replicación y reparación del ADN. Debido a su función en la proliferación celular, la sobreexpresión de TYMS se ha descrito en diversos tipos de cáncer, incluido el cáncer colorrectal, donde se asocia con un peor pronóstico, mayor agresividad tumoral, incremento de la capacidad de metástasis y promoción de la transición epitelio-mesenquimal (EMT). (Zhang et al., 2022) Asimismo, la timidilato sintasa constituye la principal diana molecular del 5-fluorouracilo (5-FU), uno de los agentes quimioterapéuticos más utilizados en el tratamiento del cáncer colorrectal. En este contexto, la elevada expresión de TYMS se ha relacionado con resistencia al tratamiento con 5-FU y con una menor respuesta clínica (Zhang et al., 2022) En el presente estudio, la expresión de TYMS (Fig 17D) en células HCT-116 expuestas a medios condicionados provenientes de macrófagos M1 mostró un aumento aproximado de dos veces en la expresión de TYMS respecto del grupo control, mientras que el tratamiento de estos macrófagos con Nexturastat A redujo dicha expresión hasta niveles inferiores al control. Por otra parte, los medios condicionados derivados de macrófagos M2, con o sin tratamiento, no modificaron sustancialmente la expresión de este gen.

MAPK12 (Mitogen-activated protein kinase 12) también conocida como p38 γ , pertenece a la familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), las cuales participan en la regulación de diversos procesos celulares, incluyendo la proliferación, diferenciación, migración, supervivencia y apoptosis. Su activación puede ser inducida por una amplia variedad de estímulos extracelulares, entre ellos citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento y diferentes tipos de estrés celular. (Slattery et al., 2012) Recientemente, MAPK12 (p38 γ) ha emergido como un potencial regulador de la tumorigénesis. Se ha demostrado que esta quinasa es capaz de fosforilar la proteína supresora de tumores de retinoblastoma (Rb), favoreciendo su inactivación y promoviendo la progresión del ciclo celular. En consecuencia, la sobreexpresión de MAPK12 se ha asociado con el desarrollo y progresión del cáncer colorrectal, contribuyendo al aumento de la proliferación tumoral y a un fenotipo más agresivo. (Su et al., 2019) Además, MAPK12 (p38 γ) ha cobrado interés por su rol en la interacción entre inflamación y cáncer. Se ha descrito que actúa como un efector de la vía RAS, además, puede promover la progresión tumoral mediante la activación de la vía Wnt/ β -catenina, favoreciendo procesos como la proliferación, migración e invasión celular. (Yin et al., 2016) Los resultados de medición de expresión génica mostraron que el medio condicionado de macrófagos M1 promovió un aumento en la expresión de MAPK12 en células HCT116. Sin embargo, cuando los macrófagos M1 fueron tratados con Nexturastat A, este efecto se atenuó, alcanzando niveles de expresión comparables a los observados en el grupo control. En contraste, el medio condicionado proveniente de macrófagos M2, tanto en ausencia como en presencia del inhibidor, no produjo modificaciones relevantes en la expresión de este gen. Aunque estas diferencias no alcanzaron significancia

estadística, la tendencia observada sugiere que la inhibición de HDAC6 en macrófagos podría modificar la composición de su secretoma, disminuyendo la inducción de vías asociadas a la progresión tumoral, como MAPK12, en células de cáncer colorrectal.

TRIP6 (Thyroid Hormone Receptor Interacting Protein 6) es una proteína adaptadora que participa en la regulación de múltiples vías de señalización intracelular. Sus funciones se han relacionado con la movilidad celular, la adhesión, la activación transcripcional y la regulación de vías inflamatorias, entre ellas la vía NF- κ B. Debido a estas funciones, TRIP6 desempeña un papel relevante en la proliferación, migración y metástasis de diversos tumores, incluido el cáncer colorrectal. Asimismo, estudios bioinformáticos han evidenciado que una elevada expresión de TRIP6 se asocia con alteraciones en la infiltración de células inmunes del microambiente tumoral, observándose una correlación negativa con la abundancia de linfocitos T CD8⁺ y neutrófilos, y una correlación positiva con linfocitos T CD4⁺, lo que sugiere que TRIP6 podría contribuir al crecimiento y progresión tumoral mediante mecanismos asociados a la evasión de la respuesta inmunitaria. Estos hallazgos sugieren que TRIP6 podría contribuir no solo a la progresión tumoral, sino también a la modulación de la respuesta inmunitaria en el cáncer colorrectal.(Ren et al., 2025) Tras el cultivo de las células HCT116 con medio condicionado de macrófagos, se observó que el secretoma proveniente de macrófagos M1 indujo un aumento en la expresión génica de TRIP6 respecto del grupo control. Sin embargo, cuando los macrófagos fueron tratados con Nexturastat A, este incremento se revirtió, disminuyendo la expresión de TRIP6 hasta niveles cercanos a los del control. En el caso del medio condicionado derivado de macrófagos M2, también se evidenció un aumento en la expresión de este gen, aunque de menor magnitud que el observado para M1. Asimismo, el tratamiento con Nexturastat A en esta condición produjo una leve disminución en la expresión de TRIP6.

