



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**MODELOS MATEMÁTICOS DE LA REGULACIÓN INMUNOLÓGICA Y METABÓLICA EN  
MACRÓFAGOS Y SU FUNCIÓN EN CÁNCER DE MAMA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. AVILA PONCE DE LEÓN UGO ENRIQUE**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:**

**DR. OSBALDO RESENDIS ANTONIO**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
**DR. PABLO PADILLA LONGORIA**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**MODELOS MATEMÁTICOS DE LA REGULACIÓN INMUNOLÓGICA Y METABÓLICA EN  
MACRÓFAGOS Y SU FUNCIÓN EN CÁNCER DE MAMA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. AVILA PONCE DE LEÓN UGO ENRIQUE**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:**

**DR. OSBALDO RESENDIS ANTONIO**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
**DR. PABLO PADILLA LONGORIA**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/102/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **5 de septiembre de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **AVILA PONCE DE LEÓN UGO ENRIQUE** con número de cuenta **517007734** con la tesis titulada **“MODELOS MATEMÁTICOS DE LA REGULACIÓN INMUNOLÓGICA Y METABÓLICA EN MACRÓFAGOS Y SU FUNCIÓN EN CÁNCER DE MAMA”**, realizada bajo la dirección del **DR. OSBALDO RESENDIS ANTONIO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. PEDRO EDUARDO MIRAMONTES VIDAL  
Vocal: DR. JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO  
Vocal: DR. LUIS ANTONIO MENDOZA SIERRA  
Vocal: DRA. ELISA DOMÍNGUEZ HÜTTINGER  
Secretario: DR. PABLO PADILLA LONGORIA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 23 de enero de 2023

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **Agradecimientos Institucionales**

A la UNAM, por haberme apoyado en mi desarrollo como científico ofreciéndome siempre a los mejores profesores con excelente calidad. Mi estancia en la máxima casa de estudios de México ha nutrido mi calidad en la parte académica y personal. De manera especial, al Posgrado en Ciencias Biológicas por brindarme las herramientas para poder crecer profesionalmente. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme apoyado y brindado la beca con el número de CVU: 774988.

Este trabajo fue totalmente computacional y se realizó bajo la tutoría del Dr. Osbaldo Resendis Antonio en el Laboratorio de Biología de Sistemas Humano. Agradezco al Dr. Osbaldo Resendis por haberme aceptado como su estudiante a pesar de no conocerme por la situación atípica que me sucedió al iniciar esta travesía. A mi comité tutorial, a la Doctora Rosana Pelayo Camacho le agradezco sus comentarios y guía en la discusión durante mi estudio de postgrado. Las discusiones de carácter biológico me han ayudado y mejorado como científico teórico, al igual me han brindado la capacidad de desarrollar modelos matemáticos para poder aplicarlos a fenómenos biológicos de manera más objetiva. Al Doctor Pablo Padilla Longoria le agradezco sus comentarios de carácter matemático y teórico que han ayudado a consolidar este trabajo y las predicciones. En general agradezco a todo mi comité doctoral, espero algún día poder ser un excelente científico y académico como bien ustedes me han enseñado todo este tiempo.

## **Agradecimientos**

De manera personal quisiera agradecer a personas que me han acompañado durante todo este camino tortuoso llamado Doctor en Ciencias Biológicas. A mi familia quienes siempre me apoyaron y alentaron a poder aspirar hacer lo que más me gusta, ser investigador. A mis papás Eric y Olga siempre estaré eternamente agradecido con ustedes por la calidad de vida y apoyarme a ser un excelente científico y además persona. Siempre estaré agradecido con ustedes por mostrarme como debo ser como persona y científico, ser empático y servir a la sociedad. Espero algún día cumplir y poder ser igual de genial como son ustedes. Son los mejores papás del mundo, los quiero. A mis hermanos Eric y Marco, sin ustedes mi vida sería mejor. No es cierto jeje, a pesar que los últimos años hemos estado a la distancia les agradezco las risas y el apoyo no solo en mis estudios si no en toda mi vida. Por siempre serán mis compañeros de vida y espero algún poder ser un gramo de lo que son ustedes como personas y académicos, siempre los he admirado y lo voy a seguir haciendo toda mi vida. Los quiero titas. Esta tesis se la dedico a ustedes.

En general agradezco a toda la familia Ponce de León por estar pendiente de mi por cualquier cosa, los cuidados y las consideraciones.. En particular a la familia Hernández Ponce de León, a mis tíos Lupe y Flavio, por siempre estaré agradecido por su cuidado y atención durante toda mi estancia en la Ciudad de México. Volvieron muy fácil la transición de Mérida a la CDMX, cualquier cosa que necesiten siempre contarán con mi apoyo. A mis primos Flavio y Sebastián, gracias por las risas y el relajo que siempre teníamos cada fin de semana, esos días me servían de mucho des estrés. Al igual por acompañarme a los partidos de futbol sin dudarlos y las retas de FIFA perdón por ganarles siempre y por goleada. Cualquier situación nunca duden en contactarme, ahí estaré por ustedes. A mi primo Andrés, gracias por el relajo y las risas.

A mis amigos de toda la vida, con los que crecí, mis hermanos de otra madres. Jorge alias Doch, Miguel, Beto, Alejandro, Gael, mi casi tocayo Huguito, Arturo, Juan, Yoyín y Erick, gracias por la compañía toda mi vida, por el relajo, las risas y la continua motivación (aunque jamás entendieron que hacía). Por siempre serán mis hermanos, los quiero.

A mis amigos y colegas de la Facultad, Jesús, Gerardo, Iván, Nuri les agradezco las risas y relajo durante los 4 años de licenciatura y la continua motivación durante mi posgrado. Ustedes son los mejores biólogos (por ustedes sí lo son) que he conocido, espero algún día ser como ustedes.

A mis compañeros de laboratorio, mi segunda familia. Erick, Meztli, Jorge y Felipe. Les agradezco su compañía durante todo mi posgrado, volvieron más ameno el mudarme a una ciudad nueva sin conocer a nadie. Por siempre estaré agradecido con ustedes por la continua motivación y risas que tuvimos durante nuestro camino como científicos. Erick y Meztli siempre estaré agradecido con ustedes por apoyarme en proyectos locos, ya tenemos dos papers juntos (y uno en espera), espero cuando cada uno sea PI o Erick secretario de Salud poder publicar otro artículo juntos. Ustedes jamás duden mi apoyo incondicional ya sea académico o personal. A mis amigos del INMEGEN, en especial Gaby y Araceli. Gracias por siempre comer conmigo todos los días y esa media hora donde siempre nos reíamos con todos los del lab. A pesar de que no son de mi lab, ustedes igual forman parte de mi segunda familia, cualquier situación que necesiten aquí estaré por ustedes. Un agradecimiento especial al Doctor Aarón Vázquez Jiménez, gracias por toda la ayuda técnica en lo computacional y estar ahí con el proyecto de COVID, sabías lo importante que era ese paper para mí. Esta tesis no se pudo completar sin tu ayuda, por siempre agradecido por tu apoyo y motivación desde que inicié mi doctorado. Cualquier cosa que necesites ya sea académico o personal no dudes en contactarme.

Al Doctor Eduardo Garcia Zepeda, esta tesis es para usted. Jamás entendí porque me aceptó en el posgrado, todos me cerraron la puerta y usted fue el único que me la abrió sin conocerme. Lamentablemente solo lo conocí una vez, pero siempre estaré agradecido con usted por haberme aceptado, este tema y mi desarrollo como científico no pudo ser posible sin usted. Donde quiera que esté, muchas gracias. A la Doctora Gloria Soldevila Melgarejo, les agradezco por siempre su atención. Sin conocerme me ayudó a encontrar mi nicho en el posgrado y estuvo ahí presente en mi examen de maestría. Por siempre estaré agradecido con usted por sus comentarios críticos sobre inmunología en especial del macrófago, me forjaron y me mantuvieron en el piso. Muchas gracias por todo, esta tesis es para usted igual.

A los Gamboa y los Fiesco, les agradezco su apoyo por todo. A la familia Gamboa Fiesco gracias por todo. Al Doctor Rafael Gamboa y la Enfermera Ana María Fiesco, les agradezco por toda su compañía durante todo mi posgrado, las recomendaciones de cómo lidiar con el estrés. Cualquier cosa que necesite ahí estaré por ustedes. Ana María Fiesco, en particular le agradezco todo, por siempre escucharme y estar ahí cuando no entendía algunos conceptos médicos. Por su enseñanza a la paciencia y a cómo ayudar a las personas sin dudarle como usted me lo demostró. A mis cunadas Kenia y María José, gracias por todo, por estar pendiente de mí. De



ayudarme a cómo lidiar mi estrés, a las risas, a las noches de bolos con todos, el relajo y el chisme. Cualquier cosa que necesiten ahí estaré para ustedes, nunca lo duden. A Luisa, gracias por todo, siempre estaré eternamente agradecido contigo, siempre estabas pendiente de mí. Por las risas y el chisme de vez en vez. No dudes, ahí estaré por cualquier cosa.

A Karen Gamboa Fiesco, contigo me faltan palabras para agradecerte, incluso una tesis. Gracias por siempre mantenerme en el piso, por ser el ancla y volverme a la realidad de mi mundo teórico. Esta tesis te la dedico, por apoyarme todos los días y las noches a pesar de la distancia, de estar ahí y siempre estar pendiente de mí. Por escuchar mis quejas y las noches donde simplemente no salían las cosas cuando programaba, por apoyarme en mis proyectos nuevos y por siempre ser mi acompañante. De estudiar conmigo virtual, de comer o cenar, a pesar de estar en estados distintos nunca me sentí solo, siempre estabas ahí. Gracias por hacer mi posgrado más ameno, ser mi mejor amiga, mi mors, te amo.

Pica! Canario, Pica!

La Biología sin matemáticas, simplemente es historia natural. Con matemáticas se convirtió en una ciencia. Lo leí por ahí

Esta tesis se la dedico a mis papás: Olga y Eric, a mis hermanos: Eric y Marco y a mi esposa: Karen: Gracias por su apoyo incondicional y la paciencia.

Ugo

# Índice

Índice de figuras

Índice de tablas

Resumen .....	1
Abstract .....	4
1. Introducción .....	8
2. Antecedentes.....	10
3. Hipótesis.....	21
4. Objetivos.....	21
5. Metodología.....	23
5. 2. Simulación Continua de la red de polarización del macrófago.....	27
6. Resultados.....	32
6.2 Una breve historia de la polarización de macrófagos en un microambiente tumoral: un enfoque de red continua, combinaciones de citocinas y polarización parcial.....	60
6.3 Atractores cíclicos como reservorios teóricos cuando están perturbados: un enfoque de polarización de macrófagos en un microambiente tumoral. ....	85
6.4 Diferenciación Metabólica en la Polarización del Macrófago: Un análisis estadístico y de enriquecimiento.....	92
7 Discusión.....	110
8 Conclusiones.....	115
9 Referencias Bibliográficas .....	116
10. Anexos.....	138
10.1 Anexo A: Material Suplementario de la tesis .....	138
10.2 Anexo B: Artículo requisito para la obtención del grado.....	161
10.3 Anexo C: Artículos publicados y derivados del proyecto doctoral.....	178

# Índice de figuras

Figura 1. Las señales ambientales dictan el comportamiento de las poblaciones de macrófagos. HMBG1 (Grupo 1 de alta movilidad). Las citocinas, las señales de peligro y las consecuencias metabólicas son factores importantes que modifican los factores moleculares en los macrófagos. ....	14
Figura 2. Red reguladora de genes de polarización de macrófagos en un microambiente tumoral. Los círculos verdes representan componentes del espacio extracelular y los círculos azules representan los componentes de la maquinaria interna. Las flechas verdes continuas representan la activación y las flechas rojas discontinuas representan la inhibición.....	35
Figura 3. Grupos de atractores de tamaño único obtenidos en las simulaciones booleanas. Cada círculo representa una proyección dimensional de un atractor, y el color representa una colección de atractores con fenotipos similares entre ellos. Los números asociados con los clústeres se explican en la Tabla 1. ....	39
<i>Figura 4. Mapa de calor de la sobreexpresión y eliminación de factores transcripcionales. (A) Mapa de calor de la sobreexpresión de factores transcripcionales de polarización de macrófagos. Mantuvimos la expresión del nodo como 1, simulamos y revisamos los atractores obtenidos. Toda la sobreexpresión se comparó con la de tipo salvaje (red original) con un cambio de log2 veces. (B) Mapa de calor de Knock-outs de factores transcripcionales de polarización de macrófagos. Los nodos se fijaron permanentemente con un valor de 0; las perturbaciones se fueron realizando una a una hasta alcanzar los atractores. Comparamos los fenotipos del tipo salvaje con las perturbaciones mediante un cambio logarítmico. Las regiones verde y roja indican aquellos atractores cuyo tamaño de la cuenca de atracción aumentó o disminuyó después de la perturbación. En negro, denotamos aquellos atractores con pocos efectos en el tamaño de atracción de la cuenca versus WT y después de la perturbación. Las áreas grises indican aquellos atractores que existen en el tipo salvaje pero que no permanecen perturbados.....</i>	43
<i>Figura 5. Mapas de calor de los microambientes de polarización de macrófagos. Microambientes asociados a los seis fenotipos evaluados en este trabajo. Para estas simulaciones utilizamos los criterios de la Tabla 3. Una vez obtenidos los atractores, aplicamos una transformación logarítmica sobre el tamaño de la cuenca de atracción para cada fenotipo. El rojo representa una cuenca de pequeña atracción y el verde para una cuenca de grande atracción. Pro significa que modelamos la polarización en un adyuvante de microambiente para cada subtipo de macrófagos. M0: .....</i>	46
<i>Figura 6. Mapa de destino celular de la polarización de macrófagos. De todos los atractores obtenidos, cambiamos el valor del nodo y mantuvimos esta perturbación hasta que se alcanzó un atractor. Si el atractor pasa a otro fenotipo, lo representamos con una línea y el nuevo fenotipo obtenido por la perturbación. El signo más (+) significa que el nodo se apagó y lo encendimos, mientras que el signo menos (-) significa que la perturbación estaba encendida y lo apagamos. (A) Mapa de destino celular de monocitos (M0). (B) Mapa de destino celular del macrófago M1. (C) Mapa de destino celular del macrófago M1M2d. (D) Mapa de destino celular del macrófago M2bM2d. Los colores representan diferentes estados de polarización de macrófagos. ....</i>	48
<i>Figura 7. Atractores y mapa de destino celular de nuestro TGEM. (A) Gráfico de barras de los atractores obtenidos de nuestro macrófago teórico modificado genéticamente. Para este análisis, establecimos el valor de NFκB en 1 y HIF1-α en 0, y simulamos hasta que obtuvimos estos atractores. (B) Mapa de destino celular de nuestro teórico macrófago genéticamente modificado. Al analizar la plasticidad de los fenotipos a través de la perturbación de un solo gen del macrófago modificado genéticamente, obtuvimos las reglas de la perturbación genética que contribuyen a la transición</i>	

entre los fenotipos de macrófagos. Aquí (-) significa que el nodo se apagó y (+) significa que el nodo se encendió..... 51

Figura 8. TGEM en un microambiente de cáncer de mama. (A) Diseñamos diferentes microambientes asociados con el cáncer de mama y evaluamos cómo se comportaba nuestro TGEM. (B) Mapa de destino celular del macrófago teórico modificado genéticamente en el microambiente del cáncer de mama para la expresión de IgG y adenosinas. (C) Mapa de destino celular del macrófago modificado genéticamente teórico en el microambiente del cáncer de mama para la expresión de IL1- $\beta$  e IL-6. (D) Mapa de destino celular del macrófago genéticamente modificado teórico en el microambiente del cáncer de mama para la expresión de hipoxia y glucocorticoides (GCGCR). (E) Mapa de destino celular del macrófago modificado genéticamente teórico en el microambiente del cáncer de mama para la expresión de IL-10 y TGF- $\beta$ . Este análisis fue para evaluar la estabilidad de nuestro enfoque farmacéutico en un escenario de cáncer de mama. .... 55

Figura 9. . Análisis de la robustez de nuestra red reguladora transcriptómica de polarización de macrófagos. Análisis de sensibilidad de cada nodo de nuestra red reguladora transcripcional de polarización de macrófagos. (A) Curvas de Derrida de nuestra red reguladora transcripcional de polarización de macrófagos en un microambiente tumoral. (B) Análisis de sensibilidad de las variables en nuestra red reguladora transcripcional de polarización de macrófagos en un microambiente tumoral. La línea dorada es la media del valor del análisis de sensibilidad..... 59

Figura 10. Polarización de macrófagos en diferentes citocinas exógenas únicas proinflamatorias. Todos los paneles tienen como estado inicial el fenotipo M0 (monocitos). El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M0 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citocinas exógenas. (A) aumento gradual del interferón-gamma (IFNG), (B) aumento del interferón-beta (IFNB), (C) aumento gradual del factor de necrosis tumoral alfa (TNFAe) y (D) aumento gradual de la interleucina 1-beta (IL1B)..... 63

Figura 11. Polarización de macrófagos en diferentes citocinas exógenas únicas antiinflamatorias. Todos los paneles tienen como estado inicial el fenotipo M0 (monocitos). El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M0 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citocinas exógenas. (A) aumento gradual de la interleucina-4 (IL4e), (B) aumento de la inmunoglobulina (IgG), (C) aumento gradual de la interleucina-10 (IL-10e), (D) aumento gradual del factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF), y (E) aumento gradual del factor de crecimiento tumoral beta (TGF- $\beta$ ). .... 65

Figura 12. Polarización de macrófagos de atractores de estado estacionario en diferentes microambientes asociados al fenotipo. Todos los paneles tienen como estado inicial el fenotipo M1. El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M0 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citocinas exógenas. (A) aumento gradual de interferón-gamma (IFNG) e interferón-beta (IFNB) en el entorno M1a, (B) mejora del factor de necrosis tumoral alfa (TNFAe) y la interleucina 1-beta (IL1B) para el microentorno M1, (C) aumento gradual de interleucina-4 y factor de crecimiento tumoral, un microambiente pro-M2a, (D) aumento gradual de inmunoglobulina y glucocorticoides, el microambiente pro-M2b, (E) aumento gradual de interleucina-10, estimulante de colonias de macrófagos factor e interleucina-6, el entorno pro-M2c, y (F) aumento gradual de adenosinas, hipoxia y glucocorticoides, el entorno pro-M2d. .... 67

Figura 13. Polarización de macrófagos en diferentes microambientes asociados al fenotipo. Todos los paneles tienen como estado inicial el fenotipo M0 (monocitos). El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M0 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citocinas exógenas. (A) aumento gradual del interferón-gamma (IFNG) y el interferón-beta (IFNB) en el entorno M1a, (B) mejora del factor de necrosis tumoral alfa (TNFAe) y la interleucina 1-beta (IL1B) para el microentorno M1, (C) aumento gradual de interleucina4 y factor de crecimiento tumoral, un microambiente pro-M2a, (D) aumento gradual de inmunoglobulina y glucocorticoides, el microambiente pro-M2b, (E) aumento gradual de

interleucina10, factor estimulante de colonias de macrófagos e interleucina-6, el entorno pro-M2c, y (F) aumento gradual de adenosinas, hipoxia y glucocorticoides, el entorno pro-M2d..... 72

Figura 14. Macrófagos teóricamente modificados genéticamente (TGEM) en diferentes microambientes asociados al fenotipo. Todos los paneles tienen como estado inicial la activación e inhibición como perturbaciones constantes de NFκB y HIF1-α respectivamente. El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M0 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citocinas exógenas. (A) aumento gradual del interferón gamma (IFNG) y el interferón-beta (IFNB) en el entorno M1a, (B) mejora del factor de necrosis tumoral alfa (TNFAe) y la interleucina 1-neta (IL1B) para el microentorno M1, (C) aumento gradual de interleucina-4 y factor de crecimiento tumoral, un microambiente pro-M2a, (D) aumento gradual de inmunoglobulina y glucocorticoides, el microambiente pro-M2b, (E) aumento gradual de interleucina10, factor estimulante de colonias de macrófagos e interleucina-6, el entorno pro-M2c, y (F) aumento gradual de adenosinas, hipoxia y glucocorticoides, el entorno pro-M2d..... 74

Figura 15. Macrófagos teóricamente modificados genéticamente (TGEM) en diferentes ..... 75

Figura 16. Macrófagos teóricamente modificados genéticamente (TGEM) en diferentes microambientes de cáncer de mama. Todos los paneles tienen como estado inicial la activación e inhibición como perturbaciones constantes de NFκB y HIF1-α respectivamente. El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M0 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citocinas exógenas. (A) Aumento gradual de interferón gamma (IFNG), interleucina-beta (IL1B) e interleucina-6, el entorno de eliminación de procitocinas y tumores, (B) aumento de inmunoglobulina-G (IgG) y adenosinas (A2a), un microambiente prorregulador, (C) aumento gradual de interleucina-10 y factor de crecimiento tumoral, un microambiente antiinflamatorio, (D) aumento gradual de hipoxia y glucocorticoides, un microambiente prohipóxico..... 77

Figura 17. Diagramas de espacio de fenotipo para el fenotipo de macrófago M1a en microambientes opuestos. Todos los paneles del diagrama tienen como estado inicial el macrófago M1a (STAT1 activado). También para todos los paneles, STAT1 aumenta gradualmente en los microambientes de macrófagos opuestos (A) aumento gradual del factor de transcripción ERK en un microambiente proM2b, (B) mejora del factor de transcripción STAT6 en un microambiente pro-M2a (C) aumento gradual del factor de transcripción STAT3 en un microambiente pro-M2c, (D) aumento gradual de HIF1-α en un microambiente pro-M2d..... 80

Figura 18. Diagramas de espacio de fenotipo para el fenotipo de macrófago M2c en microambientes opuestos. Todos los paneles del diagrama tienen como estado inicial el macrófago M2c (STAT3 activado). También para todos los paneles, STAT1 aumenta gradualmente en los microambientes de macrófagos opuestos (A) Incremento gradual de NFκB en un microambiente pro-M1, (B) Mejora gradual de STAT1 en un microambiente pro-M1a, (C) mejora de la transcripción de STAT6 factor en un microambiente pro-M2a (D) Aumento gradual del factor de transcripción ERK en un microambiente pro-M2b, (E) aumento gradual de HIF1-α en un microambiente pro-M2d..... 84

Figura 19. El gráfico t-SNE de los fenotipos obtenidos de nuestra red de polarización de macrófagos. A los atractores se les entregó un punto en un plano x-y basado en la expresión de 0 y 1, y se colocaron cerca de los atractores con la misma combinación de 0 y 1. .... 87

Figura 20. Mapa de destino celular de la polarización de macrófagos. De todos los atractores obtenidos, cambiamos el valor del nodo y mantuvimos esta perturbación hasta llegar a un atractor. Si el atractor pasa a otro fenotipo, lo representamos con una línea y el nuevo fenotipo obtenido por la perturbación. El signo más (+) de perturbación simple significa que el nodo se apagó y lo encendimos, mientras que el signo menos (-) significa que la perturbación estaba encendida y lo apagamos. (A) Mapa de destino celular de monocitos (M0). (B) Mapa de destino celular del macrófago M1. (C) Mapa de destino celular del macrófago M2a. (D) Mapa de destino celular del macrófago M2c. (E) Mapa de destino celular del macrófago M2aM2d. (F) Mapa de destino celular del macrófago M1M2b. Los colores representan diferentes estados de polarización de macrófagos. .... 92

<i>Figura 21. Comparación entre M0 y M1 activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M1. ....</i>	95
<i>Figura 22. Comparación entre M0 y M2a activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2a. ....</i>	97
<i>Figura 23. Comparación entre M0 y M2b activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change fue mayor a 2 y un p valor menor a 0.05, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2b. ....</i>	99
<i>Figura 24. Comparación entre M0 y M2c activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2c. ....</i>	100
<i>Figura 25. Comparación entre M0 y M2d activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2d. ....</i>	102
<i>Figura 26. Comparación entre M1 y M2b activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2b. ....</i>	103
<i>Figura 27. Comparación entre M2a y M2b activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2b. ....</i>	104
<i>Figura 28. Integración metabólica de metabolitos y factores transcripcionales. Círculos en color marrón son factores extracelulares que activan a factores internos. En color verde son metabolitos dentro del macrófago. En cambio, en color morado son factores transcripcionales. Finalmente, en el recuadro azul vías metabólicas importantes en la polarización del macrófago. En color verde es activación, en cambio en color rojo es inactivación. ....</i>	109

# Índice de tablas

Tabla 1. Fenotipos de macrófagos utilizados para nombrar cada atractor. Los atractores obtenidos después de la simulación fueron etiquetados con base en los fenotipos de macrófagos reportados en la literatura.....	36
Tabla 2 Descripción de los resultados obtenidos del agrupamiento de k-medias sobre el espacio t-SNE 2D. El comportamiento fenotípico de cada grupo fue aproximado por los criterios de clasificación utilizados por (79).....	39
Tabla 3. Microambientes asociados con subtipos específicos de macrófagos. Microambiente para los seis fenotipos de macrófagos modelados en nuestra red reguladora de genes. En el lado derecho de la tabla, tenemos los fenotipos y los nodos que se mantuvieron durante la simulación hasta que se alcanzó un atractor. ....	44



# Resumen

El equilibrio entre las respuestas del sistema inmunitario proinflamatorias y antiinflamatorias es crucial para prevenir enfermedades complejas como el cáncer. Los macrófagos son una población esencial que contribuye a este equilibrio en convivencia con el microambiente tumoral local. Los macrófagos se dividen en dos tipos: M1 con capacidad de eliminación de células tumorales y las M2 con capacidad de regular el sistema inmunológico, favorecer el crecimiento de células tumorales y recuperar el tejido. Las células cancerosas evaden el ataque de los macrófagos liberando citocinas y potenciando la transición al fenotipo M2 con funciones protumorales. A pesar de este efecto pernicioso sobre el sistema inmunológico, el fenotipo M1 está presente en el microambiente. Puede eliminar las células tumorales mediante la liberación de citocinas que reclutan y activan las acciones citotóxicas de las células efectoras T. Aquí, utilizamos un enfoque de modelado booleano para comprender cómo el microambiente tumoral da forma al comportamiento de los macrófagos e inclinar el balance hacia funciones anti-tumorales en vez de protumorales. Nuestra reconstrucción de red integra datos experimentales e información pública que nos permiten estudiar la polarización de los monocitos a los sub-fenotipos M1 (activado por IFN- $\gamma$ ), M2a (activado por IL-4), M2b (activado por IgG), M2c (activado por IL-10) y M2d (activado por IL-6). Analizamos la dinámica de la polarización de macrófago en diferentes condiciones y perturbaciones. En particular, nuestro estudio identificó nuevas poblaciones de células híbridas, no descritas antes. Con base en el comportamiento de los macrófagos mencionados anteriormente, explicamos el papel de los macrófagos híbridos en el microambiente tumoral. El modelo *in silico* nos permitió postular factores transcripcionales que mantienen el equilibrio entre macrófagos con funciones antitumorales y pro-tumorales. En nuestra búsqueda por mantener el equilibrio de los fenotipos de macrófagos para eliminar las células tumorales malignas, emulamos un macrófago modificado genéticamente teórico al modificar la activación de NF $\kappa$ B y una

pérdida de función en HIF1- $\alpha$  y discutimos sus implicaciones fenotípicas. En general, nuestro enfoque teórico es una guía para diseñar nuevos experimentos para desentrañar los principios de las funciones antagónicas duales protectoras o dañinas del huésped de los macrófagos de transición en la inmunoección tumoral y las decisiones sobre el destino de las células cancerosas.