Una característica en común de los genes analizados es que varios de ellos han sido descritos como blancos transcripcionales o genes regulados por STAT3. Este factor de transcripción puede activarse en respuesta a múltiples estímulos presentes en el microambiente tumoral, entre ellos diversas citoquinas, siendo IL-6 uno de sus principales activadores a través de la vía JAK/STAT3. En el presente estudio, los análisis de RT-qPCR mostraron que los macrófagos polarizados hacia el fenotipo M1 presentaron la mayor expresión génica de IL-6, mientras que el tratamiento con Nexturastat A redujo considerablemente su expresión. Si bien no se cuantificaron los niveles de IL-6 en el medio condicionado, es posible plantear que la disminución de su expresión en los macrófagos tratados con Nexturastat A se traduzca en una menor disponibilidad de esta citoquina en el medio condicionado. Bajo esta hipótesis, la menor activación de la vía JAK/STAT3 en las células HCT116 podría contribuir, al menos parcialmente, a la disminución observada en la expresión de genes como IRAK1, TRIP6, MAPK12, MLST8 y TYMS. No obstante, esta hipótesis deberá ser confirmada mediante la cuantificación de IL-6 en el medio condicionado y la evaluación directa de la activación de STAT3 en las células tumorales.

Aunque los cambios individuales no alcanzaron significancia estadística, cinco de los seis genes analizados mostraron una tendencia común a disminuir su expresión cuando las células HCT-116 fueron expuestas al medio condicionado proveniente de macrófagos tratados con Nexturastat A. Este patrón resulta relevante, ya que la mayoría de estos genes participa en procesos asociados a inflamación, proliferación, supervivencia celular e invasión tumoral. En consecuencia, estos resultados respaldan la hipótesis de que la inhibición de HDAC6 no solo modifica el fenotipo de los macrófagos, sino que también altera su secretoma, reduciendo su capacidad para promover la progresión tumoral.

Finalmente, se evaluó la capacidad de fagocitosis de los macrófagos, una de sus principales funciones principales junto a la presentación antigénica y la secreción de mediadores. En el contexto del cáncer, la fagocitosis por parte de los macrófagos constituye un mecanismo relevante para la eliminación de células

tumorales, pero este proceso puede verse influenciado por la polarización de estas células. En este sentido, se planteó que la inhibición de HDAC6 podría modificar la capacidad fagocítica de los macrófagos mediante cambios en su estado funcional. Para evaluar esta hipótesis, se realizó co-cultivo directo de células tumorales de la línea HCT-116 con macrófagos polarizados hacia los fenotipos M1 y M2, tratados o no con Nexturastat A. Posteriormente, el porcentaje de macrófagos que habían fagocitado células tumorales se determinó mediante citometría de flujo.

Para diferenciar macrófagos de células tumorales, se consideró que acorde a lo descrito por Tedesco et al., (2018) los macrófagos conservan la expresión de varios marcadores de superficie, entre ellos CD11b, F4/80, CD68. Además de eso, compararon la capacidad de fagocitosis de estas células y observaron que los macrófagos M1 fagocitan aproximadamente el doble que los M2. (Tedesco et al., 2018) Acorde a esta observación, se espera que tras el tratamiento de inhibición de HDAC6, los macrófagos M2 que parecen estar sufriendo un proceso de “repolarización” aumenten su capacidad de fagocitosis.

La fagocitosis es frecuentemente promovida por señales intrínsecas denominadas "eat me", las cuales actúan como ligandos para receptores de fagocitosis. La interacción entre estas señales y sus receptores desencadena una reorganización del citoesqueleto, permitiendo el reconocimiento, engullimiento e internalización del blanco celular. Las células tumorales son capaces de evadir la fagocitosis por los macrófagos mediante la sobreexpresión de proteínas de membrana conocidas como señales "don't eat me" ("no me comas"). Entre las señales "don't eat me" descritas se encuentran CD47, CD24, PD-L1, la subunidad $\beta 2$ -microglobulina ($\beta 2M$) del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I), estaniocalcina-1 (STC-1) y GD2 (Y. Liu et al., 2023)

Los resultados obtenidos mostraron que la proporción de células CD11b+ no se modificó tras el tratamiento con Nexturastat A dentro de cada estado de polarización. Sin embargo, se observaron diferencias importantes entre macrófagos M1 y M2, ya que aproximadamente un 40% de las células M1 expresaron CD11b, mientras que en los macrófagos M2 este porcentaje fue cercano al 8%. Debido a esta diferencia en la población CD11b+, la comparación directa de la capacidad fagocítica entre ambos estados de polarización resulta limitada, por lo que el efecto de Nexturastat A se analizó de manera independiente dentro de cada fenotipo.

En los macrófagos M1, aproximadamente el 0,7% de las células CD11b+ presentaron fagocitosis, porcentaje que aumentó significativamente hasta un 1,3% tras el tratamiento con Nexturastat A, representando un incremento cercano al doble respecto de la condición sin tratamiento. En contraste, en los macrófagos M2 el porcentaje de células CD11b+ que realizaron fagocitosis fue cercano al 1,5% y no presentó variaciones tras la inhibición de HDAC6.

Los resultados obtenidos no fueron completamente concordantes con la hipótesis planteada. Si bien se esperaba que la inhibición de HDAC6 incrementara la capacidad fagocítica principalmente en los macrófagos M2, debido al aparente proceso de repolarización observado en experimentos anteriores, dicho efecto no fue evidenciado. En contraste, el aumento significativo de la fagocitosis se observó en los macrófagos M1 tratados con Nexturastat A, sugiriendo que la inhibición de HDAC6 podría potenciar funciones efectoras propias del fenotipo proinflamatorio más que inducir cambios funcionales detectables en macrófagos M2.