Los atractores cíclicos generados a partir de modelos booleanos se han considerado con frecuencia como artefactos matemáticos sin ninguna relevancia biológica. Contrariamente a esta idea, postulamos que los atractores cíclicos en ciertos casos podrían ser un mecanismo sistémico para enfrentar las perturbaciones provenientes del entorno. Para justificar nuestra coyuntura, presentamos un análisis dinámico de una red reguladora transcripcional altamente curada de macrófagos restringidos a un microambiente de cáncer. Observamos cuando los factores de transcripción asociados a M1 (STAT1 o NF $\kappa$ B) son perturbados, el microambiente se equilibra a una condición de hiper-inflamación, el atractor cíclico que se genera debido a esta perturbación activa genes cuyas señales contrarrestan este efecto implicado en el daño del tejido. El mismo comportamiento ocurre cuando se alteran los factores de transcripción asociados a M2 (STAT3 o STAT6), el atractor cíclico generado evitaría un escenario de hiper-regulación implicado en proporcionar un entorno adecuado para el crecimiento tumoral. Por lo tanto, aquí proponemos que los fenotipos de macrófagos cíclicos pueden servir como reservorio para equilibrar el balance del microambiente y así evitar algún estado hiper. Por ejemplo, si se genera un escenario hiper-inflamatorio, el atractor cíclico tendrá un fenotipo anti-hiper inflamatorio para evitar danos en el tejido. Consideramos que los atractores cíclicos no deben simplemente ignorarse, sino que es necesario evaluar cuidadosamente su importancia biológica. En este trabajo sugerimos una conjetura: los atractores cíclicos pueden servir como reservorio para equilibrar la respuesta inflamatoria/reguladora de la red ante perturbaciones externas. Para comprender este problema, desarrollamos un enfoque teórico y dinámico

para el análisis de la diferenciación de macrófagos que se derivan de los monocitos activados que circulan en la sangre. Una vez reclutados en el sitio de la inflamación, estos monocitos pueden polarizarse según el microambiente particular en ese momento.

Transformamos una red booleana de polarización de macrófagos a un esquema continuo, para poder demostrar si los fenotipos híbridos encontrados en la red booleana igual se presentaban en un modelo continuo. La red que desarrollamos incluye factores de transcripción, citocinas endógenas y exógenas. La transformación se desarrolló utilizando reglas de interacción utilizando un enfoque de lógica difusa.

Al aplicar este enfoque, podemos analizar diferentes aspectos que no se pueden visualizar en el enfoque booleano, por ejemplo, podemos comprender la dinámica de la diferencia de concentraciones y la mezcla de citoquinas y factores de transcripción. Un aspecto importante es la evaluación de las transiciones entre fenotipos, unas abruptas y otras graduales, este tipo de cambios se basaron en concentraciones específicas de citocinas exógenas en el microambiente tumoral. Además, demostramos la plasticidad de los macrófagos basada en una combinación de citocinas y la existencia de fenotipos híbridos o polarización parcial. IL-10 tiene la capacidad de inducir un híbrido que cambia entre un macrófago M2c y M2b. El IFN $\gamma$ : tiene la capacidad de inducir un híbrido entre los macrófagos M1 y M1a. Este modelo matemático nos permite desentrañar los patrones de diferenciación de macrófagos basados en un mecanismo a nivel de sistema. Finalmente podemos entender cómo los macrófagos pueden responder a una respuesta inmunológica en constante cambio en un microambiente tumoral.

Finalmente, nuestro enfoque computacional puede contribuir a sentar las bases de la dinámica de la población de macrófagos bajo las fases de la inmunoedición del cáncer (eliminación, equilibrio y escape), en las características del cáncer de mama. Las direcciones futuras y los desafíos restantes en la investigación de la biología de transición desde la

inmunovigilancia hasta los macrófagos supresores incluirán análisis genómicos o citométricos de alto rendimiento de las poblaciones M1 y M2 en el microambiente tumoral asociado con el cáncer de mama. La comprensión del proceso dinámico desde la inmunovigilancia hasta la progresión maligna puede desentrañar los principios de las funciones duales protectoras o dañinas del huésped de los macrófagos M1 y M2 en la inmunoedición de tumores. En resumen, el modelado computacional se ha convertido en una herramienta crucial para allanar nuevos caminos en inmunoterapias capaces de implementar estrategias óptimas para luchar contra el cáncer de mama altamente invasivo.

## Abstract

The balance between proinflammatory and anti-inflammatory immune system responses is crucial to prevent complex diseases such as cancer. Macrophages are an essential population that contributes to this balance in coexistence with the local tumor microenvironment. Macrophages are divided into two types: M1 with the ability to kill tumor cells and M2 with the ability to regulate the immune system, promote tumor cell growth, and recover tissue. Cancer cells evade macrophage attack by releasing cytokines and potentiating the transition to the M2 phenotype with pro-tumor functions. Despite this deleterious effect on the immune system, the M1 phenotype is present in the microenvironment. It can kill tumor cells by releasing cytokines that recruit and activate the cytotoxic actions of effector T cells. Here, we use a Boolean modeling approach to understand how the tumor microenvironment shapes macrophage behavior and tip the balance towards functions anti-tumor instead of pro-tumor. Our network reconstruction integrates

experimental data and public information that allow us to study the polarization of monocytes to the sub-phenotypes M1 (activated by IFN- $\gamma$ ), M2a (activated by IL-4), M2b (activated by IgG), M2c (activated by IL-10) and M2d (activated by IL-6). We analyze the dynamics of macrophage polarization under different conditions and perturbations. Our study identified new populations of hybrid cells, not previously described. Based on the behavior of the macrophages, we explain the role of hybrid macrophages in the tumor microenvironment. The in-silico model allowed us to postulate transcriptional factors that maintain the balance between macrophages with anti-tumor and pro-tumor functions. In our quest to maintain the balance of macrophage phenotypes to eliminate malignant tumor cells, we emulate a theoretical genetically modified macrophage by modifying NF $\kappa$ B activation and a loss of function in HIF1- $\alpha$  and discuss its phenotypic implications. Overall, our theoretical approach is a guide to designing new experiments to unravel the principles of host protective or harmful dual antagonistic roles of transitional macrophages in tumor immunoediting and cancer cell fate decisions.

Finally, our computational approaches may contribute to laying the groundwork for macrophage population dynamics under the phases of cancer immunoediting (clearance, equilibration, and escape), in breast cancer characteristics. Future directions and remaining challenges in investigating the transition biology from immunosurveillance to macrophage suppressor will include high-throughput genomic or cytometric analyzes of M1 and M2 populations in the breast cancer-associated tumor microenvironment. Understanding the dynamic process from immunosurveillance to malignant progression can unravel the principles of the host protective or harmful dual roles of M1 and M2 macrophages in tumor immunoediting. In summary, computational modeling has become a crucial tool to pave new paths in immunotherapies capable of implementing optimal strategies to fight highly invasive breast cancer.

Cyclic attractors generated from Boolean models have often been considered as mathematical artifacts with no biological relevance. Contrary to this idea, we postulate that cyclical attractors in certain cases could be a systemic mechanism to deal with disturbances from the environment. To substantiate our juncture, we present a dynamic analysis of a highly cured transcriptional regulatory network of macrophages restricted to a cancer microenvironment. We observe when the transcription factors associated with M1 (STAT1 or NF $\kappa$ B) are disturbed, the microenvironment is balanced to a condition of hyper-inflammation, the cyclic attractor that is generated due to this disturbance activates genes whose signals counteract this effect involved in the damage of the tissue. The same behavior occurs when the M2-associated transcription factors (STAT3 or STAT6) are altered, the generated cyclic attractor would avoid a hyper-regulation scenario involved in providing a suitable environment for tumor growth. Therefore, here we propose that cyclic macrophage phenotypes can serve as a reservoir to balance the microenvironment and thus avoid some hyper state. For example, if a hyper-inflammatory scenario is generated, the cyclic attractor will have an anti-hyper-inflammatory phenotype to avoid tissue damage. We believe that cyclic attractors should not simply be ignored, but their biological significance needs to be carefully assessed. In this paper we suggest a conjecture: cyclic attractors may serve as a reservoir to balance the inflammatory/regulatory response of the network to external disturbances. To understand this problem, we developed a theoretical and dynamic approach to the analysis of macrophage differentiation that is derived from activated monocytes circulating in the blood. Once recruited to the site of inflammation, these monocytes can become polarized based on the microenvironment at the time.

We transformed a macrophage polarization Boolean network to a continuous scheme, in order to demonstrate whether the hybrid phenotypes found in the Boolean network still presented in a continuous pattern. The network we developed includes transcription factors, endogenous and exogenous

cytokines. The transformation was developed using interaction rules using a fuzzy logic approach. By applying this approach, we can analyze different aspects that cannot be visualized in the Boolean approach, for example, we can understand the dynamics of concentration difference and mixing of cytokines and transcription factors. An important aspect is the evaluation of transitions between phenotypes, some abrupt and others gradual. This type of change was based on specific concentrations of exogenous cytokines in the tumor microenvironment. Furthermore, we demonstrate macrophage plasticity based on a combination of cytokines and the existence of hybrid or partial polarization phenotypes. IL-10 can induce a hybrid that switches between an M2c and M2b macrophage. IFN- $\gamma$ : can induce a hybrid between M1 and M1a macrophages. This mathematical model allows us to unravel patterns of macrophage differentiation based on a system-level mechanism. We can finally understand how macrophages can respond to a constantly changing immune response in a tumor microenvironment. Finally, our computational approach can contribute to laying the foundations of macrophage population dynamics under the phases of cancer immunoediting (elimination, equilibrium, and escape), in breast cancer characteristics. Future directions and remaining challenges in investigating the transition biology from immunosurveillance to macrophage suppressor will include high-throughput genomic or cytometric analyzes of M1 and M2 populations in the breast cancer-associated tumor microenvironment. Understanding the dynamic process from immunosurveillance to malignant progression can unravel the principles of the host protective or harmful dual roles of M1 and M2 macrophages in tumor immunoediting. In summary, computational modeling has become a crucial tool to pave new paths in immunotherapies capable of implementing optimal strategies to fight highly invasive breast cancer.

# 1. Introducción

La inmunidad innata se describe como la primera línea de defensa para la resistencia contra patógenos, los receptores de dicha inmunidad han emergido como sensores a daños en tejidos y disfunción metabólica (1). Así, las células que integran el sistema inmunológico innato (en especial macrófagos y neutrófilos) activan, orientan y regulan la respuesta adaptativa. Los macrófagos son componentes esenciales de la inmunidad innata y juegan un papel central en la inflamación y la defensa del huésped. Por otra parte, estas células realizan funciones homeostáticas más allá de la defensa del huésped, como por ejemplo remodelación del tejido en ontogénesis y dirigen funciones metabólicas (2).

De todas las células de origen hematopoyético, las células del linaje monocitomacróforo son probablemente las células que presentan mayor diversidad y plasticidad. Dentro de los tejidos, los fagocitos mononucleares se comportan con base en el microambiente en el que se encuentran adquiriendo fenotipos distintivos conocidos como activación clásica M1 (estimulado por ligandos de los receptores tipo toll (TLR) o por interferón gamma (IFN- $\gamma$ )) o los de activación alternativa (estimulados por interleucina-4 (IL-4), interleucina-13 (IL-13) o interleucina-10(IL-10)) (1-2). En el caso del cáncer, los macrófagos tienen un papel ambiguo en el desarrollo y progresión del fenotipo maligno. En particular, los macrófagos asociados a tumores (TAM) tienen un papel bivalente en la progresión del tumor. A pesar de su habilidad para eliminar a las células cancerígenas, los TAM aumentan la proliferación de las células cancerígenas, invasión, metástasis y angiogénesis, al liberar citocinas, factores de crecimiento, enzimas y factores angiogénicos. Estas actividades variadas dependen de la diferenciación fenotípica de los macrófagos (M1 y M2), las cuales permiten una actividad pro-tumoral o anti-tumoral respectivamente. Lo impresionante de este comportamiento bipartita es debido a que proviene de un solo tipo celular (TAM), lo cual induce a pensar que en un microambiente intra-tumoral pueden



existir subpoblaciones de macrófagos con distintas funciones. Estas subpoblaciones de macrófagos tan distintos desde el punto molecular y funcional tienen la habilidad de coexistir, incluso promover el desarrollo de los tumores. Esta doble funcionalidad de los macrófagos depende de varios factores asociados al microambiente como, por ejemplo: tipo de tumor, estado del tumor y el lugar específico dentro del tumor (3-4).

Mediante tecnologías “ómicas” de última generación, se ha hecho evidente que el cambio de fenotipo de los macrófagos red de interacciones que involucran señalización por moléculas, factores de transcripción, mecanismos epigenéticos, reguladores postranscripcionales y metabólicos (1,5-6). Así, los estados fisiológicos asociados a los macrófagos “M1” y “M2”, no sólo se caracterizan por patrones de la expresión de ciertos factores de transcripción, sino también van acompañados por una reprogramación metabólica requeridas para cubrir distintas necesidades funcionales. Un ejemplo de este comportamiento es la respuesta divergente en el metabolismo de ciertos aminoácidos. Mientras que para los macrófagos citotóxicos (M1), su metabolismo depende del óxido nítrico sintetizado de la arginina, en el macrófago pro-tumoral (M2) el metabolismo de la arginina sirve para el proceso de cicatrización. Otro ejemplo de la actividad metabólica diferencial entre ambos estados es el metabolismo del hierro, un metabolito que los macrófagos citotóxicos lo retienen para eliminar a un insulto. En contraste, los macrófagos pro-tumorales reciclan el hierro y lo liberan a los tejidos. Finalmente, estos cambios en el estado metabólico de los macrófagos igual dependen de una respuesta a señales ambientales (7-8). Entender los cambios de la regulación transcripcional y alteraciones metabólicas que guían la transición entre los estados M1 y M2 del macrófago es para dilucidar la complejidad de esta célula. La aplicación de herramientas matemáticas y computacionales nos permitieron explorar en población híbridas que a nivel experimental se pudiese complicar. Describir el posible comportamiento de fenotipos híbridos de macrófagos nos permitirá poder entender ciertas poblaciones de macrófagos de las cuales no podemos discernir su

comportamiento. En esta tesis nos enfocamos en los fenotipos híbridos que pudiesen emerger en un microambiente tumoral mamario (debido a que es el cáncer con mayor incidencia y fallecimiento en México) y cómo aprovechar el microambiente para favorecer la generación de fenotipos y un microambiente más hacia la eliminación de células tumorales y la recuperación del tejido subyacente. Proponemos un mecanismo de inmunoterapia dirigido a los macrófagos para obtener fenotipos híbridos con las características antes mencionadas. Nuestro trabajo nos permitió concluir que los macrófagos son una pieza fundamental para entender los mecanismos de la interacción entre el sistema inmune y las células cancerígenas.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Sistema inmunológico y Cáncer

El cáncer se deriva de células, las cuales adquieren una serie de modificaciones genéticas (mutaciones) o epigenéticas a través del tiempo que propician su crecimiento descontrolado. Estas mutaciones o alteraciones del DNA se encuentran en genes que regulan el ciclo celular (proliferación acelerada), evitan la muerte celular (apoptosis) y regulan la liberación de factores de crecimiento (9-11).

El sistema inmunológico es una red de células, señales y órganos que ayudan a proteger al cuerpo contra agentes extraños, agentes infecciosos y cáncer. Las células del sistema inmunológico se derivan de una célula troncal hematopoyética que se encuentra en la médula ósea. Las células del sistema inmunológico se derivan de dos células progenitoras: mieloide y linfoide. Las células del sistema inmunológico que responden de manera temprana y no específica forman parte de una respuesta inmunológica innata. En cambio, células del sistema inmunológico que responden después de un período de tiempo de la infección y cuya respuesta es más específica debido a la presentación de antígeno por células especializadas (CPA, células

presentadoras de antígeno) forman parte de una respuesta inmunológica adaptativa (11-14).

Existen dos características de los hallazgos del cáncer que relacionan al sistema inmunológico y a las células tumorales: la inflamación y la evasión del sistema inmunológico. El proceso inflamatorio generado por la proliferación descontrolada de la célula resulta en el reclutamiento de células del sistema inmunológico. Notablemente en los últimos años se ha encontrado evidencia experimental de cómo las células del sistema inmunológico ayudan a la supervivencia de las células tumorales. En especial las células del sistema inmune innato (particularmente los macrófagos) liberan al microambiente tumoral biomoléculas activas, factores de crecimiento para una proliferación sostenida, y factores que evitan la muerte celular entre otros factores (15–17).

En condiciones funcionales de homeostasis, el sistema inmunológico tiene la capacidad de eliminar células malignas antes de que se conviertan en tumores en un proceso llamado inmunovigilancia. Pero las células tumorales desarrollan mecanismos para poder inhabilitar factores del sistema inmunológico y por lo tanto evitar ser eliminados. Se ha observado que varias células cancerosas son eliminadas al principio, pero algunas se escapan de esta eliminación, las cuales dan pie al crecimiento del tumor (inmunoedición). El nuevo tumor creado por estas células ha sido dirigido por el sistema inmunológico del huésped. En pocas palabras, componentes del sistema inmunológico tienen la capacidad de eliminar células tumorales, pero igual la capacidad de ayudar en su supervivencia y mantenimiento (18–20).

Una de las células que presentan esta actividad dual son los macrófagos. Estas células pertenecen al sistema inmunológico innato y tienen la capacidad de presentar antígenos permitiendo la interacción con otras células del sistema inmunológico. Además de sus propiedades fagocíticas tienen roles tróficos durante el desarrollo y para mantener la homeostasis. Desde un punto de vista sencillo, los macrófagos se dividen principalmente en dos

fenotipos: macrófagos a favor de la eliminación del tumor (M1) y macrófagos a favor de la supervivencia, regulación y mantenimiento del tumor (M2) (21).

## 2.2 Diferenciación fenotípica y origen de los macrófagos

### 2.2.1 Diferenciación fenotípica de los macrófagos

Los macrófagos son células que pertenecen al sistema inmunológico innato y, entre otras células, son la primera línea de defensa para la resistencia contra los patógenos. Además, tienen la capacidad de activar, orientar y regular la respuesta inmunológica adaptativa (1). Los macrófagos son de gran importancia debido a su papel en la defensa del huésped y la capacidad de dirigir la inflamación crónica en enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, la obesidad, la diabetes, el cáncer y otras enfermedades neurodegenerativas (2,22).

Los macrófagos derivan de los monocitos. En el comportamiento fisiológico normal, los monocitos circulan en la sangre bajo la condición de homeostasis. Cuando la condición funcional cambia en alguna zona del cuerpo (inflamación), los monocitos circulantes son reclutados al sitio de inflamación y comienzan una serie de cambios de expresión genética cuyo resultado final será la transformación hacia un macrófago. A pesar de la complejidad del proceso, la diferenciación de macrófagos se ha estudiado en un modelo simplificado dividido en dos grupos, fenotipos proinflamatorios (macrófagos M1) y anti-inflamatorios (macrófagos M2) (23,24). Aunque el modelo simplificado se basó en una diferencia metabólica entre estos grupos, se ha implementado esta descripción para comprender los mecanismos de liberación y función de los macrófagos en la inmunología tumoral (23).

La diferenciación o polarización de los macrófagos, de M1 a M2 o viceversa, es un proceso continuo y su direccionalidad o destino depende de las moléculas que están presentes en el microambiente celular. Recientemente, estudios con mayor precisión molecular han sugerido diferentes subtipos de macrófagos que se correlacionan con citocinas

específicas, receptores de membrana, factores de transcripción y función celular (25) (Figura 1).

En este contexto, es importante estudiar la polarización de los macrófagos para entender los mecanismos de diferenciación y descubrir estados intermedios a través de una red de señalización que combina información biológica de diferentes entornos y sus influencias en la toma de decisiones sobre el destino de diferenciación del macrófago. Al tener en cuenta una clasificación funcional bien aceptada de los macrófagos, los dos subconjuntos de macrófagos M1 y M2 se dividirán de la siguiente manera: el subconjunto proinflamatorio: M1; y el subconjunto antiinflamatorio: M2a, M2b, M2c y M2d. Los criterios utilizados para construir estas clasificaciones se basan principalmente en diferentes mecanismos para activar respuestas pro y antiinflamatorias en microambientes específicos, como se resume en la figura 1 (25,26). Por ejemplo, M1 expresa NF $\kappa$ B o STAT1, secreta TNF- $\alpha$  e IL-12 y está asociado a una fuerte actividad microbicida y antiinflamatoria (1). M2a expresa STAT6, secreta IL-10, TGF- $\beta$  e IL-1ra, se asocia con infecciones por hongos y helmintos e inhibe la respuesta Th1 y activa la respuesta Th2 (27). M2b expresa Erk y AP-1, y secreta IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-1, se asocia con la regulación inmune (28). M2c expresa STAT3, secreta IL-10 y TGF- $\beta$ , participan en la reparación de tejidos, la remodelación de la matriz y el comportamiento inmunosupresor (29). M2d es un subtipo de macrófagos asociado a tumores, expresa HIF1- $\alpha$  y secreta IL-10, TGF- $\beta$  y VEGF (30–32). En la tabla S1 se muestra un panorama global de estas clasificaciones de macrófagos y sus correspondientes respuestas de señalización, y los mecanismos moleculares se pueden revisar en la información complementaria.

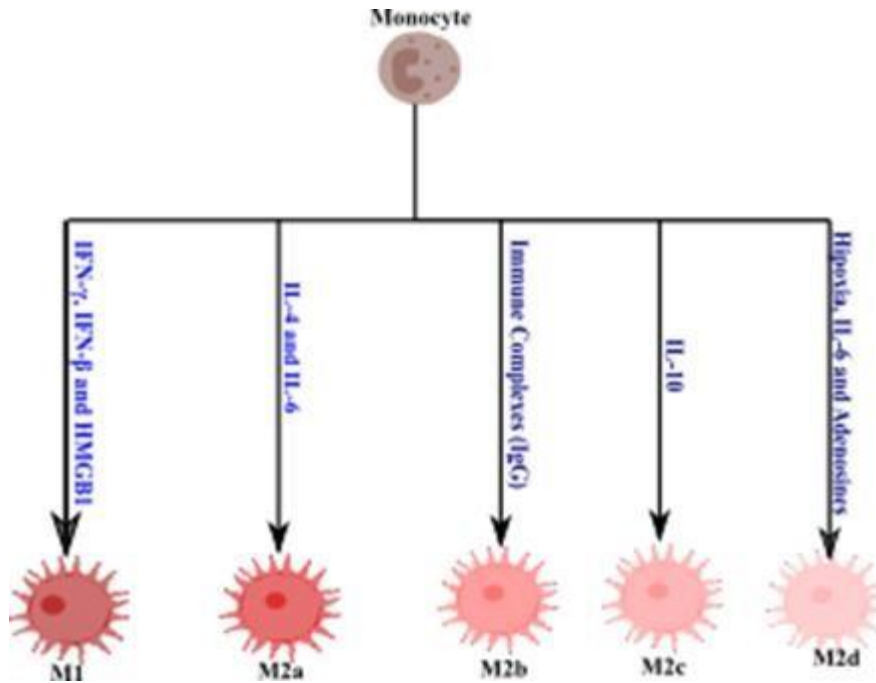


Figura 1. Las señales ambientales dictan el comportamiento de las poblaciones de macrófagos. HMBG1 (Grupo 1 de alta movilidad). Las citocinas, las señales de peligro y las consecuencias metabólicas son factores importantes que modifican los factores moleculares en los macrófagos.

La amplia variedad de estímulos que caracteriza el microambiente tumoral determinará la función del macrófago. Estos estímulos pueden inducir la polarización de un subconjunto de macrófagos o podría inducir algunas transformaciones de un tipo a otro tipo de células. En términos generales, algunas de estas transiciones tienen soporte experimental y se pueden resumir de la siguiente manera: M1 se puede transformar en M2a, M2c y M2d. A su vez, M2a se puede transformar en M1 o M2c. M2c puede transformarse en M1 o M2a. Finalmente, M2d puede ser inducido a un tipo M1 (30–33). La polarización de los macrófagos a cualquiera de estos fenotipos queda determinada por la interacción del entorno, particularmente de las citocinas secretadas por las células inmunes, las células epiteliales, las células del estroma, las células tumorales o los propios macrófagos (34). Es decir, el subtipo de polarización de macrófagos es un proceso complejo que está dictado por factores como el microambiente (35,36), factores de transcripción,

supresores de la señalización de citocinas, factores de metabolitos, regulación epigenética o microARN

(37,38)

Ante el escenario anteriormente expuesto, comprender el papel que tiene el cáncer en el desarrollo de los subtipos de macrófagos es un desafío complejo, y para dilucidar y comprender sus mecanismos es necesaria la implementación de modelos computacionales que contribuyan a generar hipótesis experimentales comprobables. A pesar de que se han aplicado varios formalismos matemáticos para comprender el espacio factible de respuestas de las redes biológicas, consideramos que los modelos booleanos son un esquema adecuado para explorar el comportamiento fenotípico de circuitos de regulación transcripcional, esto a pesar de la falta de información específica de los parámetros cinéticos asociados a cada regulación (39,40).

Estudios previos de polarización de macrófagos a partir de redes de regulación transcripcional han utilizado modelos Booleanos para tratar de comprender la dinámica de la plasticidad de los macrófagos (41,42). En particular, Palma et al en 2018 utilizaron una red de regulación para poder hipotetizar los mecanismos genéticos que propician la diferenciación de macrófagos. Mediante una simulación booleana de dicha red, pudieron obtener atractores cuyo fenotipo se asoció a los fenotipos M1, M2a, M2b y M2c en macrófagos. En particular, su estudio *in silico* permitió postular que las citocinas extracelulares son factores angulares para inducir la plasticidad en los macrófagos, es decir la capacidad adaptativa de los fenotipos con base al microambiente presente (42). Aunque estos informes representan contribuciones valiosas, hay dos aspectos novedosos de nuestro trabajo que serán incluidos en nuestro modelo matemático. Primero, se ha informado recientemente sobre nueva información biológica y estados funcionales que pueden mejorar las capacidades de la red de regulación transcripcional asociada a un macrófago y construir nuevas hipótesis experimentales comprobables. Por otro lado, como veremos junto con esta tesis, el modelado matemático de una red reguladora más detallada que incluye los mecanismos

asociados con la transformación de monocitos y macrófagos tiene implicaciones relevantes en las predicciones de nuevos comportamientos fenotípicos. Con base en los puntos anteriores, en esta tesis, evaluamos las etapas funcionales y la estabilidad de los fenotipos mixtos o híbridos, además generamos un macrófago teórico para poder inclinar el balance hacia la eliminación de células tumorales. En lo que a nosotros respecta, nuestro modelo regulatorio es el primero que incorpora las interacciones importantes y suficientes que podrían recuperar todas las transiciones reportadas de plasticidad de macrófagos. En general, nuestro trabajo representa una contribución al desarrollo de un marco de biología de sistemas capaz de reproducir el fenotipo observado para los macrófagos y servir como una plataforma computacional para diseñar experimentos comprobables en la interacción entre macrófagos y cáncer.

### 2.2.2 Origen de los macrófagos

Como todas las células del sistema inmunológico, los macrófagos provienen de una célula madre pluripotente de la médula ósea. Posterior a unos procesos de diferenciación en la sangre, se desarrolla el monocito, el cual es el precursor del macrófago (43,44). El abastecimiento de macrófagos vía monocitos no es la única forma, existen poblaciones de macrófagos asociados al tejido (células Kupffer, microglía). El origen de estas poblaciones son diversas desde progenitores embrionales, monocitos fetales o macrófagos de saco vitelino (44).

Para el alcance de esta tesis, nos enfocaremos en una población de macrófagos asociados a tumores (MAT). Los tumores se generan debido a un mal funcionamiento celular derivado de una proliferación celular descontrolada, lo cual a su vez conlleva a un proceso inflamatorio estéril. Los macrófagos son la población de origen mieloide más dominante en un



tumor, y su abundancia presenta una correlación positiva con el crecimiento del tumor (2,16,45). El origen de los MAT se deriva de los monocitos, los cuales son atraídos por el tumor mediante la liberación de quimiocinas. (46). Un resultado interesante de estos macrófagos es que no todos presentan características tipo M2, generando la hipótesis de que no todos los MAT son M2, realzando el concepto de heterogeneidad (16,47–49).

## 2.3 El microambiente tumoral y la influencia de los macrófagos

### 2.3.1 El microambiente tumoral es un factor importante en la progresión del tumor

El crecimiento de los tumores sólidos es un proceso dinámico y complejo cuyo escenario queda ubicado dentro de la matriz extracelular. Dentro de esta se encuentran células endoteliales y del sistema inmune que de forma sistémica interactúan mediante señales metabólicas en un mismo espacio. Este espacio se le conoce como el microambiente tumoral, en el cual se encuentran una variedad de moléculas que pueden favorecer el crecimiento del tumor (50).

El microambiente tumoral tiene la capacidad de modificar el comportamiento del sistema inmunológico para favorecer el crecimiento del tumor y evitar su eliminación. Dicho ambiente se establece mediante un complejo cross-talk entre células cancerosas y células normales. Mientras que las células de cáncer liberan citocinas, las células no malignas, en particular los macrófagos, responden con la liberación de factores de crecimiento, quimiocinas y enzimas regulatorias inmunológicas en el ambiente.

Para que un tumor pueda sobrevivir necesitan tres características:

angiogénesis, inflamación crónica y supresión del sistema inmunológico. El macrófago actúa en todas estas características.

#### 2.3.1.1 MAT y angiogénesis

Durante el desarrollo embrionario, las células endoteliales forman una red tubular de vasos sanguíneos que eventualmente permitirá el transporte de fluidos, nutrientes, células circundantes, hormonas y gases a casi todos los órganos a lo largo del cuerpo. Una vez madura, la vasculatura consiste en un elaborado sistema jerárquico de arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas que promueven la circulación de sangre oxigenada entre el corazón, pulmones y tejidos blandos. A pesar de la complejidad del sistema vascular, todos los vasos sanguíneos que se forman durante el desarrollo y crecimiento se generan de nuevos capilares de vasos preexistentes en un proceso llamado angiogénesis (51).

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren acceso a la circulación, para poder crecer y sobrevivir. En los años 50 's se observó que las células cancerígenas crecían preferentemente cerca de vasos sanguíneos y observaron que aquellas células que estaban lejos de los vasos sanguíneos alrededor de los .2mm simplemente no crecían y morían. Esta región límite representa la distancia en la cual el oxígeno puede efectivamente difundirse a través de los tejidos. Células que se encuentran dentro de esta zona puede depender del vaso sanguíneo para ser abastecidos de oxígeno, células que están lejos sufren de hipoxia severa o moderada y un pH bajo (10).

Por lo tanto, el microambiente tumoral debe de tener una variedad de células que tengan la capacidad de influir el proceso angiogénico, siendo el principal el macrófago. En este caso los macrófagos pueden ser activados por la hipoxia para inducir la liberación de factores de crecimiento como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) para inducir la proliferación de células endoteliales quiescentes para que obtengan la forma angiogénica.

Igual tienen la capacidad de liberar metaloproteínas que sirven para acelerar el proceso angiogénico. Finalmente generan una retroalimentación positiva con las células cancerígenas mediante IL-1 $\beta$  para que se libere más VEGF al medio.

#### 2.3.1.2 MAT en inflamación crónica

La inflamación se puede dividir en dos tipos: aguda y crónica. El proceso es similar en ambos, la única diferencia es el tiempo de duración. La inflamación es un estado agresivo debido a su función de eliminar patógenos, una vez eliminado el tejido llega la homeostasis. En el caso del cáncer, la inflamación es crónica y nunca se llega a la homeostasis. Los macrófagos tienen la capacidad de generar especies reactivas de oxígeno que pueden afectar el ADN de las células tumorales y seguir acumulando mutaciones. Esta situación genera una proliferación sin cesar, y consecuentemente una inflamación constante (52,53).

#### 2.3.1.3 MAT en supresión del sistema inmunológico

Como se mencionó anteriormente, el sistema inmunológico es de gran importancia para controlar el crecimiento de tumores. Los macrófagos asociados a tumores tienen la capacidad de regular al sistema inmunológico mediante la liberación de citocinas, quimiocinas etc. Un ejemplo es el reclutamiento de células T reguladoras para inhibir las funciones citotóxicas de las células T (54). En general, los macrófagos tienen la capacidad de liberar citocinas antiinflamatorias como IL-10 o TGF- $\beta$ , los cuales afectan la función y maduración de células dendríticas y por lo tanto se afecta la presentación de antígenos a las células T (55). La presencia de los macrófagos es de importancia para que el tumor pueda sobrevivir a las perturbaciones causadas por el proceso inflamatorio y el mantenimiento de las células tumorales (56).

## 2.4 Metabolismo del macrófago

El metabolismo es una parte importante en la vida de cualquier célula de nuestro cuerpo, la cual, desde el 2011, fue incluida como un hallazgo emergente del cáncer (9). En este trabajo nos enfocaremos en el inmuno-metabolismo de macrófagos y su adaptación en un microambiente dinámico en un tumor sólido. Los macrófagos presentan distintas formas de activación para poder llevar a cabo funciones específicas. Por lo tanto, es importante saber si existen diferencias metabólicas entre las formas de activación (57).

Los productos obtenidos en una reacción metabólica pueden llevar a cabo funciones más allá de solo producir energía, entre éstas la regulación de funciones asociadas con la activación del sistema inmunológico. Estos metabolitos, llamados en la literatura inmuno-metabolitos, tienen la capacidad de regular rutas intracelulares específicas del fenotipo y de las funciones específicas. Dicha regulación es por modificación postraduccionales. Además, estos inmuno-metabolitos pueden ser expulsados de la célula y pueden modificar el microambiente tumoral actuando como una citocina reguladora (58-60).

El macrófago activado por TLR4 (M1) presenta un metabolismo glucolítico, muy asociado a sus funciones proinflamatorias. De forma distintiva, este subtipo tiene la habilidad de generar especies reactivas de oxígeno (61). En cambio, los macrófagos activados por IL-4 (M2) presentan un metabolismo oxidativo con propósito bioenergético asociado a su función de recuperación de tejidos (62). Recientes estudios muestran que los macrófagos también presentan una heterogeneidad metabólica. En este contexto se enmarca la importancia de analizar las diferencias metabólicas usando tecnologías de alto rendimiento en conjunto con formalismos de biología de sistemas en aras de entender las redes metabólicas que diferencian ambos tipos de macrófago (M1 vs M2). En esta tesis nos enfocaremos a desarrollar un estudio *in-silico* sobre los mecanismos regulatorios que propicien la transición del estado M1 al M2, sus

implicaciones teóricas, metabólica, y los posibles escenarios que podrían llevar al control/balance de las capacidades pro- y antiinflamatorias experimentalmente.

### 3. Hipótesis

Los patrones de activación que definen la polarización del macrófago dentro del microambiente tumoral resultan de un comportamiento dinámico de una red de señalización molecular que incluye factores de transcripción, citocinas y componentes metabólicos. Un estudio dinámico de la red de señalización será capaz de describir el proceso de transformación de los macrófagos, debido a señales extracelulares provenientes del microambiente generado por el tumor mamario. Nuestro modelo computacional permitirá desarrollar estrategias inmunológicas para potencialmente eliminar las células mamarias tumorales.

### 4. Objetivos

#### 4.1 Objetivo General

Evaluar, mediante modelos *in-silico* de biología de sistemas, el papel que ejercen distintas moléculas producidas por las células de cáncer de mama (debido a que los macrófagos tienen una mayor proporción de células en este tipo de cáncer), células del sistema inmunológico entre otras células presentes en el microambiente tumoral sobre el desarrollo de la polarización del macrófago. Con este objetivo, reconstruiremos y modelamos matemáticamente una red de señalización de la polarización del macrófago, desde un punto de vista transcripcional. Además, el análisis a desarrollar permitirá entender cómo dichas células podrían favorecer el proceso metastásico de células tumorales mamarias. Nuestro análisis permitirá explorar la dinámica de la polarización del macrófago causada por la interacción entre las células en un microambiente tumoral, con un poder

predictivo para el desarrollo de terapias inmunológicas que favorezcan la eliminación de células tumorales mamarias.

## 4.2 Objetivos específicos

1. Reconstrucción de una red de señalización de la diferenciación fenotípica del macrófago, utilizando información de señalización y metabólica reportada en la literatura.
2. Simular el comportamiento de estados y subpoblaciones de los macrófagos mediante el uso de dos formalismos: método discreto (Modelo Booleano) y el método continuo (transformación usando lógica difusa)
3. Identificar cuáles son los nodos esenciales o los elementos moleculares y sus interacciones que intervienen en la regulación, los cuales están involucrados en la diferenciación fenotípica del macrófago.
4. Estudiar el efecto de diferentes perturbaciones sobre el comportamiento de la red simulando el modelo bajo condiciones de ganancia o pérdida de función de cada uno de sus nodos.
5. Plantear estrategias *in-silico* para diseñar terapias inmunológicas utilizando macrófagos, que de manera aislada son eficaces, evaluar su comportamiento en un modelo *in-silico* en el cual se trata de modelar un microambiente tumoral.
6. Análisis de datos metabólicos mediante enriquecimiento de la polarización de macrófagos para la integración con la modelación transcripcional de macrófagos y su adaptación en un microambiente tumoral

## 5. Metodología

La metodología de este trabajo se divide en dos secciones: análisis Booleano de la polarización del macrófago y el análisis metabólico de la polarización del macrófago.

### 5.1 Análisis Booleano de la Polarización del Macrófago

#### 5.1.1 Reconstrucción de la red de regulación de la polarización del Macrófago en un microambiente tumoral

Para comprender los mecanismos de señalización que dictan la polarización de macrófago se generó la arquitectura de la red utilizando un enfoque de abajo hacia arriba (bottom-up) validado con información experimental. La información experimental se realizó haciendo una búsqueda exhaustiva en los principales buscadores con acceso a publicaciones, siendo el más empleado el National Library of Medicine (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) y GoogleScholar.

Con base en la revisión de literatura, se obtuvieron 40 nodos, la cual se redujo a 29 nodos y 60 interacciones mediante la eliminación manual de nodos con carácter lineal. Se eliminaron aquellos nodos que no generaban atractores nuevos. Principalmente se eliminaron los receptores de las principales citocinas, productos metabólicos ya que no aportaban información nueva en el modelo y se asumió que los receptores estaban presentes en la membrana del macrófago.

#### 5.1.2 Modelación matemática de fenotipos de redes mediante variables discretas.

Con la finalidad de explorar el espacio factible de fenotipos asociados con nuestra red transcripcional, aplicamos un enfoque Booleano. Brevemente, los enfoques booleanos asumen que cada nodo de la red puede estar en uno de dos estados (0 o 1), y su comportamiento dinámico está explicado por una función booleana, que está definida por su regulación. En esta situación, el estado dinámico del nodo  $i$ -ésimo en una unidad discreta de tiempo ( $t$ ) viene dado por

$$x_i(t + 1) = f_i(x_{i1}(t), x_{i2}(t), \dots, x_{iki}(t)). \quad (1)$$

Donde  $x_i$  puede tomar los valores 0 o 1, y  $f_i$  representa la función booleana del nodo  $i$ -ésimo en la red (es decir la función de un nodo en particular). Tenga en cuenta que cada nodo tiene una función booleana que determina cómo ese nodo específico responde al cambio de sus reguladores vecinos (aquí indicado por los argumentos de  $f_i$ ). Además,  $f_i$  mapea un estado booleano, que incluye múltiples variables binarias, en el tiempo  $t$  en un nuevo estado booleano al tiempo  $t+1$ . Partiendo de un estado inicial, el comportamiento dinámico de la red se obtiene cuando aplicamos simultáneamente la función de transición  $f_i$  sobre todos los nodos, es decir de forma sincrónica. A partir de los estados iniciales  $2^N$ , las funciones de transición booleana permitirán que la red alcance un conjunto finito de estados que podrían alternar entre ellos en un estado fijo. Estos estados recurrentes se denominan atractores. Si la dinámica alcanza un estado y permanece allí, se denominan atractores simples, pero si se mueven irregularmente en un conjunto de estados, se denominan atractores complejos o sueltos. Todo el conjunto de estados iniciales cuya función de transición guíe a los mismos atractores formará la cuenca de atracción. Los atractores son de gran importancia porque representan el comportamiento a largo plazo del modelo Booleano y están potencialmente asociados con fenotipos en el sistema de estudio.

### 5.1.3 Análisis y simulación del modelo booleano

Una red de regulación genética es un sistema dinámico. Obtuvimos todos los atractores usando el algoritmo de búsqueda exhaustiva evaluando el espacio de  $2^n$

(donde  $n$  es el número de nodos) condiciones iniciales, por lo que evaluamos 536,870,912 condiciones iniciales usando la biblioteca BoolNet del software R (63). Como sabemos, los atractores obtenidos conllevan importantes implicaciones biológicas y pueden asociarse con fenotipos de macrófagos. Cada atractor fue etiquetado con base en evidencia experimental. El etiquetado se realizó con una función del paquete R BoolNetPerturb, ubicado



en <https://github.com/maresther23/boolnet-perturb-0.1>. Para comparar las diferencias entre los atractores obtenidos redujimos la dimensión de nuestras variables para graficarlas en un espacio 2D usando la función t-sne en R. Una vez que tuvimos nuestro gráfico, las agrupamos para encontrar similitudes entre los atractores. Para determinar el número óptimo de clústeres, evaluamos utilizando distintas métricas, variando de 10 a 30 clústeres. Finalmente, los clústeres fueron nombrados con base a las funciones que llevan a cabo los fenotipos de macrófagos en cada clúster. Se puede acceder a nuestro código, datos y análisis de este documento en: <https://github.com/resendislab/M1M2-Macrophage-Polarization>. Además, se adjuntará en anexos.

#### 5.1.4 Análisis de mutaciones

El análisis de mutaciones se dividió en dos secciones: eliminación y activación de genes. El número de condiciones iniciales para cada perturbación es  $2^{n-1}$  donde  $n - 1$  es el número de nodos menos el perturbado, por lo que para cada perturbación evaluamos 268,435,456 condiciones iniciales. Establecimos permanentemente el estado del nodo en 0 para la eliminación del gen y simulamos la dinámica hasta que alcanzó un atractor. Por el contrario, la activación de genes se logró fijando permanentemente como 1 el estado de un nodo en la red junto con todas las unidades de tiempo. Estas consideraciones se utilizaron para imitar la condición experimental de los perfiles de sobreexpresión o de eliminación, respectivamente. Al hacer este enfoque, evaluamos la robustez de un subtipo de macrófago dado para resistir una mutación de la función de eliminación o activación de un gen y cómo afecta su patrón de activación molecular.

En el caso del mapa de destino celular de la polarización de macrófagos, cambiamos aleatoriamente los valores de los nodos de cada atractor. Afectamos cada caso con un solo cambio de bit. Luego evaluamos

qué nodos pueden cambiar un fenotipo de macrófago dado para hacer la transición a otro fenotipo dado; esta perturbación determinará los vecinos de un solo estado.

### 5.1.5 Análisis estructural del modelo booleano

Para validar la robustez de nuestro modelo, calculamos la curva de Derrida y desarrollamos el análisis de sensibilidad de las reglas de actualización. Una curva de derrida nos permite evaluar si una red reguladora de genes es caótica, ordenada o crítica. Si las diferencias entre los estados iniciales divergen rápidamente de la diagonal de 45 grados, la red es caótica. Para obtener la curva de Derrida se procedió de la siguiente manera. Primero, muestreamos un par aleatorio de estados iniciales  $X_1(t)$  and  $X_2(t)$  al mismo tiempo conocido  $t$ . Una vez seleccionados estos estados, calculamos la distancia de Hamming normalizada  $h(t)$  que es el número de bits que difieren de los dos estados iniciales dividido por el número de nodos  $N$ . Luego, inicializamos en el tiempo la red booleana y dejamos ambos iniciales estados evolucionan a sus siguientes estados  $X_1(t + 1)$  and  $X_2(t + 1)$ , calculamos la distancia de Hamming normalizada denotada como  $h(t+1)$  ejecutamos la dinámica. Repetimos los pasos anteriores para 10,000 pares aleatorios y calculamos el comportamiento promedio sobre las realizaciones. Trazamos el valor de  $h(t)$  en el eje x y el eje y el valor de  $h(t+1)$ , también trazamos la recta identidad donde  $h(t)=h(t+1)$ . La curva de

Derrida se calculó con el paquete R

BoolNetPerturb, ubicado en <https://github.com/mar-esther23/boolnet-perturb-0.1>.

Complementariamente, el análisis de sensibilidad mostró las diferencias en los resultados dependiendo de las alteraciones en cada componente, ya sea encendiendo o apagando respectivamente. Primero, creamos 50,000 estados elegidos aleatoriamente para cada función booleana

definida como  $f(k_i)$  donde  $k_i$  son las diferentes variables  $i$  iteraciones de 1 a 29. Luego, para cada uno de estos 50,000 estados iniciales, creamos una variante o mutación aleatoriamente con un solo cambio de un bit (distancia de Hamming de 1) etiquetado  $f(k_i')$ . Finalmente, aplicamos la regla de actualización para  $k_i$  and  $k_i'$ , y calculamos la sensibilidad de la regla de actualización como la fracción de estados iniciales donde  $f(k) \neq f(k')$ . El análisis de sensibilidad se realizó utilizando el paquete de BoolNet en R.

## 5. 2. Simulación Continua de la red de polarización del macrófago.

### 5.2.1 Transformación de discreta a continuo usando lógica difusa de la red booleana del macrófago.

El enfoque Booleano nos permite comprender los mecanismos de las interacciones en la red, pero solo puede lograr valores dicotómicos. Para superar esta limitación y obtener un enfoque más realista, la red se transformó en un rango continuo. Las señales extracelulares e intracelulares pueden comportarse como variables continuas y pueden identificar atractores adicionales con estados inestables con relevancia biológica. La transformación de discreta a continua se realizó mediante la función `booleanTOODE` en el paquete `BoolNetPerturb`, al que se puede acceder en <https://github.com/mar-esther23/boolnet-perturb>. Esta función nos permite transformar las reglas booleanas en un conjunto de ecuaciones diferenciales usando reglas lógicas específicas. En nuestro modelo utilizamos un modelo de lógica difusa basado en las reglas probabilísticas y el método de Villarreal (64,65). Nuestra red reguladora consta de 29 nodos que interactúan entre sí con niveles de expresión en un tiempo  $t$  establecido por  $q_i(t)(i = 1, \dots, 29)$ . Como en los modelos booleanos, el estado de nuestros nodos está regulado por la interacción con otros nodos, que pueden ser representados por una

composición de lógica difusa  $w_i(q_i, \dots, q_{29})$ . La función característica con estructura logística puede parametrizarse de la siguiente manera:

$$\theta[w_i] = \frac{1}{1 + \exp[-b(w_i - w_{thr})]} \quad (2).$$

Donde  $b$  indica la tasa de saturación del nodo,  $w_i$  de estar suprimido (valor igual a cero) a un estado expresado (valor igual a uno). Un valor pequeño de  $b$  significa que el cambio es gradual y un valor grande indica que el cambio es brusco (66). Mientras tanto,  $w_{thr}$  representa el umbral entre la inactivación y la activación, establecemos el valor en 0.5. La representación de  $w_i$  se logra implementando las reglas probabilísticas de la siguiente manera:

Reglas Booleanas	Lógica Difusa
q AND p	$q \cdot p$
q OR p	$q + p - q \cdot p$
NOT p	$1 - p$

Una vez aplicadas las reglas probabilísticas sobre cada nodo de la red, se obtuvo un conjunto de 29 ecuaciones diferenciales, que representan cada uno de los nodos de nuestra red reguladora de polarización de macrófagos.

### 5.2.2 Dinámica de nuestro modelo en escala continua.

La simulación dinámica de los niveles de expresión de cada función está determinada por la red reguladora descrita por un conjunto de EDO de la forma:

$$dq_i$$

$$\frac{dq_i}{dt} = \theta[w_i] - \alpha_i q_i \quad (3)$$

donde  $\alpha_i$  denota la tasa de decaimiento de la expresión del nodo. En ausencia de cualquier tipo de interacción reguladora, el nodo sufre un decaimiento exponencial a una tasa  $\alpha_i$ . En esta disertación, el valor de cada  $\alpha_i$  se establece en uno, de modo que el nivel de expresión del nodo en su estado estacionario está simplemente determinado por el grado de verdad de la proposición difusa  $w_i$  (66,67).