En 2002, Hubbert et al. describieron por primera vez a HDAC6 como la principal desacetilasa citoplasmática de la subunidad α -tubulina, un componente fundamental de los microtúbulos. La desacetilación de α -tubulina constituye una modificación postraducciona que regula la estabilidad de estas estructuras, siendo los microtúbulos enriquecidos en α -tubulina acetilada (Ac- α -tubulina) los más estables. En consecuencia, la actividad de HDAC6 puede influir en diversos procesos celulares dependientes de los microtúbulos, entre ellos el transporte intracelular y la motilidad celular (Hubbert et al., 2002) Posteriormente, estudios

demostraron que la acetilación de α -tubulina desempeña un papel importante en el transporte intracelular de vesículas y organelos. En particular, la pérdida de esta modificación disminuye la unión y la motilidad de la proteína motora kinesina-1, la cual presenta una mayor afinidad por los microtúbulos acetilados. En contraste, el aumento de la acetilación de α -tubulina inducido por la inhibición de HDAC6 favorece el reclutamiento de kinesina-1 y dineína, facilitando el transporte vesicular a lo largo de los microtúbulos. (T. Li et al., 2018)

Considerando que la maduración y el transporte del fagosoma dependen de una red funcional de microtúbulos, el aumento de la acetilación de α -tubulina observado tras el tratamiento con Nexturastat A podría favorecer estos procesos mediante un transporte vesicular más eficiente. Esto constituye un posible mecanismo que contribuiría al incremento de la capacidad de fagocitosis observado en los macrófagos M1 tratados con el inhibidor de HDAC6.

En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio aportan evidencia que respalda parcialmente la hipótesis planteada, sugiriendo que la inhibición de HDAC6 mediante Nexturastat A modula el eje HDAC6/STAT3 e influye en el estado de polarización de los macrófagos. En primer lugar, se confirmó que Nexturastat A inhibe la actividad de HDAC6, lo que se evidenció por el aumento de la acetilación de α -tubulina, acompañado de una disminución de la fosforilación de STAT3 sin alterar sus niveles totales. A nivel transcripcional, aunque los cambios en la expresión génica de marcadores de polarización no alcanzaron significancia estadística, se observaron tendencias consistentes con una disminución de la expresión de genes asociados al fenotipo M2 y un incremento de marcadores característicos del fenotipo M1. Estos hallazgos fueron complementados por los análisis de expresión proteica mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo, en los cuales se evidenció un aumento significativo de CD86 y una leve disminución de CD163 en macrófagos M2 tratados con Nexturastat A.

No obstante, debido a que algunos de los cambios observados fueron parciales y no siempre alcanzaron significancia estadística, estos resultados deben interpretarse como evidencia sugerente más que concluyente de un proceso de repolarización. En este contexto, los hallazgos son compatibles con una reprogramación parcial de los macrófagos M2 hacia un estado con características más proinflamatorias. Paralelamente, la inhibición de HDAC6 pareció potenciar algunas propiedades funcionales de los macrófagos M1, reflejadas principalmente en el incremento de la expresión de CD86 y en el aumento de su capacidad de fagocitosis. En conjunto, estos resultados sugieren que la inhibición de HDAC6 no solo podría limitar la adquisición o el mantenimiento del fenotipo inmunosupresor M2, sino también favorecer el fortalecimiento de funciones efectoras propias de los macrófagos M1. Estos hallazgos aportan antecedentes sobre el papel del eje HDAC6/STAT3 en la regulación de los macrófagos asociados al cáncer colorrectal y respaldan la necesidad de realizar estudios adicionales, tanto en modelos in vivo como en sistemas experimentales que reproduzcan de manera más fiel la complejidad del microambiente tumoral, con el fin de confirmar el alcance de esta repolarización y evaluar su potencial terapéutico.

Desde una perspectiva biológica, estos cambios podrían tener importantes implicancias en el microambiente tumoral. Los macrófagos M1 producen citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-12 e IL-6, presentan una mayor capacidad de fagocitosis y expresan altos niveles de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, favoreciendo la presentación antigénica y la activación de linfocitos T CD8+ citotóxicos. Asimismo, la secreción de IL-12 promueve la activación y citotoxicidad de células NK e induce respuestas inmunes tipo Th1, contribuyendo al establecimiento de un microambiente con mayor capacidad antitumoral. En contraste, los macrófagos M2 favorecen la angiogénesis, la remodelación de la matriz extracelular, la progresión tumoral y la inmunosupresión mediante la producción de IL-10, TGF- β y otros mediadores inmunosupresores. De esta manera, una estrategia terapéutica capaz de disminuir las características protumorales de los macrófagos M2 y, simultáneamente, potenciar las funciones efectoras de los macrófagos

M1, podría contribuir a restaurar la inmunovigilancia, favorecer el reclutamiento y la activación de células efectoras del sistema inmune, y, en consecuencia, mejorar la respuesta antitumoral.