### 5.2.3 Análisis de Polarización.

La transformación de lógica difusa nos permite evaluar alteraciones de las entradas en una escala continua. En otras palabras, podemos evaluar en un intervalo entre [0,1] cómo una citocina exógena afecta la activación o no de un componente interno

(factor de transcripción). Queremos modelar el proceso de polarización de un monocito (ausencia de una citocina polarizante) para evaluar los estados estacionarios finales en un entorno de citosina específico. Para lograr la descripción de los fenotipos de macrófagos, consideramos que un nodo se activa si su valor de estado estacionario está en  $q_i \geq 0.75$  y se inactiva cuando el valor es  $q_i \leq 0.25$ . La zona intermedia  $0.25 \leq q_i \leq 0.75$  puede corresponder a un fenotipo híbrido. Evaluar todas las condiciones iniciales posibles en esta red regulatoria continua es casi imposible porque tenemos que establecer una condición inicial para cada nodo que se encuentre en el rango de [0,1]. Para superar esta limitación, sólo evaluamos fenotipos específicos (los fenotipos con mayor cuenca de atracción, ver Figura S4) obtenidos en la configuración Booleana discreta y evaluamos cómo perturbaciones afectan el estado estacionario de un fenotipo. Todos los estados estacionarios que se encontraban en la zona intermedia se consideraron como un fenotipo híbrido (coexistencia de fenotipos) para demostrar la hipótesis del continuo

de polarización de macrófagos. El código fue adaptado de (66) y se puede acceder en [https://github.com/resendislab/ODE\\_Macrophages](https://github.com/resendislab/ODE_Macrophages).

### 5.3 Análisis Metabólico de la Polarización del Macrófago

Reciente, y de forma notable, en la literatura se han reportado perfiles metabolómicos asociados a macrófagos en monocitos (M0) y los estados M1/M2 (68). Con la finalidad de diferenciar los fenotipos metabólicos asociados a cada estado del macrófago, en esta tesis se obtuvieron los datos de metaboloma reportados previamente y se procedió a realizar un análisis diferencial. En total se analizó el perfil metabólico de 6 tipos de macrófagos: M0 (monocito), M1 (activado con LPS e IFN- $\gamma$ ), M2a (activado con IL-4), M2b (activado con LPS y complejos inmunológicos), M2c (activado con IL10) y M2d (activado con IL-6 y factor inhibidor de leucemia (LIF en inglés)). En total se seleccionaron 498 metabolitos con la identidad comprobada en la base de datos de metabolitos humanos (HMDB las siglas en inglés) (69), y sus intensidades fueron normalizadas utilizando conteo celular. Una vez normalizados, los datos permitieron realizar distintas comparaciones entre los fenotipos metabólicos. Entre los análisis comparativos que se realizaron se incluyen las diferencias fenotípicas entre el monocito y cada uno de los macrófagos diferenciados, la comparación entre el macrófago M1 y todos los macrófagos tipo M2, y finalmente la comparación entre los macrófagos de tipo M2. Para realizar las comparaciones, los datos se subieron a MetaboAnalyst 5.0 (70), se normalizaron usando la escala de pareto, y posteriormente se analizaron estadísticamente para identificar sus diferencias significativas entre condiciones. Se utilizó mínimos cuadrados parciales ortogonales a estructuras latentes discriminante análisis (O-PLSDA siglas en inglés) para poder caracterizar y observar las diferencias entre las comparaciones entre los fenotipos polarizados individualmente. El O-PLSDA nos permitió poder separar de manera sistemática variación entre dos

componentes: el primer componente con una capacidad predictiva y la segunda con una capacidad correlativa de manera ortogonal que describe la variación entre muestras. Para poder explorar la contribución de los metabolitos y sus vías en la clasificación supervisada mediante O-PLSDA, se utilizaron dos métodos de visualización: gráficas de puntuación con validación cruzada, donde se visualizan los valores de puntuación con validación cruzada (puntuación T ortogonal) en la eje “y” contra el puntaje T predictivo (puntaje T) en el eje “x” para cada punto de muestra dentro del análisis. Por otra parte, las gráficas S (las cuales indican gráficamente las diferencias de los metabolitos entre ambas condiciones) fueron utilizadas para predecir que metabolitos tienen un poder significativo donde el eje de las “x” representa la covarianza de cada metabolito al modelo y el eje de las “y” la correlación del metabolito. Con la finalidad identificar los metabolitos de mayor relevancia en clasificar los grupos, hemos considerado que cualquier metabolito que tenga una covarianza más grande que 0.2 o menos que -0.2 y una correlación mayor de 0.6 o menos que 0.6 es un metabolito significativo para dicho fenotipo de macrófago.

### 5.3.1 Análisis de Enriquecimiento de Metabolismo de la Polarización del Macrófago

El análisis de enriquecimiento funcional para los datos de metaboloma fueron realizados en la plataforma web de Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>) utilizando el algoritmo de análisis de enriquecimiento del conjunto de metabolitos (MSEA por sus siglas en inglés (71,72)). Se realizó el mismo procedimiento para todas las comparaciones de fenotipos de macrófagos. Tiene razón en los procedimientos de normalización de la Figura 7. Para el análisis de vías en función de su regulación positiva del fenotipo versus se está comparando, por ejemplo, en las comparaciones

M0 vs M1, M0 vs M2a ... etc. sería la regulación positiva de M0. Luego, esos metabolitos se anotaron lo mejor que pudimos para que coincidieran con las

listas de metabolitos de metaboanalyst y, a partir de ahí, obtuvimos nuestras puntuaciones de impacto en la ruta. Para el análisis de vías se realizó un análisis de sobrerrepresentación mediante un testeo hipergeométrico y un análisis de medidas de topología usando centralidad de grado. Este análisis inició teniendo las tablas de concentraciones de metabolitos de cada uno de los fenotipos celulares (M0, M1 y M2) y nos permitió encontrar cuales son las vías metabólicas más enriquecidas utilizando la base de datos de vías de moléculas pequeñas (SMPDB por sus siglas en inglés). La discusión de los resultados sólo incluye aquellas vías metabólicas cuyo False Discovery Rate (FDR) sean menores a 0.05.

## 6. Resultados

### 6.1 Rol del microambiente tumoral en la Polarización del Macrófago: un análisis Booleano

#### 6.1.1 Reconstrucción de redes y análisis booleano: la base molecular de la polarización de macrófagos en un microambiente tumoral

El microambiente del tumor contiene varios tipos de células, como células cancerosas, células inmunes y células mesenquimales. Las cuales tienen la capacidad de secretar citocinas que atraen a otros monocitos al tumor como una respuesta inmune natural en el huésped. El intercambio entre el microambiente tumoral y las funciones de los macrófagos debe tenerse en cuenta para poder comprender parte del proceso inflamatorio involucrado en la interacción entre los macrófagos y el cáncer. Con este fin, reconstruimos una red de señalización que comprende una variedad de



elementos reguladores asociados con la diferenciación de macrófagos. Establecimos nuestra red de interacción de la polarización de macrófagos mediante una búsqueda bibliográfica de interacciones entre componentes extracelulares y cómo estos afectan la activación o inhibición de factores transcripcionales asociados con la polarización de macrófagos. Este enfoque se denomina, en la biología de sistemas, metodología de “bottom-up”. La reconstrucción original incluyó 40 nodos, representando factores de transcripción y genes que incluían mecanismos de activación y represión entre ellos. Luego, excluimos todos aquellos nodos con menos de dos interacciones (dentro y fuera) para analizar el comportamiento dinámico de la red. Los nodos eliminados fueron los receptores de los factores extracelulares dentro de nuestro microambiente tumoral, ya que al suprimirlos no obteníamos nuevos atractores. Una suposición de nuestro modelo es que todos los receptores se encuentran activos dentro de la membrana del macrófago. Como resultado de este filtrado, hicimos el análisis booleano dinámico en una red de 29 nodos y 60 interacciones. En general, nuestra red reguladora transcripcional (TRN) integra componentes extracelulares e intracelulares, cascadas de transducción de señales y mecanismos reguladores transcripcionales. Esta red reguladora de la polarización de los macrófagos consta de dos partes, los componentes extracelulares (nodos verdes) y los factores de transcripción (nodos azules) que regulan la polarización de los macrófagos (Figura 2, Tabla S1). Entre las cascadas de señalización incluidas en nuestra reconstrucción, incluimos los siguientes mecanismos: las células cancerosas que mueren producen HMGB1 (Human Mobility Group Box 1) activando el receptor tipo Toll 4 (TLR4), en consecuencia, activando NFκB (71). Brevemente, estas señales inician la respuesta antitumoral en los macrófagos. Sin embargo, el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) también activa a NFκB a través de JAK2 y STAT5. Además, el interferón activa a STAT1, por lo que la célula libera citocinas para inhibir el crecimiento tumoral (72). Por otro lado, también describimos diferentes procesos de activación para los sub-fenotipos M2

(M2a, M2b, M2c y M2d). Primero, la activación de M2a depende de IL-4 o IL-13 los cuales activan a STAT6 (73). Al mismo tiempo, STAT6 inhibe STAT1 y NFκB a través de SOCS1 y KLF4 respectivamente, evitando al fenotipo M1. Entonces, la activación de M2b depende de las señales de AP1 o ERK. AP1 se activa por la presencia de IL-1β, mientras que ERK necesita la unión a los receptores Fc (28). A continuación, la activación de M2c se basa en la presencia de

STAT3. IL-10, glucocorticoides, TGF-β y adenosinas desencadenan a STAT3 (74). Esta cascada induce la secreción de IL-10 y la inactivación de NFκB. Finalmente, la activación de M2d depende de IL-6 o HIF1, relacionada con un ambiente hipóxico (75). Este fenotipo está presente en tumores sólidos. Esta cascada induce la secreción de IL-10, VEGF y otras citocinas. Por el contrario, la activación de cualquier sub-fenotipo M2 culmina en la liberación de citocinas, como IL-10, que potencian el crecimiento tumoral. También incluimos interacciones que describen al fenotipo M2d, un macrófago asociado a tumores y citocinas inflamatorias relevantes, como TGF-β y TNF-α. Usamos esta red para analizar dinámicamente los reguladores maestros que impulsan la transición entre varios tipos de fenotipos de macrófagos. Por lo tanto, para develar el efecto del microambiente tumoral en la polarización de macrófagos, realizamos un análisis booleano sobre esta red reguladora transcripcional reconstruida para macrófagos (Tabla S1). Nuestra red contiene un mecanismo regulador de macrófagos derivado de monocitos, como se muestra (Figura 2).

Supusimos que todos los receptores de los estímulos externos eran constitutivos. Esta suposición nos permitió eliminar las interacciones lineales y reducir el tamaño de nuestra red sin afectar las propiedades dinámicas y topológicas de nuestro modelo booleano.

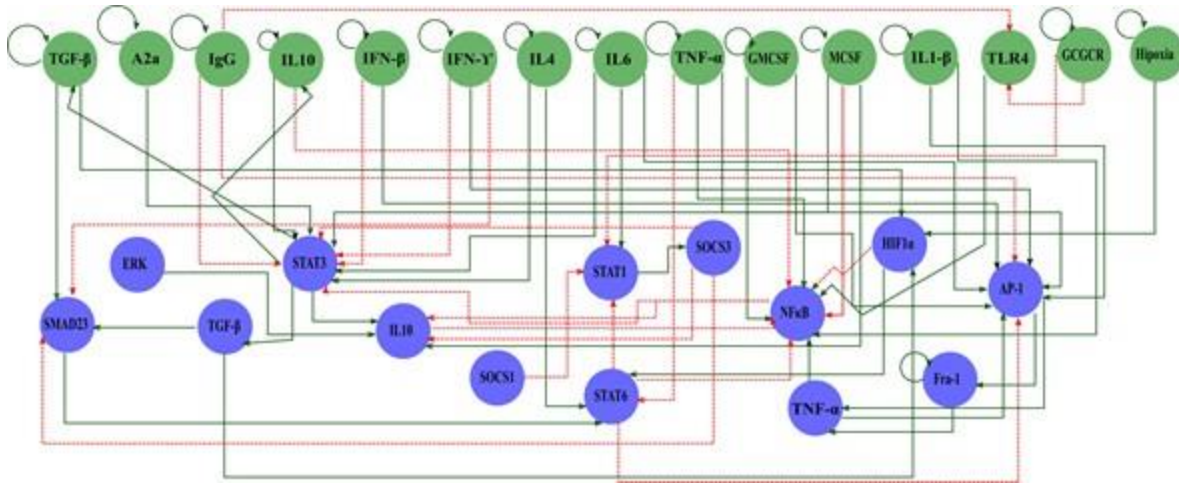


Figura 2. Red reguladora de genes de polarización de macrófagos en un microambiente tumoral. Los círculos verdes representan componentes del espacio extracelular y los círculos azules representan los componentes de la maquinaria interna. Las flechas verdes continuas representan la activación y las flechas rojas discontinuas representan la inhibición

### 6.1.2 Modelado booleano de la TRN y su espectro de fenotipos de macrófagos.

Basándonos en nuestra red de señalización reconstruida, determinamos los posibles fenotipos de macrófagos existentes en un microambiente tumoral. Nuestro modelo booleano tenía vías de señalización interconectadas, y su dinámica con las entradas externas finalmente convergen en estados estables, llamados atractores. Un atractor es un conjunto de genes activados o inactivados que no varían en el tiempo y que potencialmente representan un fenotipo de macrófago. Nombramos cada atractor según la evidencia experimental *in vitro*; consideramos seis posibles estados estacionarios asociados con un fenotipo de macrófago específico (Tabla 1). Usando una actualización sincrónica, nuestra TRN convergió en un paisaje completo de 10,430 atractores, donde 56 eran cíclicos y los restantes eran atractores simples. Los atractores simples representaron 13 fenotipos. Entre ellos, cuatro eran fenotipos de macrófagos ya descritos experimentalmente (M0, M1, M2b y M2d), y el resto eran fenotipos híbridos con dos o tres fenotipos de macrófagos expresados como marcadores al mismo tiempo. Para identificar similitudes entre atractores únicos, hicimos una proyección

bidimensional utilizando una incrustación de vecinos estocásticos distribuidos (t-SNE) y un análisis de agrupamiento (Figura S1). Empleando un consenso de 30 métricas, determinamos que el valor óptimo del clúster era 10 (Figura S2). Obtuvimos 10 grupos para 13 fenotipos (Figura 2), cada uno de los cuales incrustaba más de un atractor (Figura S3).

Fenotipo	Factores Transcripcional activados/componentes externos	
M0	Ninguno	
M1	Activación de NFκB o STAT1 o TNFα y AP1	(Malyshev and Malyshev 2015; Binnemars-Postma et al. 2018)
M2a	Activación de IL-4 & STAT6	(O'Carroll et al. 2014; Hutchins, Diez, and Miranda-Saavedra 2013)
M2b	Activación de AP1 o ERK	(Seager et al. 2017)
M2c	Activación de IL10 & STAT3	(Duluc et al. 2009)
M2d	Activación de TLR4 y A2a o HIF1A	(Solinas et al. 2009)

*Tabla 1. Fenotipos de macrófagos utilizados para nombrar cada atractor. Los atractores obtenidos después de la simulación fueron etiquetados con base en los fenotipos de macrófagos reportados en la literatura.*

Entre todos los fenotipos, siete se correlacionaron con una respuesta protumoral y cinco con una respuesta antitumoral. El microambiente tumoral condiciona la polarización de los macrófagos a fenotipos protumorales mediante la acción de la liberación de interleucinas y quimiocinas. A cambio, los macrófagos liberan factores reguladores de crecimiento e inmunitarios que permiten la proliferación y progresión de las células cancerosas. A pesar de estar en un microambiente tumoral, existen fenotipos de macrófagos con

actividad antitumoral, los cuales se enfocan en equilibrar la eliminación de células tumorales sin afectar los tejidos circundantes.

Debido a las cantidades masivas de estímulos en un microambiente tumoral, planteamos la hipótesis de que pueden existir muchos estados de activación híbrida. Manejamos los fenotipos híbridos de macrófagos como una identidad de una sola célula en lugar de una población heterogénea, como en trabajos anteriores (78) y sugerimos que un macrófago híbrido se distinguirá fenotípicamente por una combinación de marcadores de expresión asociados con los fenotipos que tiene el híbrido. Por ejemplo, el grupo A contenía fenotipos de dos híbridos (comportamiento de macrófagos mixtos) M2bM2d y M2aM2d, macrófagos asociados con la curación de heridas y el comportamiento regulador. Basándonos en su composición, llegamos a la conclusión de que este grupo era beneficioso para el crecimiento tumoral debido a la liberación de factores de crecimiento que mantienen la proliferación tumoral y citocinas reguladoras para mantener regulado al sistema inmunológico. Por otro lado, los clústeres B e I consistieron en macrófagos que eliminarían las células tumorales debido a la presencia de M1, que liberan citocinas citotóxicas al microambiente (76). El comportamiento de los clústeres C y D fue complejo debido a la composición heterogénea del fenotipo. El grupo F era un macrófago regulador y de cicatrización de heridas debido a un fenotipo híbrido marcado como M2aM2b (Tabla 2). Según nuestros resultados, un buen escenario contra el cáncer viene dado por un estado de macrófagos que aumenta el papel de aclaramiento del tumor, al liberar factores citotóxicos tumorales y disminuir los niveles de componentes asociados con el comportamiento protumoral.

Clúster	Fenotipos	Comportamiento
---------	-----------	----------------

A	M2bM2d and M2aM2d	Macrófago regulador / cicatrizante de heridas
B	M1 and M1M2d	Macrófagos activados clásicamente / macrófagos pro-tumorales
C	M1M2bM2d, M1M2bM2cM2d, M1M2b, M2d and M2M2d	Fenotipos híbridos asociados con favorecer la evasión del sistema inmune y la secreción de factores de crecimiento
D	M0, M1M2bM2d, M2b, M2d and M2bM2d	Fenotipos híbridos asociados con favorecer la evasión del sistema inmune y la secreción de factores de crecimiento
E	M1M2bM2d and M2aM2d	Macrófagos activados clásicamente / macrófagos protumorales
F	M2aM2b	cicatrizante de heridas
G	M2aM2cM2d and M2aM2bM2d	Macrófago con capacidad de regular al sistema inmune/ cicatrizante de heridas
H	M2bM2d and M1M2bM2d	Macrófago con capacidad de regular al sistema inmune / macrófagos protumorales
I	M1 and M1M2d	Macrófagos activados clásicamente / macrófagos protumorales

J	M2aM2d and M2aM2bM2d	Regulatorio / macrófagos protumorales
---	----------------------	---------------------------------------

Tabla 2 Descripción de los resultados obtenidos del agrupamiento de k-medias sobre el espacio t-SNE 2D. El comportamiento fenotípico de cada grupo fue aproximado por los criterios de clasificación utilizados por (79).

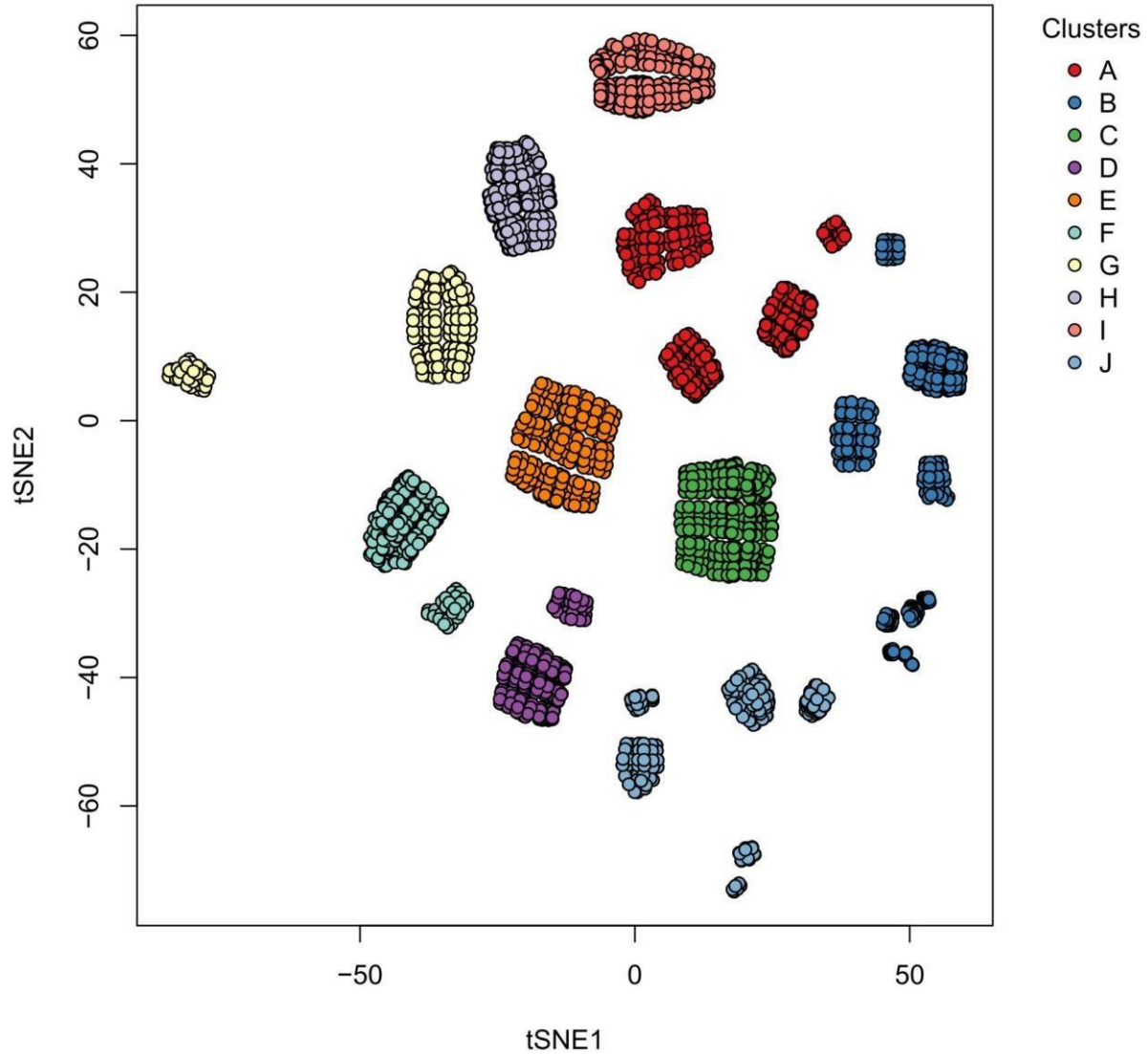


Figura 3. Grupos de atractores de tamaño único obtenidos en las simulaciones booleanas. Cada círculo representa una proyección dimensional de un atractor, y el color representa una colección de atractores con fenotipos similares entre ellos. Los números asociados con los clústeres se explican en la Tabla 1.

### 6.1.3 La alteración de la función mediante una pérdida o ganancia los subtipos de macrófagos.

En esta sección, evaluamos computacionalmente la importancia de cada nodo en la estabilidad de los fenotipos obtenidos. Para ello, realizamos un borrado (poner el valor del nodo a cero) o activación (fijar el valor del nodo a uno) permanente de cada nodo en el análisis dinámico de la TRN. Para cuantificar el efecto producido por estas perturbaciones, aplicamos la siguiente ecuación:

$$\log_2 \left( \frac{M_{+-i}}{WT_i} \right)$$

donde  $WT_i$  denota el tamaño de la cuenca de atracción para el atractor “i” sin alteraciones, y  $M_{+-i}$  denota la cuenca de atracción para el atractor “i” por pérdida (-) y ganancia (+) de función respectivamente. Como era de esperar, la ecuación anterior se limita a aquellos casos en los que  $WT_i \neq 0$  y ambas variables están definidas positivamente. El tamaño de la cuenca de atracción de WT se muestra en la Figura S4. La Figura 4 muestra el pliegue logarítmico del tamaño de la cuenca de atracción cuando comparamos genes perturbados y no perturbados (WT) indicados por columnas. Las áreas grises indican atractores que estaban en estado salvaje pero no en estado perturbado. Un atractor con un macrófago M1 será un fenotipo antitumoral, y con el macrófago M2, un fenotipo protumoral (filas). Cada columna es una activación o inactivación de un factor de transcripción.

Observamos que la activación permanente de AP-1, genera híbridos con capacidad de eliminar células tumorales (M1). En cambio STAT1 genera fenotipos asociados con capacidad de eliminación de células tumorales y de componentes implicados a recuperar el tejido. La activación de NFκB no genera ningún tipo de cambio en los fenotipos. La activación de AP-1 y STAT1 disminuyó en un 100% de fenotipos protumorales y un 20% de fenotipos antitumorales. Estos factores de transcripción pueden recuperar el



equilibrio hacia un escenario de eliminación de tumores en el microambiente tumoral (áreas grises Figura 4A, Figuras S5 y S6 respectivamente). La activación permanente de NFκB mantuvo el mismo comportamiento que los factores de transcripción previos porque disminuyó a un fenotipo 100% protumoral y 20% fenotipos antitumorales, creando un perfecto equilibrio de eliminación tumoral y recuperación del tejido debido a la secreción de interleucinas citotóxicas y interferones (áreas grises en la Figura 4A y las Figuras S5 y S6 respectivamente). Por otro lado, las expresiones constitutivas de HIF1-α o TGFβ eliminaron macrófagos M1 puros (Figura 4A) y disminuyeron los perfiles disponibles que convergieron a híbridos con M1 como componente. HIF1-α y TGF-β promovieron el desarrollo de comportamiento maligno en macrófagos. Una vez activado, HIF1-α disminuyó un 22% de fenotipos antitumorales (Figura S6) y aumentó un 40% de fenotipos protumorales (Figura S5). Concluimos que las células deben evitar la presencia de HIF1-α en un microambiente tumoral. Además, TGF-β tuvo el mismo comportamiento que HIF1-α (Figuras S5 y S6, respectivamente), por lo que las células deberían evitar su secreción y presencia para revertir la proliferación del cáncer. Sin embargo, nuestra hipótesis es que la modulación del equilibrio a fenotipos antitumorales podría ser suficiente para disminuir el TGF-β.