Recientemente, el paradigma clásico de polarización M1/M2 ha sido replanteado gracias al desarrollo de tecnologías de secuenciación de ARN de célula única. Mulder et al. integraron 178.651 células del sistema fagocítico mononuclear provenientes de 41 estudios y 13 tejidos humanos, generando un atlas transcriptómico de monocitos y macrófagos en condiciones fisiológicas y patológicas. Este análisis reveló una marcada heterogeneidad de los macrófagos, identificando múltiples estados transcripcionales conservados entre distintos tejidos y tipos de cáncer, incluyendo diversas poblaciones de macrófagos asociados al tumor (TAMs). Asimismo, los autores demostraron que los diferentes estados de macrófagos presentan una expresión combinada de genes tradicionalmente asociados a los fenotipos M1 y M2, lo que pone de manifiesto que la clasificación binaria clásica resulta insuficiente para describir la complejidad funcional de estas células. Estos hallazgos tienen importantes implicancias para la interpretación de los resultados obtenidos en el presente estudio. En el microambiente tumoral los macrófagos están expuestos simultáneamente a citoquinas, factores de crecimiento, y señales derivadas de células tumorales capaces de activar programas transcripcionales parcialmente superpuestos. En consecuencia, la expresión concomitante de marcadores asociados a los fenotipos M1 y M2 observada en este trabajo podría reflejar una reprogramación parcial del estado funcional de los macrófagos, más que una transición completa entre dos estados opuestos. Asimismo, esta complejidad biológica representa una limitación inherente de los modelos *in vitro* basados exclusivamente en la polarización con LPS/IFN- γ o IL-4/IL-13, los cuales reproducen únicamente una fracción de la diversidad de estímulos presente en los TAMs *in vivo*. (Mulder et al., 2021)

Una de las limitaciones de este estudio corresponde a la posibilidad de que la inhibición de HDAC6 genere efectos adicionales más allá del eje HDAC6/STAT3, el principal mecanismo evaluado en esta investigación. Este aspecto debe considerarse al interpretar los resultados, ya que HDAC6 es una desacetilasa con múltiples blancos citoplasmático, por lo que su inhibición puede afectar diversos procesos celulares. En consecuencia, los efectos observados podrían no depender exclusivamente de la modulación de STAT3, sino también de la regulación de otras vías de señalización que, dependiendo del contexto biológico, podrían potenciar el efecto antitumoral o, por el contrario, favorecer mecanismos asociados a la progresión tumoral. En este contexto, Mardones et al. (2023) evaluaron el efecto de la inhibición de HDAC6 en células de cáncer colorrectal y observaron una disminución de la expresión de PD-L1 tanto a nivel transcripcional como proteico. Este hallazgo podría favorecer la respuesta antitumoral al reducir la señal inhibitoria ejercida sobre los linfocitos T citotóxicos (CD8+), promoviendo su activación y función efectora. Como consecuencia, podría generar un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias, como IFN- γ y TNF- α , lo que contribuiría indirectamente a favorecer la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M1 y reforzar un microambiente tumoral con características más inmunoestimuladoras, en este caso el tratamiento de inhibición de HDAC6 favorecería el efecto antitumoral. Otro mecanismo mediante el cual HDAC6 podría influir en la progresión tumoral corresponde a la regulación del efecto Warburg. A diferencia de las células normales, las células tumorales obtienen gran parte de su energía a través de la glucólisis aeróbica, incluso en presencia de oxígeno, proceso que favorece el crecimiento tumoral y contribuye a la remodelación del microambiente tumoral. Esta reprogramación metabólica se encuentra regulada, en gran medida, por el factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α), un factor de transcripción que promueve la expresión de genes involucrados en la captación de glucosa y el metabolismo glucolítico. En este contexto, se ha descrito que HDAC6 puede participar en la regulación de HIF-1 α mediante mecanismos dependientes de su actividad desacetilasa, favoreciendo su estabilidad y actividad transcripcional. En consecuencia, la inhibición de HDAC6 podría reducir la actividad de HIF-1 α y limitar la expresión de genes asociados a la glucólisis aeróbica, afectando potencialmente la adaptación metabólica característica de las células tumorales. (Huo et

al., 2025) Otro estudio relacionó la actividad de HDAC6 en células de cáncer colorrectal con la polarización de macrófagos a través de la modulación del microambiente tumoral. Los autores demostraron que HDAC6 favorece la liberación del receptor soluble de IL-6 (sIL-6R) mediante la activación de ADAM17, potenciando la trans-señalización de IL-6, mecanismo que promueve la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 inmunosupresor. Estos resultados sugieren que HDAC6 no solo regula procesos intrínsecos de las células tumorales, sino que también participa en la comunicación entre las células tumorales y los macrófagos dentro del microambiente tumoral. (G. Xu et al., 2022)

Es importante señalar que los estudios mencionados anteriormente no evalúan directamente la inhibición de HDAC6 en macrófagos, sino que analizan sus efectos en otros componentes del microambiente tumoral. Sin embargo, considerando la interacción constante entre células tumorales y células inmunes, es posible hipotetizar que la inhibición de HDAC6 en ambos componentes podría generar efectos sinérgicos sobre el estado de inmunovigilancia del microambiente tumoral. Esta posibilidad representa una hipótesis que requiere ser evaluada mediante modelos experimentales que integren simultáneamente células tumorales y células inmunes.

Aun así, los hallazgos obtenidos en este estudio son consistentes con la evidencia disponible que posiciona a HDAC6 como un regulador clave de la polarización de macrófagos y como un potencial blanco terapéutico para la modulación del microambiente tumoral. En los últimos años, diversos estudios han evaluado el efecto de inhibidores selectivos de HDAC6 en distintos modelos de cáncer, observando resultados concordantes con un cambio hacia un perfil inmunológico más antitumoral. Knox et al., (2019) utilizaron Nexturastat A en modelos de melanoma murinos, resultando en una reducción en la presencia de macrófagos M2 en el TME y reducción de citoquinas antiinflamatorias, en otro experimento utilizando macrófagos peritoneales murinos, además de observar una disminución en la polarización M2, pudieron observar un aumento en la polarización de macrófagos M1 al ser tratados con citoquinas proinflamatorias sumado a Nexturastat A (Knox et al., 2019) Por otra parte García-Hernandez et al, 2023 estudiaron el efecto de Nexturastat A en el eje CD47/SIRP α , en macrófagos derivados de médula ósea y células THP-1, en este estudio observaron un aumento de macrófagos M1, y reducción de la polarización M2, además de un aumento en la fagocitosis debido a la disminución de SIRP α (García-Hernandez et al., 2024) En un estudio de 2024, los autores reprogramaron ex vivo en macrófagos derivados de médula ósea con inhibidores de HDAC6 y luego los implantaron en modelos murinos y humanizados de melanoma; el resultado fue resistencia a la repolarización hacia M2, aumento de la relación M1/M2. (Noonepalle et al., 2024) Estos antecedentes respaldan la hipótesis de que la inhibición selectiva de HDAC6 constituye una estrategia capaz de modular el estado funcional de los macrófagos asociados al tumor, favoreciendo un microambiente con características más inmunoestimuladoras. Si bien los modelos experimentales y los tipos de cáncer utilizados difieren del presente estudio, las tendencias observadas son concordantes con nuestros resultados.