Por el contrario, las expresiones constitutivas de NFκB o STAT1 mantuvieron los fenotipos M1M2b y M1M2d, respectivamente. Ambos fenotipos híbridos con capacidad tumoricidal. Curiosamente, la sobreexpresión de NFκB y STAT1 podría ser una estrategia terapéutica potencial porque promueven fenotipos que podrían equilibrar el comportamiento de los macrófagos en un microambiente tumoral, favoreciendo la capacidad tumoricidal (Figura 4A).

Por otro lado, encontramos un desequilibrio en el tamaño de los atractores de la cuenca cuando eliminamos algunas expresiones de factores de transcripción por separado (Figura 4B). Nuestro análisis *in-silico* nos permitió concluir que si eliminamos la expresión de Fra-1, el M1 y el híbrido

M1M2b producían un ligero aumento en su tamaño de la cuenca de atracción, implementando una capacidad de erradicación tumoral. Además, observamos que la falta de Fra-1 no influyó en el desarrollo del fenotipo M2d. Desactivar los fenotipos aumentados de HIF1- $\alpha$  asociados con la capacidad tumoricida (M1 y M1M2b), lo que denota la importancia de no expresar estos factores de transcripción para eliminar las células tumorales (Figura S7). Sin embargo, afectar solo a la actividad de HIF1- $\alpha$  es insuficiente porque mejora los fenotipos protumorales en un 36% con respecto a la red sin perturbaciones (Figuras 4B y S8). Por lo tanto, teníamos una defensa típica del huésped al activar los receptores gamma y liberar IFN- $\gamma$  al microambiente. En particular, a diferencia del análisis de activación de genes, observamos la aparición de algunos fenotipos puros, M2a y M2c, que tienden a favorecer la progresión tumoral cuando eliminamos HIF1 $\alpha$ .

Además, observamos que la eliminación de STAT3 inhibe fenotipos específicos para la erradicación de tumores e híbridos con comportamiento antitumoral en un 33% (Figura S7). La inactivación de STAT3 disminuyó el 63% de los fenotipos protumorales, implicados en la regulación del sistema inmunológico (M2c) mediante la activación de NF $\kappa$ B (Figura S8). La eliminación de STAT6 no afecta a los fenotipos antitumorales (Figura S7), pero deteriora la cuenca de atracción de los fenotipos. El fenotipo M2c liberó IL-10 en el microambiente creando un escenario para la evasión del tumor y mejorando la capacidad de hacer metástasis del tumor. De acuerdo con estos hallazgos, la evidencia biológica sugiere que la inactivación de los factores transcripcionales STAT3 y STAT6 están asociados con la reducción del crecimiento tumoral y la metástasis en un modelo de cáncer de mama y pulmón (76,80).

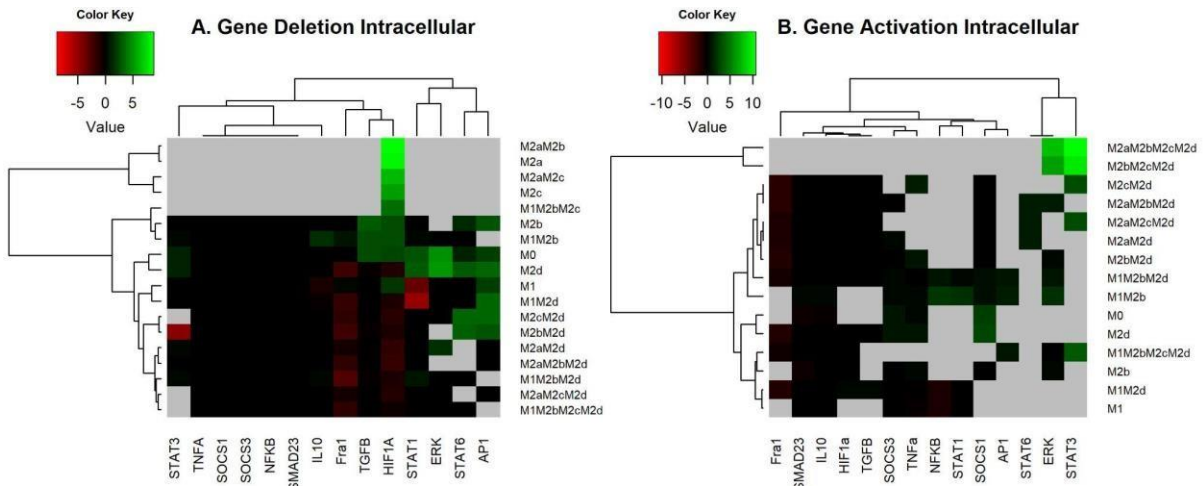


Figura 4. Mapa de calor de la sobreexpresión y eliminación de factores transcripcionales. (A) Mapa de calor de la sobreexpresión de factores transcripcionales de polarización de macrófagos. Mantuvimos la expresión del nodo como 1, simulamos y revisamos los atractores obtenidos. Toda la sobreexpresión se comparó con la de tipo salvaje (red original) con un cambio de  $\log_2$  veces. (B) Mapa de calor de Knock-outs de factores transcripcionales de polarización de macrófagos. Los nodos se fijaron permanentemente con un valor de 0; las perturbaciones se fueron realizando una a una hasta alcanzar los atractores. Comparamos los fenotipos del tipo salvaje con las perturbaciones mediante un cambio logarítmico. Las regiones verde y roja indican aquellos atractores cuyo tamaño de la cuenca de atracción aumentó o disminuyó después de la perturbación. En negro, denotamos aquellos atractores con pocos efectos en el tamaño de atracción de la cuenca versus WT y después de la perturbación. Las áreas grises indican aquellos atractores que existen en el tipo salvaje pero que no permanecen perturbados.

#### 6.1.4 La polarización de los macrófagos desarrolla una retroalimentación con los microambientes

Los microambientes tumorales dan forma al comportamiento de la diferenciación de macrófagos a su disposición. Para evaluar cómo las señales microambientales alteran el proceso de polarización de macrófagos, analizamos seis entornos de señalización diferentes, asociados a cada fenotipo de macrófago: estados M0, M1, M2a, M2b, M2c y M2d (ver Tabla 3) (80,81).

La figura 5 muestra el logaritmo de la cuenca de atracción de los atractores obtenidos en dichos microambientes. Las áreas grises indican que el fenotipo no estaba presente en el microambiente específico. A pesar de

que el modelo Booleano es un análisis simplificado, podemos destacar algunos comportamientos globales sobre cómo da forma al fenotipo de los macrófagos. Por ejemplo, el microambiente de monocitos (Pro-M0) tiende a inducir tres fenotipos a una tasa baja: M0, M1 y M2d. Fra1 puede dar una posible explicación subyacente al incremento en el tamaño de la cuenca de atracción para M2d. La regulación positiva de Fra1 finalmente activa NFκB, que a su vez inducirá el fenotipo de macrófagos M1.

Fenotipos de Macrófagos	Estímulo
M0	No hay estímulo externo
M1	IFN- $\gamma$ y IFN- $\beta$
M2a	IL4 y TGF- $\beta$
M2b	IgG y glucocorticoides
M2c	IL10 y IL6 y MCSF
M2d	adenosinas e hipoxia y glucocorticoides

*Tabla 3. Microambientes asociados con subtipos específicos de macrófagos. Microambiente para los seis fenotipos de macrófagos modelados en nuestra red reguladora de genes. En el lado derecho de la tabla, tenemos los fenotipos y los nodos que se mantuvieron durante la simulación hasta que se alcanzó un atractor.*

Además, nuestro análisis computacional sugiere que el microambiente Pro-M1 disminuye los fenotipos reguladores y de cicatrización de heridas y mejora la capacidad tumoricidal (Figura 5). En contraparte, el microambiente Pro-M2b disminuye la capacidad tumoricidal, favoreciendo el fenotipo de los macrófagos para la progresión tumoral y la regulación inmune. Este microambiente solo induce fenotipos híbridos o simples asociados con el

fenotipo de macrófagos M2b. Por otro lado, los microambientes M2c mantienen fenotipos híbridos asociados con la proliferación tumoral y componentes de cicatrización de heridas, como la angiogénesis. Además, notamos que las citocinas reguladoras como IL-10 e IL-6 en el microambiente Pro-M2c disminuyeron toda la posible actividad híbrida citotóxica en macrófagos. Este hallazgo puede explicar la actividad citotóxica en un microambiente protumoral (82). Sin embargo, se prefirió la población M2 sobre M1 porque tenían componentes de microambiente específicos (Pro-M2c) para mantener este desequilibrio (Figura 5). Además, el microambiente M2d no genera ningún macrófago asociado con capacidad tumoricida; solo activa macrófagos implicados en la cicatrización de heridas (angiogénesis y recuperación de tejidos) y fenotipos que regulan las acciones del sistema inmunológico en la eliminación de tumores.

Los fenotipos de macrófagos fueron susceptibles a microambientes locales que gobiernan dentro de un tumor. Estos microambientes pueden inducir heterogeneidad en la composición de fenotipos de macrófagos junto con la geometría del tumor. Esto nos permitió concluir que las señales ambientales pueden mejorar subtipos específicos de macrófagos. Creemos que estos fenotipos aumentarán su estabilidad debido a la expresión continua de su señal externa. Sin embargo, el comportamiento antitumoral ocurre incluso en la activación del comportamiento protumoral por señales externas, pero con menor estabilidad. Este tipo de esquema de modelado y simulaciones pueden ayudar a desarrollar estrategias terapéuticas para asegurar la estabilidad a pesar del microambiente que actúa contra el tratamiento de un tipo de cáncer específico (83,84).

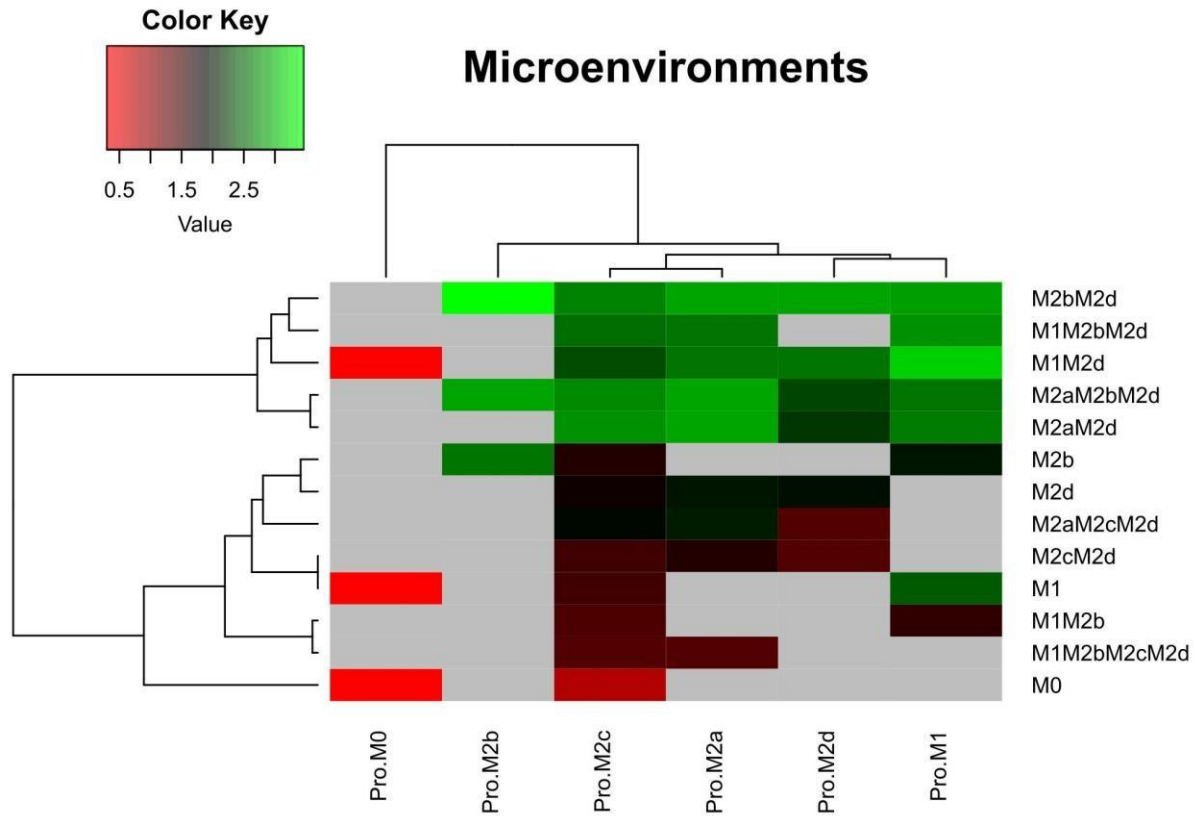


Figura 5. Mapas de calor de los microambientes de polarización de macrófagos. Microambientes asociados a los seis fenotipos evaluados en este trabajo. Para estas simulaciones utilizamos los criterios de la Tabla 3. Una vez obtenidos los atractores, aplicamos una transformación logarítmica sobre el tamaño de la cuenca de atracción para cada fenotipo. El rojo representa una cuenca de pequeña atracción y el verde para una cuenca de grande atracción. Pro significa que modelamos la polarización en un adyuvante de microambiente para cada subtipo de macrófagos. M0: monocitos.

### 6.1.5 La importancia de los componentes moleculares en la determinación de los macrófagos del destino celular

Esta sección está dedicada a analizar la estabilidad (con respecto a mutaciones en el microambiente) de cada atractor obtenido previamente, a través de un análisis de perturbación genética, para evaluar la plasticidad, y posible transición entre los subfenotipos de macrófagos. Como se mostró anteriormente, estos análisis son beneficiosos para describir y descubrir las propiedades globales de la red de TRN. Como resultado de este estudio, detectamos un panorama global de sus posibles transformaciones entre ellos (Figura 6). Para lograr esto, modificamos el estado de cada nodo en el atractor para identificar posibles transiciones entre ellos. Si el valor del nodo era 1, cambiamos a 0 y viceversa. Luego evaluamos si esta modificación afectaba la estabilidad del fenotipo en la red para identificar posibles transiciones entre ellos. En particular, observamos que solo se permitían algunas transiciones entre atractores; además, estas transiciones dependían de diferentes alteraciones genéticas. Como era de esperar, los fenotipos con la mayor cuenca de atracción fueron más estables ante las perturbaciones (Figura S4). Este análisis nos permitió concluir que M0 (monocito) tenía una baja estabilidad y era propenso a convertirse en otros fenotipos de macrófagos bajo perturbaciones (Figura 6A). Por ejemplo, M1 puede diferenciarse de M0 mediante la activación de STAT1, IFN- $\gamma$  o IFN- $\beta$ , pero M1 puede re-polarizarse a M0 (monocito) activando la función inhibidora de SOCS1. Estas polarizaciones eran irreversibles, lo que significa que una vez que cambian al nuevo fenotipo, no pueden volver a los monocitos (Figura S9).

Por otro lado, nuestro modelo sugirió que M2b es un estado posible de lograr a partir de M0, esto activando la inmunoglobulina G (IgG). Las células B liberan IgG al igual que las células cancerígenas (85,86), por lo que el fenotipo M2b se puede inducir directamente a partir de monocitos y no necesariamente tiene que pasar primero de un macrófago activado por TLR4 y luego cambiar a M2b (29). La transición de M0 a M2d obtenida activando HIF1 $\alpha$ , TGF- $\beta$  o adenosinas conduce a la inactivación de cualquier factor

transcripcional de comportamiento citotóxico; esta transición fue reversible (Figura S9). Cabe destacar que nuestras simulaciones nos permiten postular que los fenotipos más complejos, los híbridos, se pueden obtener a partir de M0. Por ejemplo, el macrófago tumoricida/regulador correspondiente a M1M2b obtenido activando AP1, NFκB e IL1-β, es una transición irreversible.

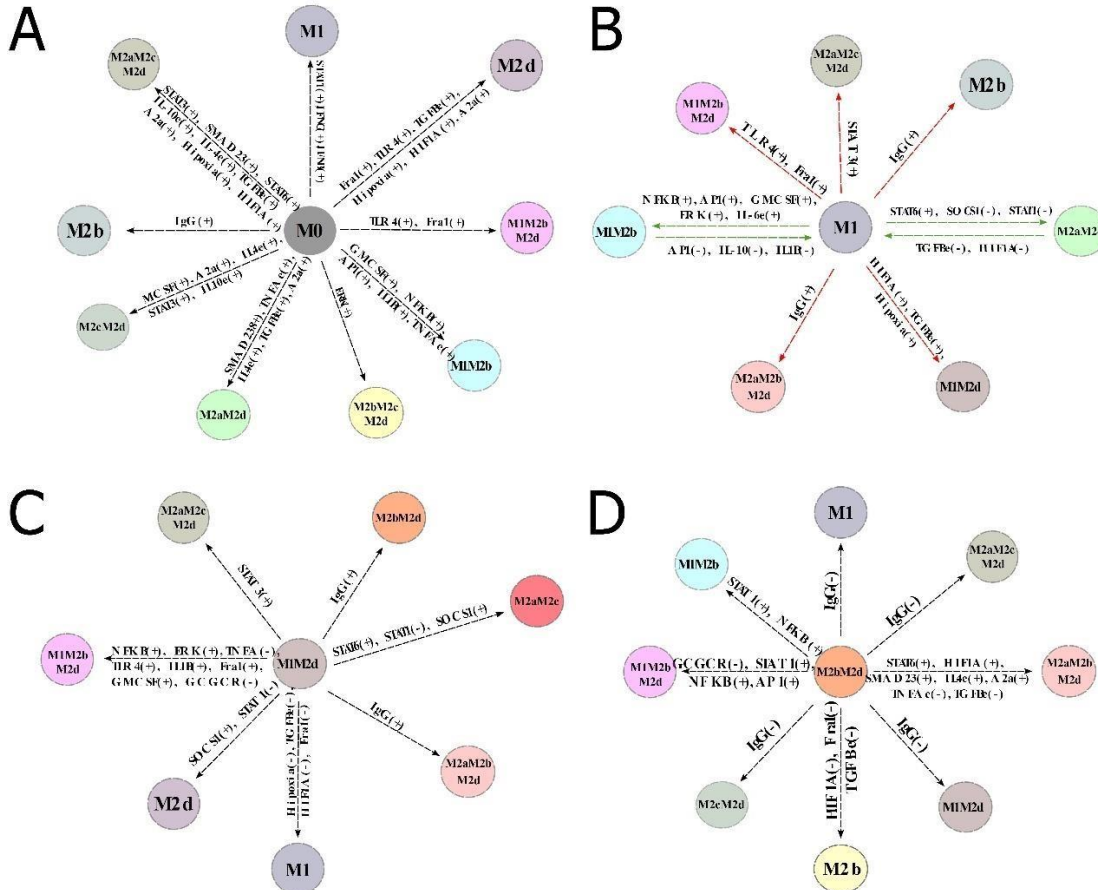


Figura 6. Mapa de destino celular de la polarización de macrófagos. De todos los atractores obtenidos, cambiamos el valor del nodo y mantuvimos esta perturbación hasta que se alcanzó un atractor. Si el atractor pasa a otro fenotipo, lo representamos con una línea y el nuevo fenotipo obtenido por la perturbación. El signo más (+) significa que el nodo se apagó y lo encendimos, mientras que el signo menos (-) significa que la perturbación estaba encendida y lo apagamos. (A) Mapa de destino celular de monocitos (M0). (B) Mapa de destino celular del macrófago M1. (C) Mapa de destino celular del macrófago M1M2d. (D) Mapa de destino celular del macrófago M2bM2d. Los colores representan diferentes estados de polarización de macrófagos.



Otra observación interesante es que el macrófago citotóxico denominado M1 fue estable para la mayoría de las perturbaciones (Figura 6B). Por ejemplo, cuando activamos AP1, el fenotipo M1 se convierte en un fenotipo híbrido (M1M2b) que mantiene su capacidad citotóxica combinada con un comportamiento regulador. Este cambio es reversible ya que los macrófagos pueden cambiar a un fenotipo M1 inactivando AP1 (Figura S9). Además, M2b se obtuvo de M1 activando IgG, lo que indica la importancia de los complejos inmunes para seleccionar esta trayectoria. No es necesario que sea primero un macrófago activado por TLR4 para hacer la transición al fenotipo M2b. El fenotipo híbrido M1M2d (Figura 6C) puede favorecer la eliminación del tumor y la recuperación del tejido. Basándonos en nuestro modelo, observamos este fenotipo que limita al macrófago a una condición hipóxica, activando permanentemente a TGF- $\beta$ . El fenotipo M1 se puede obtener a partir de M1M2d, desactivando la hipoxia o TGF- $\beta$ , pero ambas condiciones extracelulares están presentes la mayor parte del tiempo en un microambiente tumoral. En este contexto, la búsqueda de un fenotipo híbrido con beneficios teóricos como M1M2d parece ser una mejor estrategia que inducir el fenotipo M1 en un microambiente tumoral. También observamos que M1M2d, un estado tumoricida / regulador, puede cambiar a la etapa de macrófagos M2d. Esta polarización se alcanza activando SOCS1 (inhibiendo STAT1) o desactivando STAT1 (factor de transcripción M1). En particular, el análisis de perturbaciones sugiere la aparición de un nuevo fenotipo de M1M2d; un fenotipo irreversible híbrido marcado como M2aM2c (Figura S9). M2aM2c tiene un comportamiento regulador/protumoral que favorece el crecimiento y la evasión tumoral, y se promueve activando STAT6 desde M1M2d. M2bM2d tiene más estabilidad en comparación con los otros fenotipos (Figura 6D). La IgG es un factor crucial que dicta el comportamiento de este fenotipo, por lo que, al desactivar este nodo, el fenotipo híbrido puede cambiar a varias etapas de macrófagos tumoricida, incluido M1, un fenotipo irreversible de M2bM2d (Figura S9). El fenotipo M2b derivado de M2bM2d al apagar la acción de HIF1 $\alpha$  y dejar la expresión de ERK, permite la secreción

de IL-6, una citocina pleiotrópica y regulador inmune de IL-10. Finalmente, activar STAT1 o NFκB de M2bM2d es suficiente para pasar a un fenotipo tumoricida / regulador, etiquetado como M1M2b.

Por último, existe una creciente evidencia apoyando que la plasticidad es una propiedad en la respuesta del sistema inmunológico en conjunto. Aquí proporcionamos evidencia de que la respuesta de los macrófagos no es la excepción. Aunque los macrófagos se polarizan en función de factores externos, podemos manipularlos para influir la polarización hacia fenotipos benéficos. Este análisis nos permitió identificar posibles puntos de control genético como NFκB y HIF1α, que podrían servir como posibles dianas moleculares contra el cáncer modificando los fenotipos de macrófagos.

#### 6.1.6 Análisis teórico de HIF1-α y NFκB

A pesar de su complejidad y variabilidad, la modulación del microambiente tumoral es una estrategia atractiva para reducir el fenotipo de las células cancerosas (87). Por ejemplo, en nuestro modelo, el factor de transcripción más relevante para la polarización al fenotipo M1 o híbrido M1 es a través de la activación de STAT1 o

NFκB; estos hallazgos concuerdan con un informe anterior (88). Por el contrario, la activación de HIF1-α se asocia con la reducción de macrófagos antitumorales y con una mejora de los macrófagos pro-tumorales. Concluimos que la inactivación de HIF1α y la activación de NFκB o STAT1 podrían ser acciones críticas para cambiar el equilibrio hacia un microambiente anti-tumoral en lugar de uno pro-tumor.

Con la finalidad de explorar posibles estrategias que favorezcan el equilibrio protumoral, diseñamos dos macrófagos teóricos modificados genéticamente: HIF1-α = 0 & NFκB = 1 y HIF1-α = 0 & STAT1 = 1. El análisis dinámico restringido por la inactivación de HIF1-α y la activación de NFκB mostró una reducción significativa en el número de atractores, 4096, frente a los 10430

obtenidos inicialmente. Los atractores disminuidos  $HIF1-\alpha = 0$  &  $STAT1 = 1$  (3840) distribuidos en cuatro fenotipos (Figura S10). Por el contrario,  $HIF1-\alpha = 0$  &  $NFkB = 1$  tenía solo dos fenotipos (Figura 7A); esta modificación funcionó como nuestro macrófago genéticamente modificado teórico (TGEM).