A pesar del potencial terapéutico observado, la aplicación clínica de inhibidores de HDAC6 enfrenta desafíos relacionados con la distribución del fármaco y la posibilidad de efectos fuera del blanco terapéutico (off-target). En este sentido, el desarrollo de estrategias de liberación dirigida representa una alternativa atractiva para favorecer la acumulación del inhibidor en el microambiente tumoral, reduciendo la exposición de tejidos sanos y los posibles efectos adversos. Recientemente se han desarrollado diversos sistemas de administración dirigidos a macrófagos asociados al tumor (TAMs), basados en nanopartículas con ligandos capaces de unirse a receptores expresados preferentemente por estas células. Estas nanopartículas pueden emplearse para transportar diferentes moléculas terapéuticas, incluyendo microARN, inhibidores de HDAC y otros agentes inmunomoduladores, permitiendo una liberación específica dentro del microambiente tumoral (Shi & Gu, 2021) Asimismo, se han incorporado estrategias que buscan imitar estructuras biológicas, como el recubrimiento de las nanopartículas con membranas de eritrocitos, lo que permite prolongar su tiempo de

circulación, disminuir su reconocimiento por el sistema inmunitario y mejorar su acumulación en el tejido tumoral (He et al., 2026). Por otra parte, también se han explorado estrategias de terapia celular, consistentes en el aislamiento de monocitos o macrófagos autólogos, su polarización ex vivo hacia un fenotipo M1 y su posterior transferencia adoptiva al paciente. Un nuevo enfoque destaca por el desarrollo de las denominadas "mochilas celulares" (cellular backpacks), micropartículas resistentes a la fagocitosis que se anclan a la membrana de los macrófagos y liberan de forma sostenida citoquinas como IFN- γ u otros agentes inmunoestimuladores, promoviendo el mantenimiento del fenotipo M1 (Na et al., 2023; Shields et al., 2020). En conjunto, estos avances ponen de manifiesto que la combinación de inhibidores epigenéticos con sistemas de liberación dirigida o plataformas de ingeniería celular podría aumentar significativamente la eficacia terapéutica, favoreciendo la repolarización de los macrófagos asociados al tumor y minimizando los efectos adversos derivados de la administración sistémica.

Bajo esta perspectiva, estos avances constituyen una base prometedora para futuras investigaciones. En caso de que estudios posteriores confirmen de manera más robusta la capacidad de Nexturastat A como inhibidor de HDAC6 para modular la polarización de los macrófagos asociados al CCR, la combinación de este inhibidor con sistemas de liberación dirigida podría representar una estrategia prometedora, pues la incorporación de estas tecnologías permitiría optimizar la entrega del fármaco al microambiente tumoral, favoreciendo la repolarización de los macrófagos y minimizando los efectos adversos que puedan surgir de la administración sistémica del fármaco.

En síntesis, este estudio aporta nueva evidencia sobre el papel del eje HDAC6/STAT3 en la regulación de la plasticidad de los macrófagos asociados al cáncer colorrectal y sugiere que la inhibición selectiva de HDAC6 podría constituir una estrategia terapéutica promisoriosa para modular el microambiente tumoral, favoreciendo una respuesta inmune con mayor potencial antitumoral.

XII. Referencias:

- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, caac.21834.
<https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K. B., & Dockrell, D. H. (2010). The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS ONE*, 5(1), e8668.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008668>
- Gargalionis, A. N., Papavassiliou, K. A., & Papavassiliou, A. G. (2021). Targeting STAT3 Signaling Pathway in Colorectal Cancer. *Biomedicines*, 9(8), 1016.
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9081016>
- Gracia-Hernandez, M., Yende, A. S., Gajendran, N., Alahmadi, Z., Li, X., Munoz, Z., Tan, K., Noonepalle, S., Shibata, M., & Villagra, A. (2024). Targeting HDAC6 improves anti-CD47 immunotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 43(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s13046-024-02982-4>
- Gupta, S. (2022). Screening for Colorectal Cancer. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 36(3), 393–414. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2022.02.001>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46.
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- He, M., Peng, Q., Yang, Q., Guan, X., Liu, Q., Chen, R., Zhou, D., Wang, L., Zhang, Y., Li, S., Su, J., & Zhang, L. (2026). In situ reprogramming of tumor associated macrophages with versatile nano-epigenetic inhibitor for lung cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 390, 114497.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2025.114497>
- Hossain, Md. S., Karuniawati, H., Jairoun, A. A., Urbi, Z., Ooi, D. J., John, A., Lim, Y. C., Kibria, K. M. K., Mohiuddin, A. K. M., Ming, L. C., Goh, K. W., & Hadi, M. A. (2022). Colorectal Cancer: A

- Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers*, 14(7), 1732. <https://doi.org/10.3390/cancers14071732>
- Hozaka, Y., Kita, Y., Yasudome, R., Tanaka, T., Wada, M., Idichi, T., Tanabe, K., Asai, S., Moriya, S., Toda, H., Mori, S., Kurahara, H., Ohtsuka, T., & Seki, N. (2021). RNA-Sequencing Based microRNA Expression Signature of Colorectal Cancer: The Impact of Oncogenic Targets Regulated by miR-490-3p. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9876. <https://doi.org/10.3390/ijms22189876>
- Huang, F., Wang, Y., Shao, Y., Zhang, R., Li, M., Liu, L., & Zhao, Q. (2024). M2 Macrophage Classification of Colorectal Cancer Reveals Intrinsic Connections with Metabolism Reprogramming and Clinical Characteristics. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine, Volume 17*, 383–399. <https://doi.org/10.2147/PGPM.S458798>
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.-F., & Yao, T.-P. (2002). HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 417(6887), 455–458. <https://doi.org/10.1038/417455a>
- Huo, R., Li, W., Wu, H., He, K., Wang, H., Zhang, S., Jiang, S.-H., Li, R., & Xue, J. (2025). Transcription factor ONECUT3 regulates HDAC6/HIF-1 α activity to promote the Warburg effect and tumor growth in colorectal cancer. *Cell Death & Disease*, 16(1), 149. <https://doi.org/10.1038/s41419-025-07457-8>
- Islam, M. S., Gopalan, V., Lam, A. K., & Shiddiky, M. J. A. (2023). Current advances in detecting genetic and epigenetic biomarkers of colorectal cancer. *Biosensors and Bioelectronics*, 239, 115611. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2023.115611>
- Kakumoto, K., Ikeda, J., Okada, M., Morii, E., & Oneyama, C. (2015). mLST8 Promotes mTOR-Mediated Tumor Progression. *PLOS ONE*, 10(4), e0119015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119015>
- Kather, J. N., & Halama, N. (2019). Harnessing the innate immune system and local immunological microenvironment to treat colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 120(9), 871–882. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0441-6>

- Kim, K. M., Hwang, N.-H., Hyun, J.-S., & Shin, D. (2024). Recent Advances in IRAK1: Pharmacological and Therapeutic Aspects. *Molecules*, 29(10), 2226. <https://doi.org/10.3390/molecules29102226>
- Knox, T., Sahakian, E., Banik, D., Hadley, M., Palmer, E., Noonepalle, S., Kim, J., Powers, J., Gracia-Hernandez, M., Oliveira, V., Cheng, F., Chen, J., Barinka, C., Pinilla-Ibarz, J., Lee, N. H., Kozikowski, A., & Villagra, A. (2019). Selective HDAC6 inhibitors improve anti-PD-1 immune checkpoint blockade therapy by decreasing the anti-inflammatory phenotype of macrophages and down-regulation of immunosuppressive proteins in tumor cells. *Scientific Reports*, 9(1), 6136. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42237-3>
- Komohara, Y. (2011). Oleanolic acid inhibits macrophage differentiation into the M2 phenotype and glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of STAT3. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1454>
- Komohara, Y., Jinushi, M., & Takeya, M. (2014). Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Science*, 105(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/cas.12314>
- Kovalovsky, D., Noonepalle, S., Suresh, M., Kumar, D., Berrigan, M., Gajendran, N., Upadhyay, S., Horvath, A., Kim, A., Quiceno-Torres, D., Musunuri, K., & Villagra, A. (2024). The HDAC6 inhibitor AVS100 (SS208) induces a pro-inflammatory tumor microenvironment and potentiates immunotherapy. *Science Advances*, 10(46), eadp3687. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adp3687>
- Li, J., Li, L., Li, Y., Long, Y., Zhao, Q., Ouyang, Y., Bao, W., & Gong, K. (2020). Tumor-associated macrophage infiltration and prognosis in colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. *International Journal of Colorectal Disease*, 35(7), 1203–1210. <https://doi.org/10.1007/s00384-020-03593-z>
- Li, T., Zhang, C., Hassan, S., Liu, X., Song, F., Chen, K., Zhang, W., & Yang, J. (2018). Histone deacetylase 6 in cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0654-9>
- Liu, L., Stokes, J. V., Tan, W., & Pruett, S. B. (2022). An optimized flow cytometry panel for classifying macrophage polarization. *Journal of Immunological Methods*, 511, 113378. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2022.113378>