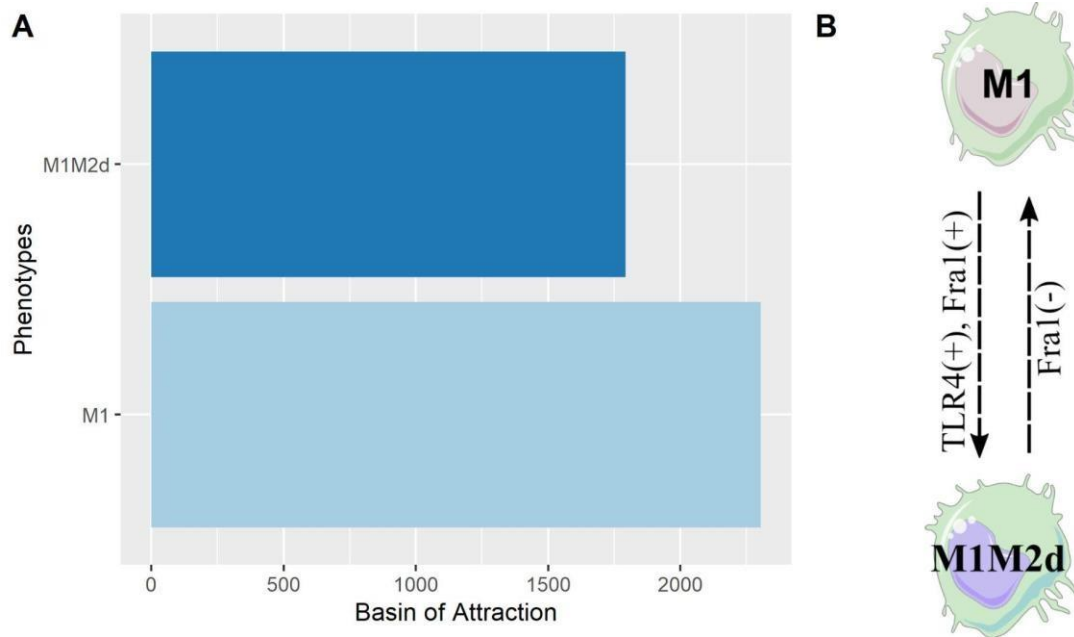


Figura 7. Atractores y mapa de destino celular de nuestro TGEM. (A) Gráfico de barras de los atractores obtenidos de nuestro macrófago teórico modificado genéticamente. Para este análisis, establecimos el valor de  $NFkB$  en 1 y  $HIF1-\alpha$  en 0, y simulamos hasta que obtuvimos estos atractores. (B) Mapa de destino celular de nuestro teórico macrófago genéticamente modificado. Al analizar la plasticidad de los fenotipos a través de la perturbación de un solo gen del macrófago modificado genéticamente, obtuvimos las reglas de la perturbación genética que contribuyen a la transición entre los fenotipos de macrófagos. Aquí (-) significa que el nodo se apagó y (+) significa que el nodo se encendió

Notablemente, todos los atractores pertenecían a dos fenotipos, un fenotipo M1 y un estado híbrido M1M2d donde la acción citotóxica siempre estuvo presente, pero teniendo la contraparte M2d para disminuir el daño

causado por la función citotóxica. M1 fue el más estable debido a su cuenca de atracción, mientras que M1M2d fue el menos estable. Para caracterizar mejor la dinámica de este circuito *insilico*, desarrollamos un mapa de destino celular para nuestro TGEM para reconocer qué genes pueden transitar de un fenotipo a otro. Sorprendentemente, identificamos una transición reversible entre M1 y M1M2d, impulsada principalmente por Fra-1 y el receptor 4 tipo toll (TLR4) (Figura 7B). Este hallazgo nos condujo a postular que nuestro TGEM alternará entre estos dos fenotipos sin desarrollar nuevos fenotipos; ambos son resistentes a las perturbaciones.

Nuestro macrófago modificado genéticamente con STAT1 activado (STGEM). STGEM desarrolla cuatro fenotipos, todos con un estado híbrido en el que la acción citotóxica siempre estuvo presente (Figura S10A). M1M2b fue el fenotipo más estable, mientras que M1M2d fue el menos estable. El mapa de destino celular de STGEM es más complicado que el de TGEM. La transición de M1 a M1M2b está marcada por la activación de STAT3 y ERK, activada por interleucinas comunes en un microambiente tumoral como IL-10, TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$ . El resto del mapa representado en la Figura S10B, los cuatro fenotipos se alternan entre ellos sin ningún fenotipo nuevo. Según esta información, STGEM puede ser útil como estrategia para eliminar las células tumorales. Debido a la naturaleza y simplicidad de los fenotipos obtenidos en TGEM, puede ser una opción óptima para una estrategia inmunoterapéutica para modular el microambiente tumoral para eliminar las células tumorales.

Finalmente, concluimos que nuestro TGEM *in-silico* (definido conceptualmente por la activación e inactivación permanente de NF $\kappa$ B y HIF1- $\alpha$ , respectivamente) inducía fenotipos contra las células cancerosas en el microambiente tumoral. Balanceamos las características M1 que liberan todos los componentes involucrados en la fase de eliminación de la inmunovigilancia del cáncer y las sustancias para resolver la inflamación y el daño tisular causado por el cáncer, generando una relación M1 / M2 con

buen pronóstico. Además, los fenotipos provenientes de nuestro TGEM eran robustos y solo ciertos factores de transcripción podrían redirigir la expresión de otro fenotipo (Figura 7B).

### 6.1.7 El macrófago modificado genéticamente teóricamente resiste las perturbaciones en un microambiente de cáncer de mama.

Dada la evidencia experimental y los resultados previos de la relación intrínseca y determinante de los microambientes en la polarización de los macrófagos, desarrollamos un microambiente *in-silico* basado en evidencia experimental. Decidimos simular las alteraciones en el microambiente de nuestro TGEM anterior. Las alteraciones del microambiente se asocian con un pronóstico adverso en otros estudios (89). Definimos el estado (activo o inactivo) de todos los nodos extracelulares presentes en el microambiente del cáncer utilizando datos multi ómicos del cáncer (90). Calculamos los genes expresados diferenciales entre las células de cáncer de mama y el tejido sano para estimar qué nodos extracelulares están presentes y luego fijamos el estado de todos los nodos extracelulares en nuestra red. En el caso particular de componentes como inmunoglobulina G (85), adenosinas (91), glucocorticoides (92), y bajo hipoxia (93), todos estos se activan (uno) debido a reportes previos que avalan su actividad en muestras de pacientes con cáncer de mama. En general, simulamos nuestro macrófago genéticamente modificado teórico (TGEM) en cuatro microambientes de cáncer de mama diferentes para evaluar su comportamiento y determinar si este enfoque farmacéutico podría ser adecuado. Los microambientes analizados fueron IgG y A2a; IL10 y TGF- $\beta$ ; IL-1 $\beta$  e IL 6; Hipoxia y glucocorticoides.

Primero, evaluamos la modificación del comportamiento de nuestro TGEM en microambientes específicos de cáncer de mama de acuerdo con condiciones previas. Los fenotipos obtenidos cambiaron globalmente y

encontramos dos nuevos fenotipos: M1M2b y M1M2bM2d. Ambos fenotipos tienen la función M1 creando un microambiente citotóxico / regulador (Figura 8A). El microambiente más complicado fue cuando estaban presentes adenosinas e inmunoglobulina G. Observamos solo dos fenotipos: M1M2b y M1M2bM2d, mientras que M1 y M1M2d estaban ausentes. Este análisis sugirió que IgG y A2a podrían inhibir funciones del macrófago M1 a través de la inactivación de TLR4 y, en consecuencia, la activación de NFκB. Las adenosinas también pueden inhibir NFκB; ambos componentes crearon un microambiente complicado para el desarrollo de más macrófagos de tipo M1.

Sin embargo, los fenotipos generados en este microambiente pueden ayudar a eliminar las células tumorales y equilibrar el microambiente hacia uno más adecuado para crear macrófagos antitumorales. Los microambientes restantes desarrollan cuatro fenotipos de macrófagos (M1, M1M2b, M1M2bM2d y M1M2d) con diferentes proporciones cada uno. Tenemos suficientes macrófagos M1 puros y componentes M1 en los otros fenotipos para cambiar el equilibrio hacia un microambiente de eliminación de tumores, pero que los componentes reguladores no causen más daño de la actividad citotóxica (Figura 8A).

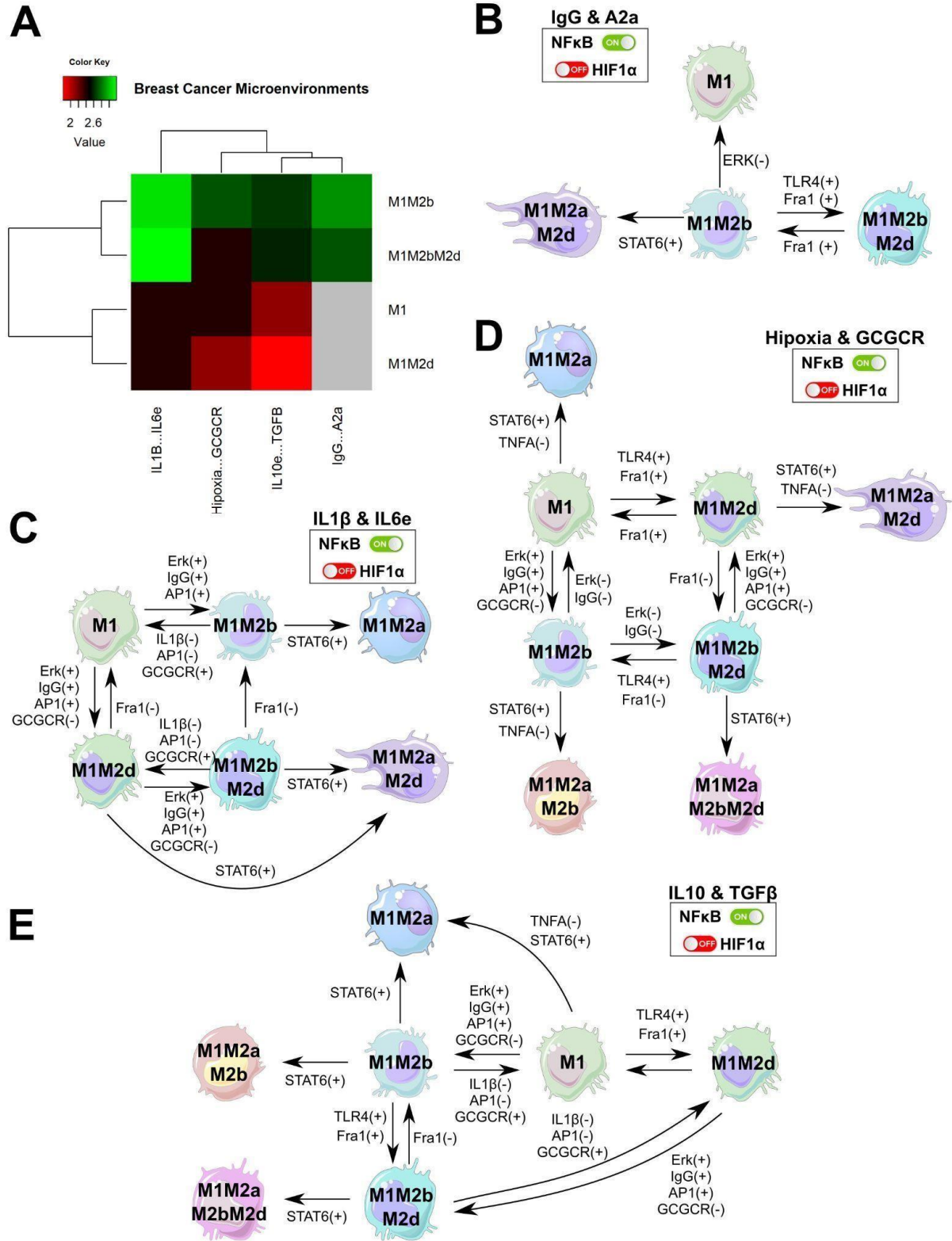


Figura 8. *TGEM* en un microambiente de cáncer de mama. (A) Diseñamos diferentes microambientes asociados con el cáncer de mama y evaluamos cómo se comportaba nuestro *TGEM*. (B) Mapa de destino celular del macrófago teórico modificado genéticamente en el microambiente del cáncer de mama para la expresión de IgG

*y adenosinas. (C) Mapa de destino celular del macrófago modificado genéticamente teórico en el microambiente del cáncer de mama para la expresión de IL1- $\beta$  e IL-6. (D) Mapa de destino celular del macrófago genéticamente modificado teórico en el microambiente del cáncer de mama para la expresión de hipoxia y glucocorticoides (GCGCR). (E) Mapa de destino celular del macrófago modificado genéticamente teórico en el microambiente del cáncer de mama para la expresión de IL-10 y TGF- $\beta$ . Este análisis fue para evaluar la estabilidad de nuestro enfoque farmacéutico en un escenario de cáncer de mama.*

En las figuras 8 B-E, representamos el mapa de destino celular de nuestro TGEM en los cuatro microambientes de cáncer de mama evaluados. En general, STAT6, una vez que se activa, puede cambiar los fenotipos agregando los componentes M2a, y este cambio es irreversible. Aunque en el entorno IgG y A2a no teníamos los fenotipos M1, podemos obtenerlo inhibiendo la función de Erk en los fenotipos M1M2b. Esta transición es irreversible. Los fenotipos M1M2b y M1M2bM2d crean retroalimentación entre ellos activando Fra1 o TLR4 para que transiten de M1M2b a M1M2bM2d; esta transición puede ser reversible inhibiendo la expresión de Fra1. Este microambiente complicado en nuestro TGEM puede ser un obstáculo. Sin embargo, a partir de los fenotipos obtenidos y el (M1) obtenido, nuestro TGEM aún puede eliminar las células tumorales al lado del microambiente (Figura 8B).

En el microambiente IL1 $\beta$  e IL6, M1 y M12b desarrollan retroalimentación entre ellos donde las transiciones son reversibles. Esta retroalimentación puede crear un equilibrio en el ambiente donde el sistema inmunológico puede eliminar las células tumorales y recuperar el tejido dañado causado por las funciones citotóxicas (Figura 8C). En condiciones hipóxicas (Figura 8D), nuestro TGEM aún desarrolla macrófagos con la capacidad de eliminar células tumorales. La falta de oxígeno no afecta la retroalimentación entre M1-M1M2b y M1M2d-M1M2bM2d. En este microambiente, que carece de



oxígeno, la activación de STAT6 puede servir como agente de adaptación. Debido a que STAT6 está asociado con la regulación del metabolismo de los lípidos, nuestros macrófagos pueden obtener suficiente energía de los lípidos para liberar interleucinas citotóxicas en este microambiente y eliminar las células tumorales. Desde una perspectiva teórica, la activación de STAT6 en nuestro TGEM en un escenario hipóxico no es algo que queramos evitar (94). Finalmente, en la figura 8E, un microambiente con actividad reguladora en las funciones citotóxicas de los macrófagos no afecta la creación de fenotipos para eliminar las células tumorales. M1 y M1M2b desarrollan la misma retroalimentación que el microambiente anterior.

M1M2bM2d y M1M2d crean retroalimentación entre ellos; las modificaciones del tránsito entre fenotipos son reversibles.

En resumen, el modelo booleano de la TRN que imita el espacio factible de los fenotipos de macrófagos sirve como plataforma para crear hipótesis del mecanismo de control que promueve el fenotipo del cáncer. Postulamos que TGEM asociado con estados proinflamatorios puede ser un posible enfoque farmacéutico porque es muy resistente a la perturbación permanente en un microambiente de cáncer de mama. Esta hipótesis tiene que ser probada experimentalmente, objetivo que constituye una perspectiva de este trabajo.

#### 6.1.8 Análisis de la robustez y sensibilidad de nuestra red reguladora transcripcional de polarización de macrófagos en un microambiente tumoral.

Una red de regulación genética robusta tiene que ser resistente a pequeños cambios o perturbaciones en la red. Definimos la robustez como una característica de la invarianza de comportamiento, de acuerdo con los cambios en sus variables internas. No obstante, las redes reguladoras de genes o cualquier red biológica que represente el comportamiento fenotípico de las células deben adquirir la capacidad de responder adecuadamente a los estímulos externos y evitar las perturbaciones por ruido de activación molecular. La necesidad de esta red reguladora para ser robusta es que

podría ser ligeramente controlable, donde podríamos conocer la respuesta a una perturbación específica.

Una representación matemática de una red reguladora de genes se puede clasificar como régimen ordenado, crítico o caótico. Las redes ordenadas pueden responder muy bien a las perturbaciones y a los estímulos externos que no las afectan a todas. Las redes críticas con una mezcla de comportamiento entre una ordenada y una caótica pueden ser resistentes a un subconjunto específico de perturbaciones. Por último, las redes caóticas se ven gravemente afectadas por perturbaciones, de modo que perturbaciones similares pueden generar respuestas diferentes (95). Para evaluar el comportamiento de la dinámica de nuestra TRN de polarización de macrófagos obtuvimos las curvas de Derrida, ver Figura 9A. Para determinar la pendiente de la curva alrededor de  $x = 0$  y clasificar el comportamiento dinámico de nuestra red, aplicamos una prueba de bondad de ajuste chi-cuadrado con las coordenadas de los valores promedio de Hamming antes del punto de intersección entre ambas curvas.

Consideramos los valores observados como las distancias de Hamming promedio representadas en el eje y del gráfico. Simultáneamente, consideramos los valores esperados como las distancias de Hamming promedio descritas en la línea de identidad ( $y = x$ ). A pesar de que nuestros modelos parecen dibujar una curva por encima de la línea de identidad alrededor de  $x = 0$ , nuestra prueba estadística nos permitió concluir que no hay una diferencia significativa entre las distancias de Hamming observadas y esperadas (prueba multinomial exacta de bondad de ajuste,  $p$ -valor = 0,5804, significancia estadística = 0,05). Dado que no hubo una diferencia estadística entre los valores esperados y observados, tenemos evidencia para concluir que el comportamiento dinámico de nuestra red cae en la región crítica. Existe evidencia de que la criticidad es una marca registrada de los sistemas vivos porque simultáneamente coexisten en capacidades de robustez y capacidad de evolución (96). Este hallazgo sugiere que la TRN para la polarización de macrófagos en el microambiente tumoral parece ser

resistente a las perturbaciones y permite evolucionar como respuesta a las señales ambientales.

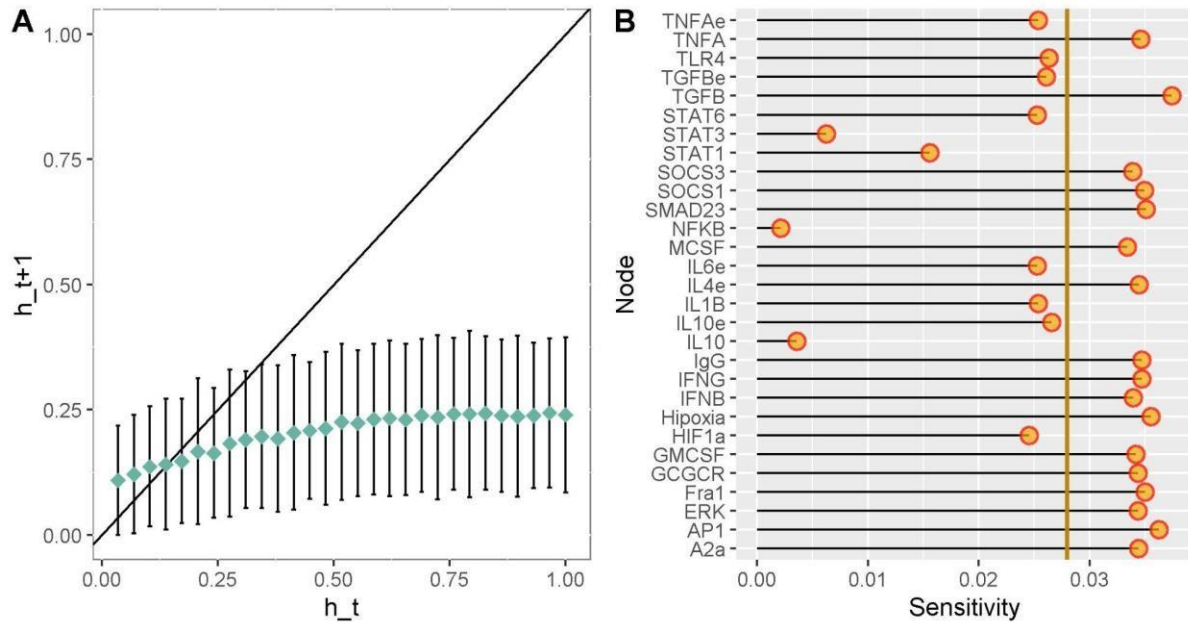


Figura 9. . Análisis de la robustez de nuestra red reguladora transcriptómica de polarización de macrófagos. Análisis de sensibilidad de cada nodo de nuestra red reguladora transcripcional de polarización de macrófagos. (A) Curvas de Derrida de nuestra red reguladora transcripcional de polarización de macrófagos en un microambiente tumoral. (B) Análisis de sensibilidad de las variables en nuestra red reguladora transcripcional de polarización de macrófagos en un microambiente tumoral. La línea dorada es la media del valor del análisis de sensibilidad.

Para visualizar aún más la robustez de nuestra red, modelamos múltiples perturbaciones de cada regla de actualización para evaluar la sensibilidad en nuestro TRN de la polarización de macrófagos. El análisis de sensibilidad de un gen o nodo evalúa la influencia de los otros genes de nuestra red. La Figura 9B describe la sensibilidad promedio de cada nodo y toda la red (línea dorada). TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  son los nodos con mayor sensibilidad, seguidos por el receptor de glucocorticoides (GCGCR), la interleucina 4 (IL-4) y el supresor de la señalización de citocinas 1 (SOCS1). Las citocinas extracelulares son las variables más susceptibles a los estímulos o al ruido molecular. Por ejemplo, la presencia de IFN- $\gamma$  asociado a un microambiente antitumoral y una función de macrófago M1 citotóxico, TGF- $\beta$  contrario asociado a un

microambiente protumoral y un fenotipo M2 regulatorio de cicatrización de heridas, TGF- $\beta$  asociado a funciones inhibitoras de M1 y potenciar la proliferación tumoral. GCGCR e IL-4 también están asociados con el comportamiento regulador y de cicatrización de heridas. SOCS1 puede inhibir STAT1 y disminuir la expresión de IFN- $\gamma$  en el microambiente. NF $\kappa$ B, STAT1 y STAT3 tienen una sensibilidad media más baja, lo que significa que son resistentes a cambios transitorios; es por eso que reconocimos a NF $\kappa$ B y STAT1 como una estrategia terapéutica para la inmunoterapia en la erradicación de tumores. La sensibilidad promedio de la red es menor que uno, lo que significa que nuestra red se comporta de manera ordenada, lo que resultó en la curva de Derrida (Figura 9A).

## 6.2 Una breve historia de la polarización de macrófagos en un microambiente tumoral: un enfoque de red continua, combinaciones de citocinas y polarización parcial.

Los modelos booleanos no pueden capturar que las señales internas y externas en el microambiente puede ser continuas. Es decir, estas señales están presentes en concentraciones gradientes y no en concentraciones dicotómicas (ausente o presente), lo que deriva en una diferencia de estimulación. Los valores externos o internos oscilarán entre 0 y 1, lo que se relacionará más con un grado de fuerza o duración que con la concentración. Por lo tanto, es deseable desarrollar modelos que incluyan la respuesta de una red a escala continua. Combinado con el comportamiento cualitativo de la dirección de la polarización de los macrófagos, la perspectiva continua de un enfoque continuo el cual puede demostrar la existencia de estados intermedios y cómo el microambiente tumoral expresa contracciones graduadas y dinámicas de citoquinas, afectando la dirección de la polarización.

### 6.2.1 Consecuencia del microambiente tumoral exógeno en la polarización de los macrófagos

El microambiente tumoral da forma a la polarización de los macrófagos. Para evaluar cómo las concentraciones de citocinas exógenas específicas y

subproductos metabólicos dan forma a la polarización de los macrófagos, evaluamos el estado estacionario de la polarización de los monocitos en función de la concentración de los nódulos exógenos. En algunas transiciones de macrófagos, hay un período en los gráficos que muestra NoLabel, llamamos a esta brecha como el estado de incertidumbre. Que es un estado donde el fenotipo del macrófago aún no está claramente definido por el modelo, porque la expresión del factor de transcripción no es única para representar uno de los fenotipos considerados basados en la citocina en el microambiente. La primera condición probada fue la activación de las citocinas, involucrado en la polarización de los macrófagos a un fenotipo que actividad citotóxica para eliminar células tumorales:  $IFN\gamma$ ,  $IFN\beta$ ,  $TNF\alpha$  e  $IL1\beta$ . El interferón- $\gamma$  y  $\beta$  polarizaron el monocito a un macrófago de tipo M1 donde STAT1 se activa específicamente con una concentración de 0,55 para ambos tipos de interferones. hay un período de concentración entre 0.475 y 0.525 donde el fenotipo del macrófago puede modificarse si otra citocina está presente en el microambiente (Figura 10A-B). El macrófago STAT1 de tipo M1 es importante en un microambiente tumoral debido a su conexión con las células Th1 y la secreción de IL-12, una citocina que mantiene a las células Th1 en un microambiente que elimina el tumor (97). Un monocito bajo el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  ( $TNF-\alpha$ ) sigue el aumento de un macrófago NFkB de tipo M1, pero necesitará una mayor concentración de dicho factor aproximadamente a un valor de 0.6 para diferenciarse (Figura 10C). Existe un rango de incertidumbre cuando el  $TNF-\alpha$  oscila entre 0,4 y 0,525. El macrófago NFkB tipo M1 está asociado con la secreción de citoquinas proinflamatorias en factores de eliminación de tumores (26). Sin embargo, una cantidad de citoquinas proinflamatorias puede crear un microambiente que induzca más daño que una solución, el macrófago NFkB tipo M1 no tiene regulación de la secreción de citoquinas asociadas con la tormenta de citoquinas (98). La regulación puede centrarse en el comportamiento de la dinámica de NFkB, que todavía es un factor de transcripción ampliamente estudiado en los macrófagos (99).

IL1 $\beta$  induce al monocito a diferenciarse en dos tipos de macrófagos en función de su concentración. El período de incertidumbre es bajo para esta citocina, entre 0,475 y 0,525. Si el valor de IL1 $\beta$  es relativamente bajo, el monocito se polarizará a un tipo NFkB/STAT1 de tipo M1 (Figura 10D). Además, cambia al fenotipo de macrófago híbrido M1M2b ya que IL1 $\beta$  es superior a 0,75. Este híbrido puede ser un componente importante cuando se desencadena la tormenta de citoquinas, tiene como contraparte al fenotipo M2b involucrado en la regulación del comportamiento inflamatorio producido por el fenotipo M1 debido a la activación del factor de transcripción ERK (28). La IL-6 tiene un doble papel, tiene la capacidad de activar un macrófago de tipo M1 AP-1 y la activación de STAT3 que está condicionada por la presencia de otras citoquinas. Con una concentración de 0,45, saltará bruscamente de un monocito a un macrófago tipo M1 asociado a la secreción de TNF $\alpha$ , que se asociará a un macrófago más inflamatorio (Figura 10D). El TNF- $\alpha$  tiene la capacidad de convertirse en un punto de inflexión en la regulación de la malignidad de una tormenta de citoquinas, aumentando la secreción de citoquinas proinflamatorias y eliminando las células tumorales al no permitir su división.

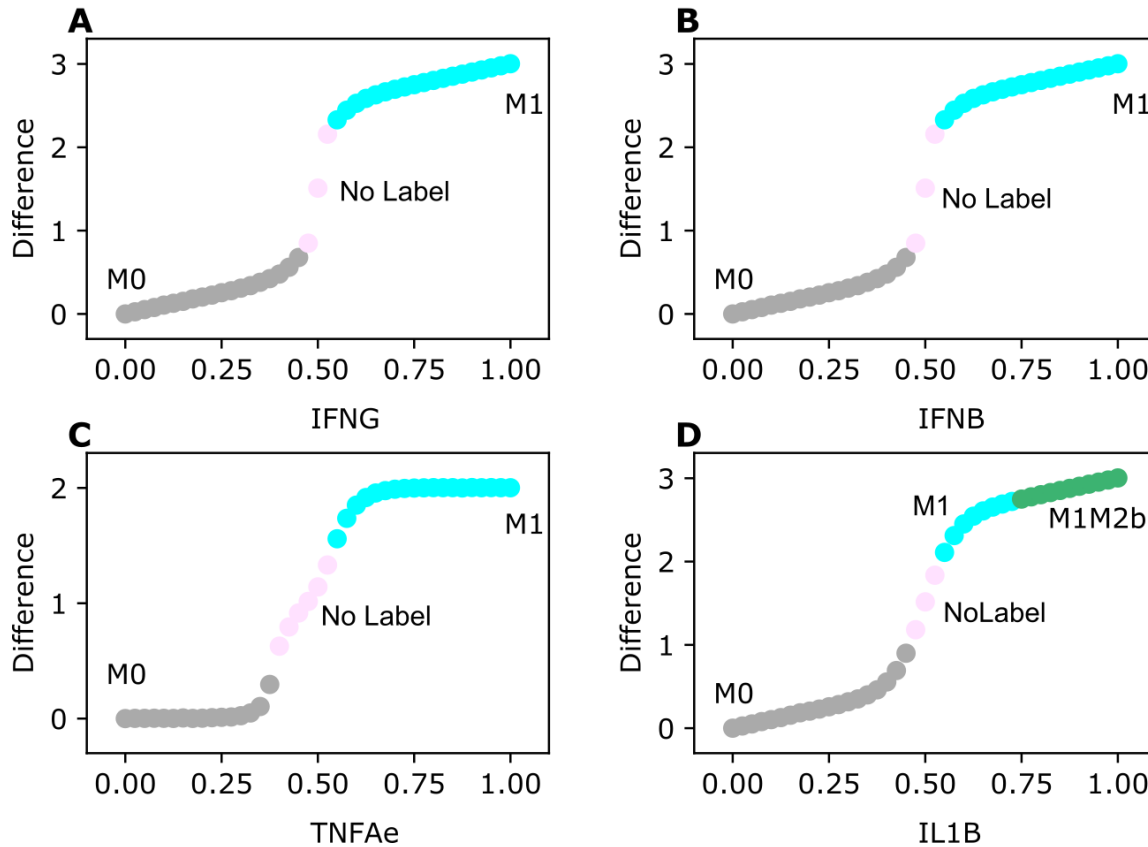


Figura 10. Polarización de macrófagos en diferentes citocinas exógenas únicas proinflamatorias. Todos los paneles tienen como estado inicial el fenotipo M0 (monocitos). El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M0 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citocinas exógenas. (A) aumento gradual del interferógamma (IFNG), (B) aumento del interferón-beta (IFNB), (C) aumento gradual del factor de necrosis tumoral alfa (TNFAe) y (D) aumento gradual de la interleucina 1-beta (IL1B).

Los subtipos de macrófagos M2 (M2a, M2b, M2c y M2d) están polarizados por las siguientes citocinas y subproductos metabólicos: complejos inmunitarios (IgG), MCSF, TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4 y adenosinas. IL-4 activa el fenotipo del macrófago M2a, se asocia con la inhibición de una respuesta Th1 y mejora la respuesta Th2 (27). Cuando el valor de IL-4 es 0,55, el monocito cambia a un fenotipo M2a durante un corto período de tiempo (Figura 11A). Debido a que la IL-4 está implicada en la secreción de IL-10 y TGF- $\beta$  en el microambiente debido a la activación de STAT6, los fenotipos M2a saltan al

fenotipo de macrófago promotor de tumores M2aM2cM2d híbrido. IL-10 y TGF- $\beta$  inducen crecimiento tumoral y alteraciones en el sistema inmunológico, respectivamente. El período de incertidumbre es bajo entre 0,475 y 0,525. La IL-10 tiene la capacidad de mantener a raya la respuesta inmune e impide la eliminación de las células tumorales porque contraataca las funciones citotóxicas en los macrófagos (29). Mientras  $IL10 \geq 0.45$ , el monocito se polarizará a un fenotipo híbrido M2aM2cM2d con un comportamiento regulatorio desfavorable hacia la eliminación tumoral, secretará factores de crecimiento y citocinas involucradas en la regulación de la eliminación tumoral (Figura 11C). M2aM2cM2d desarrolla un macrófago con solo una capacidad reguladora para inhibir la expansión de células T, lo que reduce la eliminación de células tumorales (100). Así, la IL-10 es una citocina para evitar en un microambiente tumoral porque se asocia a un mal pronóstico para cualquier tipo de cáncer, incluido el cáncer de mama (101). MCSF está implicado en la polarización del monocito a un fenotipo de tipo M2. En un breve conjunto de condiciones cuando el valor de MCSF está entre 0,45 y 0,5, se transitará a un fenotipo M2c. El fenotipo se estabiliza con un valor superior a 0,5 a un híbrido protumoral M2aM2cM2d (Figura 11D). Mientras tanto, la expresión de adenosina en el microambiente hará que el monocito transite entre dos fenotipos y se estabilice a un M2aM2cM2d cuando el valor sea superior a 0,55. Entre 0,5 y 0,52, primero transitará de M0 a un fenotipo M2a, seguido de la polarización a un fenotipo híbrido M2aM2d con actividad reguladora (Figura S11). Finalmente, TGF- $\beta$  polarizará los monocitos a un híbrido regulador M2aM2d, transitando primero a través de un macrófago M2a puro cuando los valores sean 0.425 y 0.525 respectivamente. El fenotipo M2d está asociado con la secreción del factor de crecimiento endotelial vascular (ayudará a crear nuevos vasos sanguíneos) (26), mezclado con el compartimento M2a que secretará TGF- $\beta$  que puede potenciar el crecimiento tumoral, creando un ambiente perfecto que permitirá que las células tumorales prosperen.



Por último, el modelo continuo de polarización de macrófagos en un microambiente tumoral establece el cambio de polarización de los monocitos dado el microambiente tumoral cuando se reclutan. La transición entre fenotipos es mayormente gradual con un período de incertidumbre, pero para algunos, la transición es abrupta. Además, los fenotipos híbridos son estados estacionarios estables, mientras que los fenotipos probados verificados experimentalmente son solo fenotipos entre las zonas de transición a un estado estacionario.

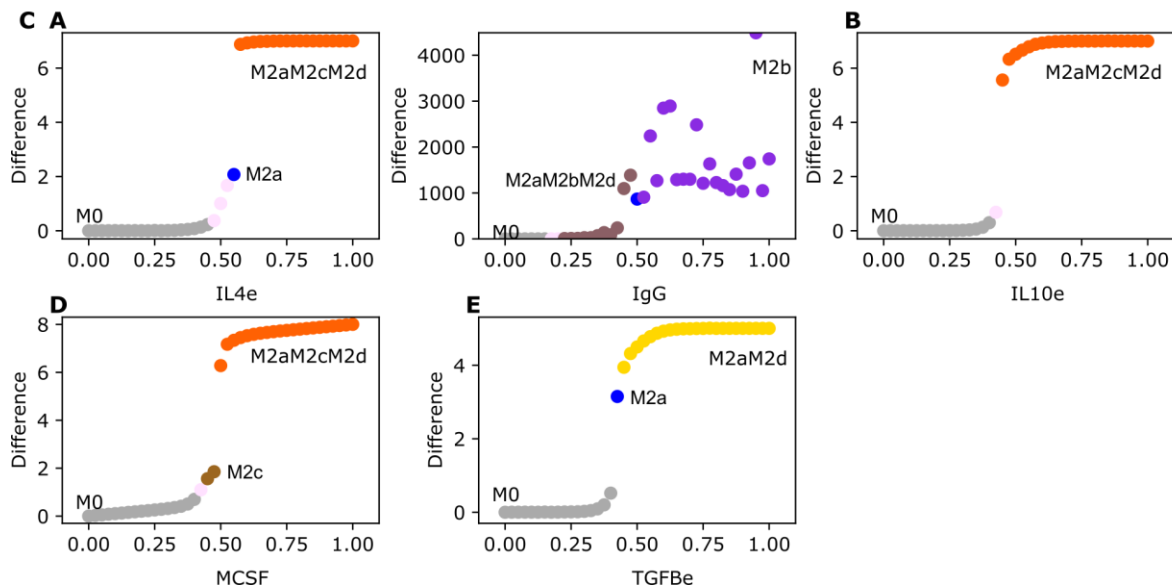


Figura 11. Polarización de macrófagos en diferentes citocinas exógenas únicas antiinflamatorias. Todos los paneles tienen como estado inicial el fenotipo M0 (monocitos). El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M0 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citocinas exógenas. (A) aumento gradual de la interleucina-4 (IL4e), (B) aumento de la inmunoglobulina (IgG), (C) aumento gradual de la interleucina-10 (IL-10e), (D) aumento gradual del factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF), y (E) aumento gradual del factor de crecimiento tumoral beta (TGF- $\beta$ ).

### 6.2.2 Atractores de estado estacionario evaluados en microambientes de macrófagos específicos.

En esta sección evaluaremos los atractores de estado estacionario obtenidos en nuestro trabajo anterior (102) y evaluaremos su comportamiento en posibles microambientes presentes en un tumor. Utilizamos uno de los trece estados estacionarios (por ejemplo, M1) como estado inicial y probamos su robustez en diferentes microambientes presentes en un microambiente tumoral. Para hacerlo, aumentamos gradualmente las citocinas asociadas. Para el caso de los macrófagos citotóxicos M1, evaluamos su naturaleza de polarización en base a microambientes adversos para macrófagos específicos. Cuando aumentamos gradualmente  $IL1\beta$  y  $TNF\alpha$ , un microambiente de tormenta pro-citocina, M1 se polariza y estabiliza a un fenotipo híbrido regulatorio M1M2b cuando el valor de ambos factores es superior a 0,3 (Figura 12B). Cuando evaluamos el macrófago de tipo M1 en un microambiente regulador donde se expresan gradualmente  $IL4$  y  $TGF-\beta$  (Figura 12C), el fenotipo cambió a un macrófago de tipo M2d. Curiosamente el macrófago M1 permaneció en el mismo fenotipo hasta que los valores de citoquinas externas fueron superiores a 0,5. A medida que se supera el valor de 0,5, el macrófago se polariza al macrófago M2 asociado al tumor.  $IL-4$  no tuvo acción hacia la activación de  $STAT6$  porque  $STAT1$  estuvo presente en todo momento. Mientras tanto,  $TGF-\beta$  tenía la capacidad de activar  $HIF1\alpha$  inactivando  $STAT1$ . Por lo tanto, se desarrolla un macrófago sin citotoxicidad y solo con una función reguladora. Mientras tanto, en el microambiente pro-M2b, el M1 cambió a un macrófago M2b, porque los complejos inmunes mezclados con glucocorticoides activan  $ERK$  e inactivan la función citotóxica de  $STAT1$  (Figura 12D). Hay un ligero momento del período de incertidumbre en este microambiente cuando el valor osciló entre 0,5 y 0,525. La transición se produce cuando el valor era superior a 0,525. Mientras tanto, el macrófago M1 en un microambiente regulador completamente inmune (pro-M2c) mantuvo la contraparte citotóxica de M1 mezclada con M2b (Figura 12E), desarrollándose en un fenotipo híbrido M1M2b. La polarización se estableció

cuando el valor de las citocinas externas fue superior a 0,5, observándose un período de incertidumbre en esta simulación. Si el macrófago M1 encuentra un microambiente hipóxico (que es muy común en un microambiente tumoral), se polarizará en un macrófago de tipo M2 (Figura 12F). La polarización se produce cuando los valores de los factores de hipoxia, glucocorticoides y adenosina son superiores a 0,6 y no se presenta ningún período de incertidumbre. Curiosamente, cuando el valor de los subproductos metabólicos es bajo, el macrófago permanecerá en las funciones citotóxicas, lo que permitirá la eliminación del tumor en un breve período de tiempo que puede ser suficiente cuando lucha contra el núcleo de un tumor.

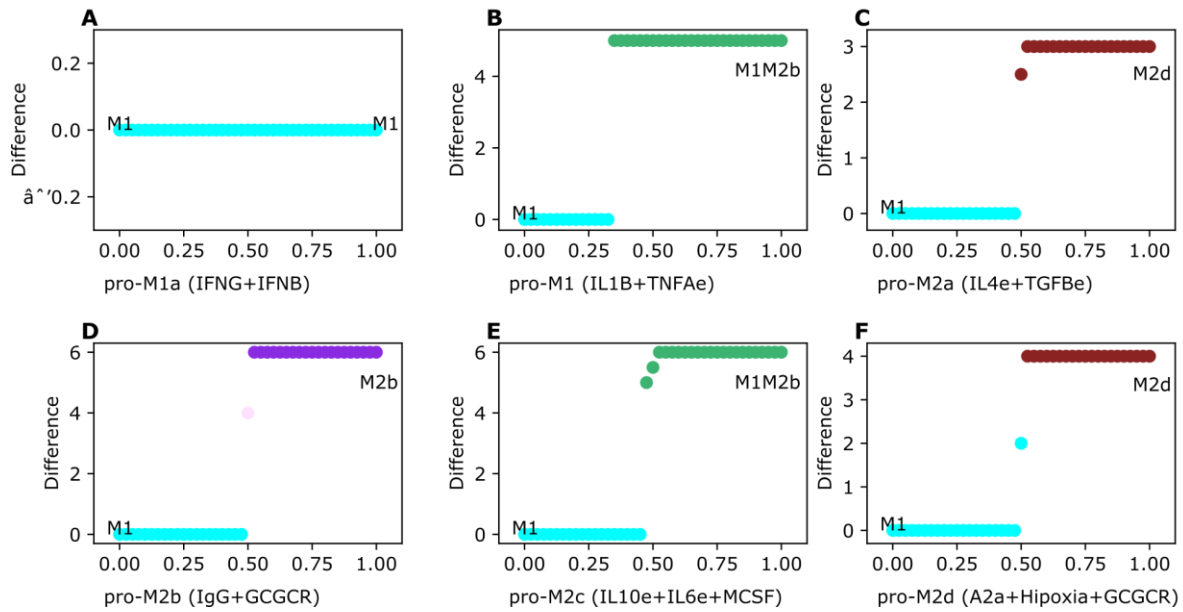


Figura 12. Polarización de macrófagos de atractores de estado estacionario en diferentes microambientes asociados al fenotipo. Todos los paneles tienen como estado inicial el fenotipo M1. El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M0 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citocinas exógenas. (A) aumento gradual de interferón-gamma (IFNG) e interferón-beta (IFNB) en el entorno M1a, (B) mejora del factor de necrosis tumoral alfa (TNFAe) y la interleucina 1-beta (IL1B) para el microentorno M1, (C) aumento gradual de interleucina-4 y factor de crecimiento tumoral, un microambiente pro-M2a, (D) aumento gradual de inmunoglobulina y glucocorticoides, el microambiente pro-M2b, (E) aumento gradual de interleucina-10, estimulante de colonias de macrófagos factor e interleucina-6, el entorno pro-M2c, y (F) aumento gradual de adenosinas, hipoxia y glucocorticoides, el entorno pro-M2d.

Evaluaremos la dinámica del híbrido con el macrófago citotóxico/regulador M1M2b en microambientes adversos. De los seis ambientes evaluados, solo tres se asociaron con un esquema de polarización, en los demás el macrófago mantiene el mismo fenotipo (Figura S12 A, B y C). El fenotipo pro-M2a estuvo implicado en la polarización del macrófago M1M2b a un macrófago completamente regulador del sistema inmunitario M2d (Figura S12C). Este fenotipo está implicado en el mantenimiento de un microambiente que permite que las células tumorales prosperen. El microambiente pro-M2d se desarrolló en la misma polarización (Figura S12F). El entorno M2b polarizó el híbrido a una dinámica reguladora únicamente M2b cuando los valores eran superiores a 0,5. El macrófago M1M2d se polarizó a un fenotipo M2d en los seis microambientes evaluados (Figura S12D).

El híbrido regulador/macrófago protumoral M2bM2d, que era el atractor más estable, se comportó de manera bastante diferente cuando se introdujo en entornos específicos. Los seis microambientes modificaron el M2bM2d a otro fenotipo. El proM1 polarizó el M2bM2d a un fenotipo híbrido M1M2b (Figura S13A). El interferón  $\gamma$  y  $\beta$  tenían la capacidad de cambiar a un nuevo fenotipo cuando los valores eran superiores a 0,1 y el fenotipo se estabilizaba a medida que los valores de interferón aumentaban gradualmente. Este híbrido tiene la capacidad de eliminar las células tumorales debido al interferón secretado mezclado con el componente regulador del macrófago M2b, creando un equilibrio de eliminación y recuperación del tejido. Para la tormenta de pro-citoquinas, se estabilizó tan bien como el híbrido M1M2b, el componente regulador de M2b puede ayudar a reducir la acción de las citoquinas citotóxicas en un microambiente tumoral (Figura S13B). Mientras que el microambiente pro-M2a o de curación de heridas polariza el comportamiento a un híbrido completamente regulador/pro-tumor llamado M2aM2d, debido a la acción del

TGF- $\beta$  externo que activará HIF1 $\alpha$  y el factor de transcripción STAT3 (Figura S13C).

Esta transición se dio cuando los valores de los factores externos fueron mayores a 0.55, no hubo período de imprevisibilidad. El entorno M2b tuvo una dinámica interesante, cuando los valores de IgG y GCGCR estaban entre 0,1 y 0,25 hubo un período de imprevisibilidad (Figura S14D). Pero cuando aumentamos los valores entre 0,3 y 0,5, el macrófago se polarizó a un híbrido regulador con tres fenotipos

M2aM2bM2d y quedó fijado a un macrófago M2bM2d con función reguladora/protumoral. Mientras tanto, el entorno regulatorio pro-M2c, polarizó el macrófago a un pro-tumoral e inactivación del sistema inmune cuando los factores externos fueron mayores a 0.2 (Figura S13E). Este tipo de microambiente es más común en un tumor, que se desarrolla en la proliferación tumoral que conduce a la metástasis debido a la presencia de IL-10 e IL-6. El entorno del núcleo del tumor o pro-M2d cambió el M2bM2d a un fenotipo híbrido M2aM2cM2d, creando un escenario en el que las células tumorales pueden prosperar y el macrófago puede sobrevivir en un entorno complicado sin oxígeno debido a la contraparte M2a (Figura S13F). Por último, pero no menos importante, analizaremos el patrón de comportamiento del macrófago M2cM2d. Este híbrido está implicado porque tiene la capacidad de mantener a raya la eliminación del sistema inmunitario mientras secreta factores que potenciarán el crecimiento tumoral y crearán nuevos vasos imperfectos para que los nutrientes lleguen al sitio donde son escasos. De los seis microambientes, solo tres tienen la capacidad de modificar el comportamiento del macrófago M2cM2d, el resto mantiene el mismo fenotipo (Figura S14B, C y E). Las condiciones de interferón tenían la capacidad de inactivar la contraparte M2c cuando los valores eran superiores a 0,5, convirtiéndose en un macrófago M2d. Esta reducción del híbrido a un fenotipo puro puede ser suficiente para inactivar la inhibición del sistema inmunológico y eliminar las células tumorales (Figura S14A). La tormenta de procitoquinas (Figura S14B) y el dominio pro-M2a (Figura S14C) no afectaron el

comportamiento del macrófago M2cM2d. Mientras tanto, el entorno M2b se desarrolló en un conjunto interesante de esquemas de polarización. Cuando los valores de IgG y GCGCR estaban entre 0,15 y 0,5, el M2cM2d se polarizó a un M2aM2cM2d (Figura S14D). Durante un breve período de tiempo, el macrófago cambió a un M2aM2d, para finalmente acercarse a un fenotipo M2aM2bM2d cuando los valores eran superiores a 0,6. Este macrófago trihíbrido fenotípico tiene la capacidad de recuperar el daño tisular debido a la activación de la respuesta inflamatoria, ya que la secreción de factores potencia la proliferación tumoral. A pesar de esto, el microambiente pudo inactivar el fenotipo M2c, lo que puede permitir el reclutamiento de macrófagos con funciones citotóxicas y de eliminación de tumores. Como era de esperar, el entorno pro-M2c no afectó la dinámica de los macrófagos (Figura S14E). El dominio hipóxico (pro-M2d) polarizó el macrófago a un híbrido M2aM2cM2d. El componente M2a se agregó para permitir que este macrófago sobreviva en un microambiente inhóspito, lo que le permite secretar factores para mejorar el crecimiento tumoral y crear un ambiente hostil para las células que eliminan tumores (Figura S14F).

### 6.2.3 El microambiente afecta la polarización de los macrófagos y desarrolla retroalimentación.

El microambiente tiene la capacidad de dar forma a la polarización de los macrófagos, analizamos seis microambientes de señalización diferentes asociados con fenotipos de macrófagos: tipo M1 NFkB, tipo M1 STAT1, M2a, M2b, M2c y M2d. Para simular estos microambientes, aumentamos gradualmente los valores de los perfiles conocidos de citocinas y metabolitos de señalización asociados con cada fenotipo (103). Destacamos un comportamiento global sobre cómo se forman los fenotipos de macrófagos y cómo podemos aprovechar este comportamiento. Por ejemplo, el microambiente pro-M1a solo tiene la capacidad de producir macrófagos asociados a la activación de STAT1 y presenta la activación de cualquier tipo

de contraparte reguladora o cicatrizante. De hecho, la presencia combinada de IFN- $\gamma$  y  $\beta$  polariza a un macrófago de tipo M1 más rápido que cuando solo está presente uno de dichos interferones, el umbral es un valor de 0,325 para lograr esta polarización (Figura 13A). Además, el período de incertidumbre se reduce en comparación con la activación en solitario. Además, el microambiente M1a permite un comportamiento regulador del macrófago M2b, antes de que se estabilice al fenotipo híbrido tiene que pasar al fenotipo M1, necesita valores elevados superiores a 0.75 dos estabilizados a dicho fenotipo (Figura 13B). Durante este proceso existe un comportamiento proinflamatorio constante y puede estar regulado por el M2b. Un pro-M2a disminuye la capacidad tumoricida, favoreciendo la polarización de los macrófagos para la progresión tumoral y la regulación inmune (Figura 13C). Crear dos fenotipos híbridos de macrófagos completamente protumorales, pasando de M2aM2d estabilizador a un híbrido regulador y curativo M2aM2cM2d por la activación de STAT3 debido a la presencia de TGF- $\beta$  extracelular. El microambiente Pro-M2b se desarrolla en un fenotipo M2b puro con comportamiento regulador (Figura 13D). Por otro lado, se desarrolla un proM2c con un fenotipo macrófago con capacidad de regular el sistema inmunológico permitiendo que las células cancerosas eviten su eliminación (Figura 13E). Curiosamente cuando los valores de las interleucinas están entre 0,3 y 0,5 se crea un fenotipo híbrido M2aM2cM2d como en el microambiente Pro-M2a pero cuando el valor es superior a 0,5 se estabiliza a un macrófago regulador y protumoral M2cM2d. Finalmente, el microambiente M2d crea el mismo patrón de expresión que el microambiente M2 que se estabiliza en un fenotipo regulador M2aM2cM2d (Figura 13F).