- Liu, T., Huang, T., Li, J., Li, A., Li, C., Huang, X., Li, D., Wang, S., & Liang, M. (2023). Optimization of differentiation and transcriptomic profile of THP-1 cells into macrophage by PMA. *PLOS ONE*, *18*(7), e0286056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286056>
- Liu, Y., Liang, J., Li, X., Huang, J., Huang, J., & Wang, J. (2024). Interferon-induced transmembrane protein 2 is a prognostic marker in colorectal cancer and promotes its progression by activating the PI3K/AKT pathway. *Discover Oncology*, *15*(1), 191. <https://doi.org/10.1007/s12672-024-01040-x>
- Liu, Y., Wang, Y., Yang, Y., Weng, L., Wu, Q., Zhang, J., Zhao, P., Fang, L., Shi, Y., & Wang, P. (2023). Emerging phagocytosis checkpoints in cancer immunotherapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*(1), 104. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01365-z>
- Majid, U., Bergsland, C. H., Sveen, A., Bruun, J., Eilertsen, I. A., Bækkevold, E. S., Nesbakken, A., Yaqub, S., Jahnsen, F. L., & Lothe, R. A. (2024). The prognostic effect of tumor-associated macrophages in stage I-III colorectal cancer depends on T cell infiltration. *Cellular Oncology*, *47*(4), 1267–1276. <https://doi.org/10.1007/s13402-024-00926-w>
- Mardones, C., Navarrete-Munoz, C., Armijo, M., Salgado, K., Rivas-Valdes, F., Gonzalez-Pecchi, V., Farkas, C., Villagra, A., & Hepp, M. (2023). Role of HDAC6-STAT3 in immunomodulatory pathways in Colorectal cancer cells. *Molecular Immunology*, *164*, 98–111. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2023.11.007>
- Melton, D. W., McManus, L. M., Gelfond, J. A. L., & Shireman, P. K. (2015). Temporal phenotypic features distinguish polarized macrophages *in vitro*. *Autoimmunity*, *48*(3), 161–176. <https://doi.org/10.3109/08916934.2015.1027816>
- Mondschein, S., Subiabre, F., Yankovic, N., Estay, C., Von Mühlenbrock, C., & Berger, Z. (2022). Colorectal cancer trends in Chile: A Latin-American country with marked socioeconomic inequities. *PLOS ONE*, *17*(11), e0271929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0271929>
- Mulder, K., Patel, A. A., Kong, W. T., Piot, C., Halitzki, E., Dunsmore, G., Khalilnezhad, S., Irac, S. E., Dubuisson, A., Chevrier, M., Zhang, X. M., Tam, J. K. C., Lim, T. K. H., Wong, R. M. M., Pai, R., Khalil, A. I. S., Chow, P. K. H., Wu, S. Z., Al-Eryani, G., ... Ginhoux, F. (2021). Cross-tissue

- single-cell landscape of human monocytes and macrophages in health and disease. *Immunity*, 54(8), 1883-1900.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.07.007>
- Na, Y. R., Kim, S. W., & Seok, S. H. (2023). A new era of macrophage-based cell therapy. *Experimental & Molecular Medicine*, 55(9), 1945–1954. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01068-z>
- Noonepalle, S. K. R., Gracia-Hernandez, M., Aghdam, N., Berrigan, M., Coulibaly, H., Li, X., Zevallos-Delgado, C., Pletcher, A., Weselman, B., Palmer, E., Knox, T., Sotomayor, E., Chiappinelli, K. B., Wardrop, D., Horvath, A., Shook, B. A., Lee, N., Dritschilo, A., Fernandes, R., ... Villagra, A. (2024). Cell therapy using ex vivo reprogrammed macrophages enhances antitumor immune responses in melanoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 43(1), 263. <https://doi.org/10.1186/s13046-024-03182-w>
- Pierantoni, C., Cosentino, L., & Ricciardiello, L. (2024). Molecular Pathways of Colorectal Cancer Development: Mechanisms of Action and Evolution of Main Systemic Therapy Compunds. *Digestive Diseases*, 42(4), 319–324. <https://doi.org/10.1159/000538511>
- Pinto, M. L., Rios, E., Durães, C., Ribeiro, R., Machado, J. C., Mantovani, A., Barbosa, M. A., Carneiro, F., & Oliveira, M. J. (2019). The Two Faces of Tumor-Associated Macrophages and Their Clinical Significance in Colorectal Cancer. *Frontiers in Immunology*, 10, 1875. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01875>
- Ren, H., Su, Z., Yang, J., Cao, J., Zhang, Y., Sheng, K., Guo, K., & Wang, Y. (2025). High Expression Level of TRIP6 is Correlated with Poor Prognosis in Colorectal Cancer and Promotes Tumor Cell Proliferation and Migration. *Biochemical Genetics*, 63(1), 261–280. <https://doi.org/10.1007/s10528-024-10711-x>
- Shi, L., & Gu, H. (2021). Emerging Nanoparticle Strategies for Modulating Tumor-Associated Macrophage Polarization. *Biomolecules*, 11(12), 1912. <https://doi.org/10.3390/biom11121912>
- Shields, C. W., Evans, M. A., Wang, L. L.-W., Baugh, N., Iyer, S., Wu, D., Zhao, Z., Pusuluri, A., Ukidve, A., Pan, D. C., & Mitragotri, S. (2020). Cellular backpacks for macrophage immunotherapy. *Science Advances*, 6(18), eaaz6579. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz6579>

- Shin, H. C., Seo, I., Jeong, H., Byun, S. J., Kim, S., Bae, S. U., Kwon, S. Y., & Lee, H. W. (2021). Prognostic Impact of Tumor-Associated Macrophages on Long-Term Oncologic Outcomes in Colorectal Cancer. *Life*, 11(11), 1240. <https://doi.org/10.3390/life11111240>
- Shiratori, H., Feinweber, C., Luckhardt, S., Linke, B., Resch, E., Geisslinger, G., Weigert, A., & Parnham, M. J. (2017). THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. *Molecular Immunology*, 88, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.05.027>
- Slattery, M. L., Lundgreen, A., & Wolff, R. K. (2012). MAP kinase genes and colon and rectal cancer. *Carcinogenesis*, 33(12), 2398–2408. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs305>
- Su, C., Sun, Q., Liu, S., Wang, H., Feng, L., & Cao, Y. (2019). Targeting p38 γ to inhibit human colorectal cancer cell progression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 517(1), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.07.038>
- Tang, J., Ming, L., Qin, F., Qin, Y., Wang, D., Huang, L., Cao, Y., Huang, Z., & Yin, Y. (2024). The heterogeneity of tumour-associated macrophages contributes to the clinical outcomes and indications for immune checkpoint blockade in colorectal cancer patients. *Immunobiology*, 229(3), 152805. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2024.152805>
- Tedesco, S., De Majo, F., Kim, J., Trenti, A., Trevisi, L., Fadini, G. P., Bolego, C., Zandstra, P. W., Cignarella, A., & Vitiello, L. (2018). Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? *Frontiers in Pharmacology*, 9, 71. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00071>
- Testa, U., Pelosi, E., & Castelli, G. (2018). Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Medical Sciences*, 6(2), 31. <https://doi.org/10.3390/medsci6020031>
- Tugal, D., Liao, X., & Jain, M. K. (2013). Transcriptional Control of Macrophage Polarization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(6), 1135–1144. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301453>

- Unuvar Purcu, D., Korkmaz, A., Gunalp, S., Helvaci, D. G., Erdal, Y., Dogan, Y., Suner, A., Wingender, G., & Sag, D. (2022). Effect of stimulation time on the expression of human macrophage polarization markers. *PLOS ONE*, 17(3), e0265196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265196>
- Väyrynen, J. P., Haruki, K., Lau, M. C., Väyrynen, S. A., Zhong, R., Dias Costa, A., Borowsky, J., Zhao, M., Fujiyoshi, K., Arima, K., Twombly, T. S., Kishikawa, J., Gu, S., Aminmozaffari, S., Shi, S., Baba, Y., Akimoto, N., Ugai, T., Da Silva, A., ... Nowak, J. A. (2021). The Prognostic Role of Macrophage Polarization in the Colorectal Cancer Microenvironment. *Cancer Immunology Research*, 9(1), 8–19. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-20-0527>
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science*, 339(6127), 1546–1558. <https://doi.org/10.1126/science.1235122>
- Vuletić, A., Mirjačić Martinović, K., & Spasić, J. (2023). Role of Histone Deacetylase 6 and Histone Deacetylase 6 Inhibition in Colorectal Cancer. *Pharmaceutics*, 16(1), 54. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16010054>
- Wang, H., Tian, T., & Zhang, J. (2021). Tumor-Associated Macrophages (TAMs) in Colorectal Cancer (CRC): From Mechanism to Therapy and Prognosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8470. <https://doi.org/10.3390/ijms22168470>
- Wang, Y., Shen, Y., Wang, S., Shen, Q., & Zhou, X. (2018). The role of STAT3 in leading the crosstalk between human cancers and the immune system. *Cancer Letters*, 415, 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.12.003>
- Xia, T., Zhang, M., Lei, W., Yang, R., Fu, S., Fan, Z., Yang, Y., & Zhang, T. (2023). Advances in the role of STAT3 in macrophage polarization. *Frontiers in Immunology*, 14, 1160719. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1160719>
- Xiang, J., Wang, J., Xiao, H., Huang, C., Wu, C., Zhang, L., Qian, C., & Xiang, D. (2025). Targeting tumor-associated macrophages in colon cancer: Mechanisms and therapeutic strategies. *Frontiers in Immunology*, 16, 1573917. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1573917>

- Xu, G., Niu, L., Wang, Y., Yang, G., Zhu, X., Yao, Y., Zhao, G., Wang, S., & Li, H. (2022). HDAC6-dependent deacetylation of TAK1 enhances sIL-6R release to promote macrophage M2 polarization in colon cancer. *Cell Death & Disease*, 13(10), 888. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05335-1>
- Xu, J., Ding, L., Mei, J., Hu, Y., Kong, X., Dai, S., Bu, T., Xiao, Q., & Ding, K. (2025). Dual roles and therapeutic targeting of tumor-associated macrophages in tumor microenvironments. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 10(1), 268. <https://doi.org/10.1038/s41392-025-02325-5>
- Yahaya, M. A. F., Lila, M. A. M., Ismail, S., Zainol, M., & Afizan, N. A. R. N. M. (2019). Tumour-Associated Macrophages (TAMs) in Colon Cancer and How to Reeducate Them. *Journal of Immunology Research*, 2019, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/2368249>
- Yang, Z., Zhang, M., Peng, R., Liu, J., Wang, F., Li, Y., Zhao, Q., & Liu, J. (2020). The prognostic and clinicopathological value of tumor-associated macrophages in patients with colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Colorectal Disease*, 35(9), 1651–1661. <https://doi.org/10.1007/s00384-020-03686-9>
- Yin, N., Qi, X., Tsai, S., Lu, Y., Basir, Z., Oshima, K., Thomas, J. P., Myers, C. R., Stoner, G., & Chen, G. (2016). P38 γ MAPK is required for inflammation-associated colon tumorigenesis. *Oncogene*, 35(8), 1039–1048. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.158>
- Zhang, F., Ye, J., Guo, W., Zhang, F., Wang, L., & Han, A. (2022). TYMS-TM4SF4 axis promotes the progression of colorectal cancer by EMT and upregulating stem cell marker. *American Journal of Cancer Research*, 12(3), 1009–1026.
- Zhao, Y., Ge, X., Xu, X., Yu, S., Wang, J., & Sun, L. (2019). Prognostic value and clinicopathological roles of phenotypes of tumour-associated macrophages in colorectal cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145(12), 3005–3019. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-03041-8>
- Zhong, X., Chen, B., & Yang, Z. (2018). The Role of Tumor-Associated Macrophages in Colorectal Carcinoma Progression. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(1), 356–365. <https://doi.org/10.1159/000486816>