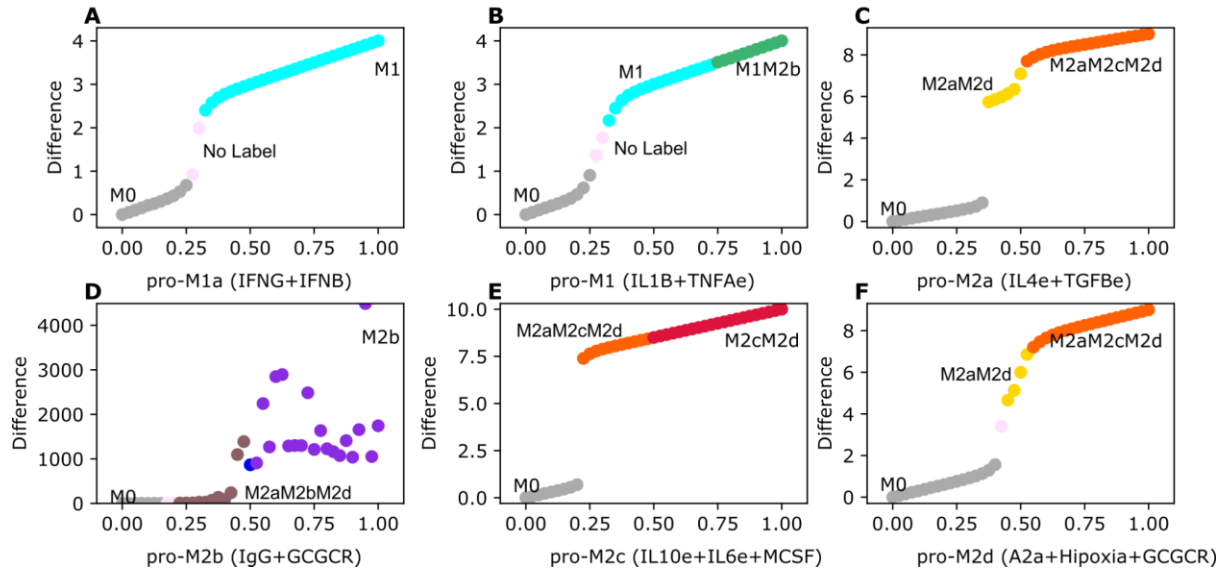


Figura 13. Polarización de macrófagos en diferentes microambientes asociados al fenotipo. Todos los paneles tienen como estado inicial el fenotipo M0 (monocitos). El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M0 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citocinas exógenas. (A) aumento gradual del interferón-gamma (IFNG) y el interferón-beta (IFNB) en el entorno M1a, (B) mejora del factor de necrosis tumoral alfa (TNFAe) y la interleucina 1-beta (IL1B) para el microentorno M1, (C) aumento gradual de interleucina4 y factor de crecimiento tumoral, un microambiente pro-M2a, (D) aumento gradual de inmunoglobulina y glucocorticoides, el microambiente pro-M2b, (E) aumento gradual de interleucina10, factor estimulante de colonias de macrófagos e interleucina-6, el entorno pro-M2c, y (F) aumento gradual de adenosinas, hipoxia y glucocorticoides, el entorno pro-M2d.

#### 6.2.4 Los macrófagos modificados genéticamente teóricos son resistentes a fenotipos de macrófagos específicos.

En nuestro trabajo anterior desarrollamos un macrófago con la activación de NFκB y la inhibición de HIF1α para inclinar la balanza de un microambiente protumoral a tener ambos tipos de comportamientos: protumoral y antitumoral. Al dirigirse a estos factores de transcripción, desarrollará macrófagos M1 activados por NFκB que secretarán citocinas proinflamatorias. Para verificar nuestra hipótesis, tomamos nuestro TGEM y vimos qué tan bien se comporta en los microambientes de macrófagos. Nuestro TGEM respondió bien a la mayoría de los microambientes creando



fenotipos de macrófagos reguladores y tumoricidas. Los microambientes de interferón crean un macrófago NFκB/STAT1 M1, creando un microambiente proinflamatorio y adecuado para la proliferación de células T debido a la secreción de IL-12 (Figura 14A). Estos factores combinados crean un escenario en el que las células tumorales pueden ser eliminadas por macrófagos y células T. Los microambientes IL1β y factor de necrosis tumoral crean un híbrido M1M2b con capacidad reguladora y tumoricida (Figura 14B). El M1 activado por NFκB secretará IL-12 para la proliferación de células T y la contraparte M2b tiene la capacidad de secretar TNFα para eliminar más células tumorales, también puede secretar IL-10 para regular la función citotóxica de las células T y el macrófago M1. El microentorno M2b también crea el híbrido M1M2b. Las únicas citocinas que cambian por completo la polarización de nuestro TGEM son IL-4 y TGF-β creando un fenotipo M2a cuando los valores son superiores a 0,5 (Figura 14D). Estas citocinas tienen la capacidad de acelerar el crecimiento de las células tumorales gracias al TGF-β y secretan el regulador maestro del sistema inmunitario IL-10, creando un escenario para el crecimiento y la evasión tumoral. El TGEM mantiene el fenotipo M1 a pesar de estar en un comportamiento regulador porque NFκB no permite la activación de STAT3 y la activación de AP-1 que se asocia con citocinas proinflamatorias (Figura 14E).

Las citoquinas exógenas IL4e y TGF-β cambian la polarización a un fenotipo M2a, IgG e IL1β a un macrófago M1M2b (Figura 14C). Finalmente, nuestro TGEM tiene la capacidad de crear fenotipos contra las células cancerosas, independientemente de si las citocinas reguladoras están presentes en el microambiente. El TGEM generará una relación M1/M2 con buen pronóstico debido a que el tumor es citotóxico y la resolución de la inflamación.

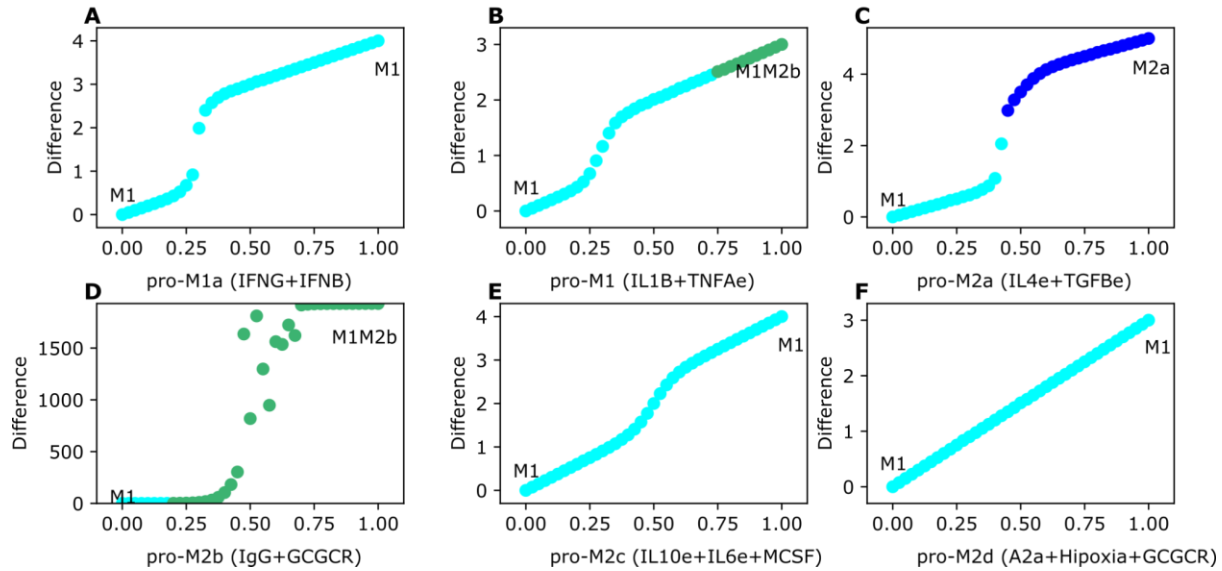


Figura 14. Macrófagos teóricamente modificados genéticamente (TGEM) en diferentes microambientes asociados al fenotipo. Todos los paneles tienen como estado inicial la activación e inhibición como perturbaciones constantes de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  y  $\text{HIF1-}\alpha$  respectivamente. El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial  $M_0$  y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citocinas exógenas. (A) aumento gradual del interferón gamma (IFNG) y el interferón-beta (IFNB) en el entorno M1a, (B) mejora del factor de necrosis tumoral alfa (TNFAe) y la interleucina 1-neta (IL1B) para el microentorno M1, (C) aumento gradual de interleucina-4 y factor de crecimiento tumoral, un microambiente pro-M2a, (D) aumento gradual de inmunoglobulina y glucocorticoides, el microambiente pro-M2b, (E) aumento gradual de interleucina10, factor estimulante de colonias de macrófagos e interleucina-6, el entorno pro-M2c, y (F) aumento gradual de adenosinas, hipoxia y glucocorticoides, el entorno pro-M2d.

### 6.2.5 Mapa teórico del destino de los macrófagos modificados genéticamente en un microambiente específico de macrófagos.

Cuando creamos nuestro TGEM solo obtuvimos cuatro atractores de estado estacionario: M1, M1M2b, M1M2d y M1M2bM2d. Así que evaluamos el patrón de la dinámica de polarización de estos fenotipos en seis fenotipos de macrófagos específicos. Es importante señalar que todos los fenotipos obtenidos tienen el componente eliminador de tumores mezclado con una contraparte reguladora/proeliminadora de tumores. Por ejemplo, el fenotipo M1 siempre se estabiliza en un fenotipo híbrido M1M2b. Dicho esto, tanto el interferón como la tormenta de procitoquinas mantiene el fenotipo hacia un

fenotipo M1M2b. Para los microambientes M2, solo M2b y prohipóxicos dictan un cambio en el comportamiento (Figura 15). Para el M2b en un breve lapso de tiempo, el M1M2b se polariza a un fenotipo M1, estabilizándose en consecuencia al M1M2b, cuando los valores son mayores a 0.55. En el caso de un ambiente pro-hipóxico, el M1M2b se polariza a un fenotipo M1 con factores de transcripción STAT1, pudiendo mantener un microambiente donde las células tumorales están siendo eliminadas por el sistema inmune. Los fenotipos M1M2b y M1M2bM2d en todos los microambientes polarizan a un macrófago M2d (Figura 15).

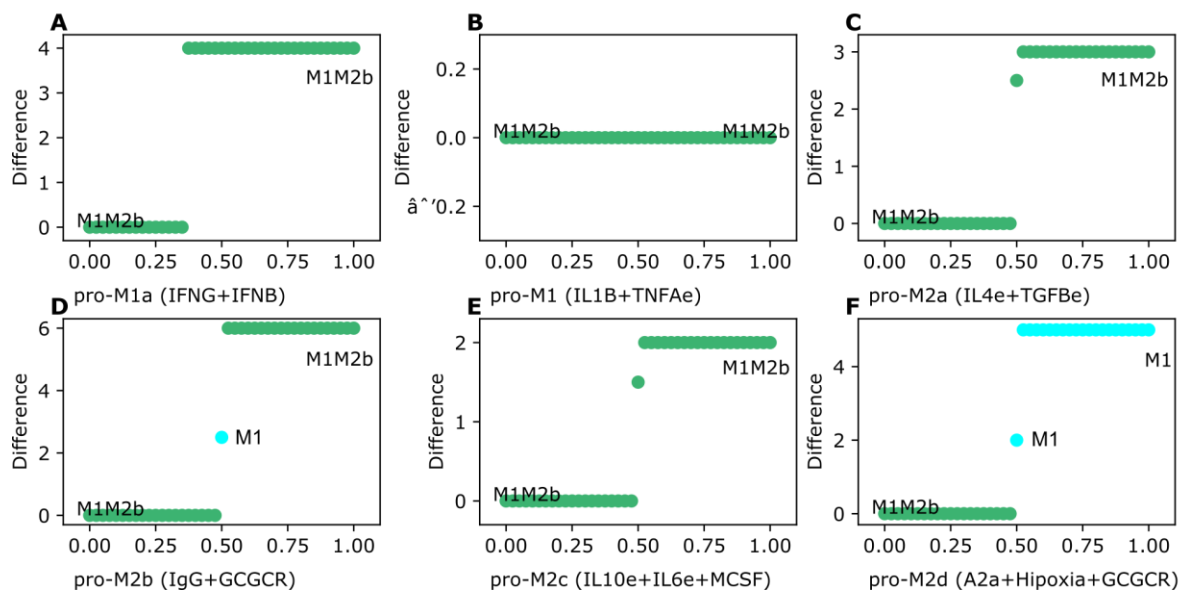


Figura 15. Macrófagos teóricamente modificados genéticamente (TGEM) en diferentes microambientes asociados al fenotipo. Todos los paneles tienen como estado inicial el atractor M1 de nuestro TGEM. El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M1 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citocinas exógenas. (A) aumento gradual del interferón-gamma (IFNG) y el interferón-beta (IFNB) en el entorno M1a, (B) mejora del factor de necrosis tumoral alfa (TNFAe) y la interleucina 1-neta (IL1B) para el microentorno M1, (C) aumento gradual de interleucina-4 y factor de crecimiento tumoral, un microambiente pro-M2a, (D) aumento gradual de inmunoglobulina y glucocorticoides, el microambiente pro-M2b, (E) aumento gradual de interleucina-10, factor estimulante de colonias de macrófagos e interleucina-6, el entorno pro-M2c, y (F) aumento gradual de adenosinas, hipoxia y glucocorticoides, el entorno pro-M2d

6.2.6 El macrófago modificado genéticamente teórico se desarrolla en fenotipos asociados con la eliminación de tumores en microambientes de cáncer de mama.

Simulamos nuestro TGEM en cuatro microentornos de cáncer de mama diferentes y simplificados para evaluar la dinámica de polarización y determinar si este enfoque farmacéutico teórico es adecuado. Analizamos el efecto de IgG y Adenosinas; IL10 y

TGF- $\beta$ ; IL1 $\beta$ , IL6 e IFNG e hipoxia con glucocorticoides. Debido a que NFkB está activado, tomamos M1 como la condición inicial. De los cuatro, solo tres se desarrollaron en un cambio en el comportamiento de los fenotipos. El microambiente de tormenta de procitocinas e interferón polarizó de un fenotipo M1 a un híbrido con componentes reguladores mezclados con capacidad tumoricida. El cambio solo se logró cuando el valor fue mayor a 0,75, creando tiempo suficiente para eliminar las células tumorales y recuperar el daño con la contraparte M2b (Figura 16A). El microambiente más complicado fue el que presentaba presencia de IgG y A2a por estar implicado en la metástasis. El M1 se polarizó a un fenotipo híbrido M1M2b, pero el cambio fue gradual. Durante un tiempo tendremos la acción tumoricida de NFkB que se puede asociar a una eliminación suficiente de las células tumorales. Cuando los valores son superiores a 0,6, el macrófago se polariza a un fenotipo M1M2b con el componente regulador (Figura 16B). A pesar de este microambiente, genera un equilibrio entre antitumoral y protumoral, donde la balanza se inclina hacia el antitumoral, debido a la presencia de M1 en ambos fenotipos. IL10 y TGF- $\beta$  son los únicos microambientes que cambian el comportamiento a un componente protumoral. Cuando los valores son superiores a 0,6, el fenotipo M1 se polariza a un macrófago M2a que no creará un entorno adecuado para la eliminación del tumor (Figura 16C). El entorno de hipoxia y glucocorticoides no afecta en absoluto a la dinámica del macrófago, desarrollándose en un escenario de eliminación de tumores, a pesar de la complejidad interna (Figura 16D).

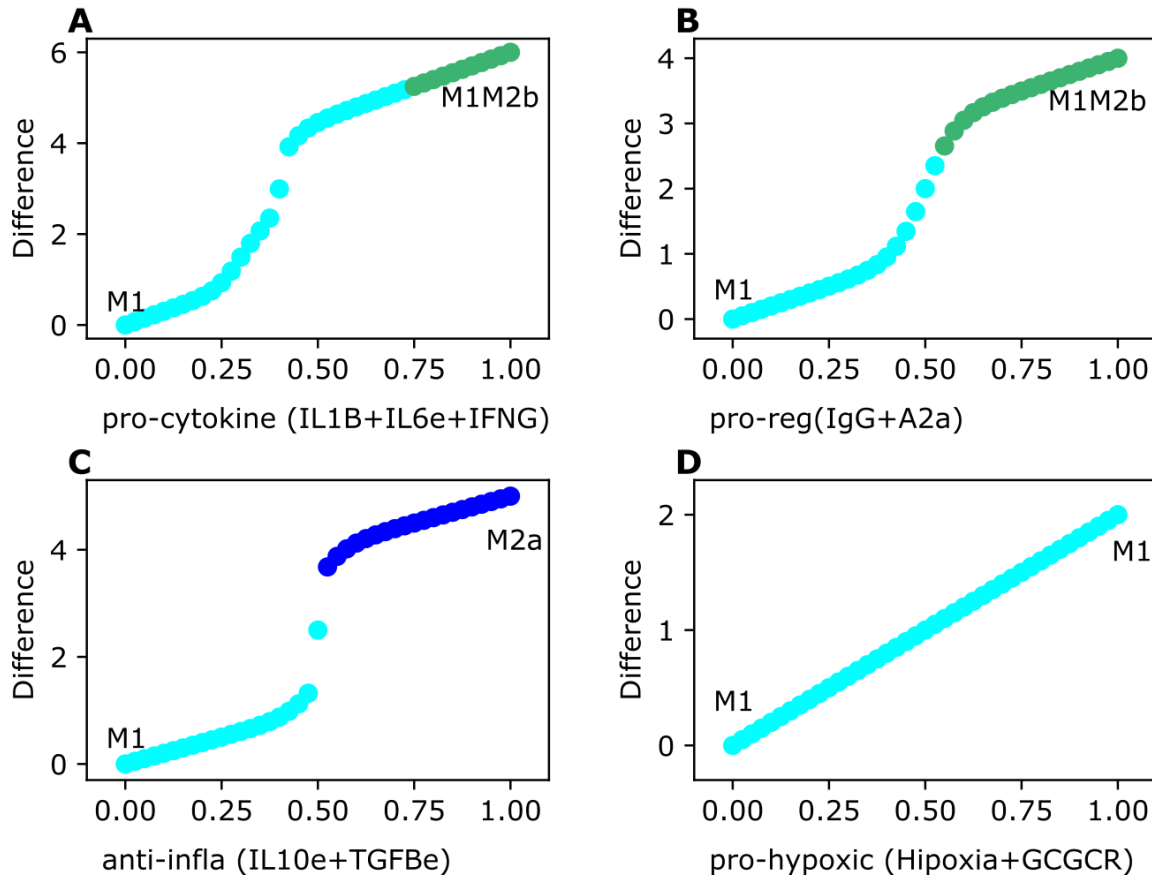


Figura 16. Macrófagos teóricamente modificados genéticamente (TGEM) en diferentes microambientes de cáncer de mama. Todos los paneles tienen como estado inicial la activación e inhibición como perturbaciones constantes de  $\text{NF}\kappa\text{B}$  y  $\text{HIF1-}\alpha$  respectivamente. El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial  $\text{M0}$  y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citocinas exógenas. (A) Aumento gradual de interferón gamma (IFNG), interleucina-beta (IL1B) e interleucina-6, el entorno de eliminación de procitocinas y tumores, (B) aumento de inmunoglobulina-G (IgG) y adenosinas (A2a), un microambiente prorregulador, (C) aumento gradual de interleucina-10 y factor de crecimiento tumoral, un microambiente antiinflamatorio, (D) aumento gradual de hipoxia y glucocorticoides, un microambiente prohipóxico.

### 6.2.7 El microambiente exógeno afecta el comportamiento endógeno en la plasticidad de los fenotipos de macrófagos.

En resultados anteriores nos enfocamos en la transición entre los tipos de macrófagos M1 y M2 y viceversa. Solo ciertas citoquinas exógenas podrían cambiar el comportamiento para polarizarse a otro fenotipo basado en los

estados fenotípicos iniciales. Esto significa que los tipos M1, M2 e híbridos una vez polarizados, no son tan plásticos como pensábamos. En esta sección, queremos evaluar cómo se comportarán los fenotipos con concentraciones iniciales más bajas de factores de transcripción (endógenos) de los fenotipos de los subtipos M1 y M2. Evaluamos estos estados iniciales en combinación con la citoquina opuesta y estudiamos la existencia de polarización parcial en nuestro modelo y evaluamos si suficiente factor de transcripción es suficiente para permanecer en ciertos fenotipos o cambiar a otro. Por ejemplo, el fenotipo M1 cuando NFkB se activa y evalúa en microambientes M2a, M2b, M2c y M2d. En un microentorno M2b, el M1 se polarizará a un M1M2b cuando los valores sean superiores a 0,35 de NFkB independientemente del valor de ERK (Figura S15A). Cuando los valores de NFkB son inferiores a 0,35 y ERK inferiores a 0,2, los macrófagos volverán a los monocitos. Cuando aumentamos el valor de ERK entre 0,2 y 0,75 habrá un periodo de incertidumbre, por lo que el fenotipo aún no está determinado. Valor de ERK superior a 0,75 y NFkB inferior a 0,35, el macrófago M1 se polarizará a un macrófago regulador M2b. La mayoría de las veces será un híbrido antitumoral/regulador. El comportamiento de STAT6 en un microentorno M2a es mucho más dominante que ERK cuando lo comparamos con NFkB. Cuando los valores de STAT6 son inferiores a 0,15, el fenotipo M1 mantendrá el mismo fenotipo solo si NFkB es inferior a 0,35; si es mayor, cambiará a un fenotipo regulatorio/citotóxico M1M2b (Figura S15B). Si los valores de STAT6 están entre 0,15 y 0,75, el fenotipo M1 transitará a un protumoral M2d a pesar de que esté presente NFkB. Sin embargo, cuando el valor de STAT6 es superior a 0,75, cambiará a un híbrido con un comportamiento regulador y de curación de heridas M2aM2d independientemente de si NFkB está presente o no. La competencia entre la expresión de STAT3 y NFkB es similar a STAT6. Cuando los valores de STAT3 son inferiores a 0,35, el fenotipo transitará a un híbrido M1M2b si y solo si NFkB es superior a 0,35, los valores inferiores se mantendrán en el mismo fenotipo (Figura S15C). La complejidad es cuando los valores de

STAT3 son mayores a 0.35. Valores entre 0.45 y 0.75 el macrófago cambiará a un híbrido M2aM2d permitiendo la activación de STAT6 al inhibir la expresión de NFκB. Pero cuando los valores son superiores a 0,75 y NFκB superiores a 0,35, el macrófago transitará a un macrófago protumoral M2aM2d completamente regulador, creando un entorno perfecto para que el cáncer crezca y prospere. La activación de HIF1α solo inhibe un comportamiento citotóxico cuando los valores son superiores a 0,75, polarizando al macrófago a un fenotipo M2d. Cuando los valores son inferiores a 0,75, el macrófago se comportará como un fenotipo M1 o M1M2b según los valores de NFκB (Figura S15D). En cambio, el tipo M1 activado por STAT1 se comporta de manera diferente y mantiene cierta dominancia. Para el microentorno M2b, independientemente del valor de ERK, siempre será un cambio a un M1M2b híbrido (Figura 17A). STAT6 y STAT1 tienen más competencia cuando los comparamos con STAT3 (Figura 17B). Cuando los valores de STAT1 son inferiores a 0,35 y los valores de STAT6 están entre 0 y 0,75, el macrófago se polarizará a un fenotipo M2cM2d regulador del sistema inmunitario. Pero si el valor de STAT1 es superior a 0,35 y STAT3 es inferior a 0,15, el macrófago se polarizará a un híbrido citotóxico y regulador M1M2d. Cuando combinamos valores altos de STAT1 y un valor de STAT6 entre 0,15 y 0,75, el macrófago transitará a un macrófago protumoral M2d. Una vez que los valores de STAT6 sean mayores a 0,75 tendremos dos posibles transiciones en función del nivel de expresión de STAT1. Cuando los valores son inferiores a 0,35 se pasa a un híbrido trifenotípico con comportamiento completamente protumoral M2aM2cM2d, y cuando los valores son superiores a 0,35 se pasa a un M2aM2d inhibiendo la acción STAT3. La dinámica de competencia de STAT3 con STAT1 es diferente y se basa en el valor de STAT3 (Figura 17C). Cuando los valores son inferiores a 0,35, se polarizará a un M1M2b, y en valores entre 0,35 y 0,75, el macrófago se polarizará a un macrófago M2d. Si ya menos que los valores sean superiores a 0,75, cambiará a un macrófago regulador y protumoral M2cM2d. STAT1 tiene un comportamiento dominante frente a HIF1α, solo cuando

HIF1 $\alpha$  es superior a 0,75, el macrófago se polarizará a un fenotipo M2d, en lugar de valores más bajos de 0,75, cambiará a un macrófago M1M2b (Figura 17D).

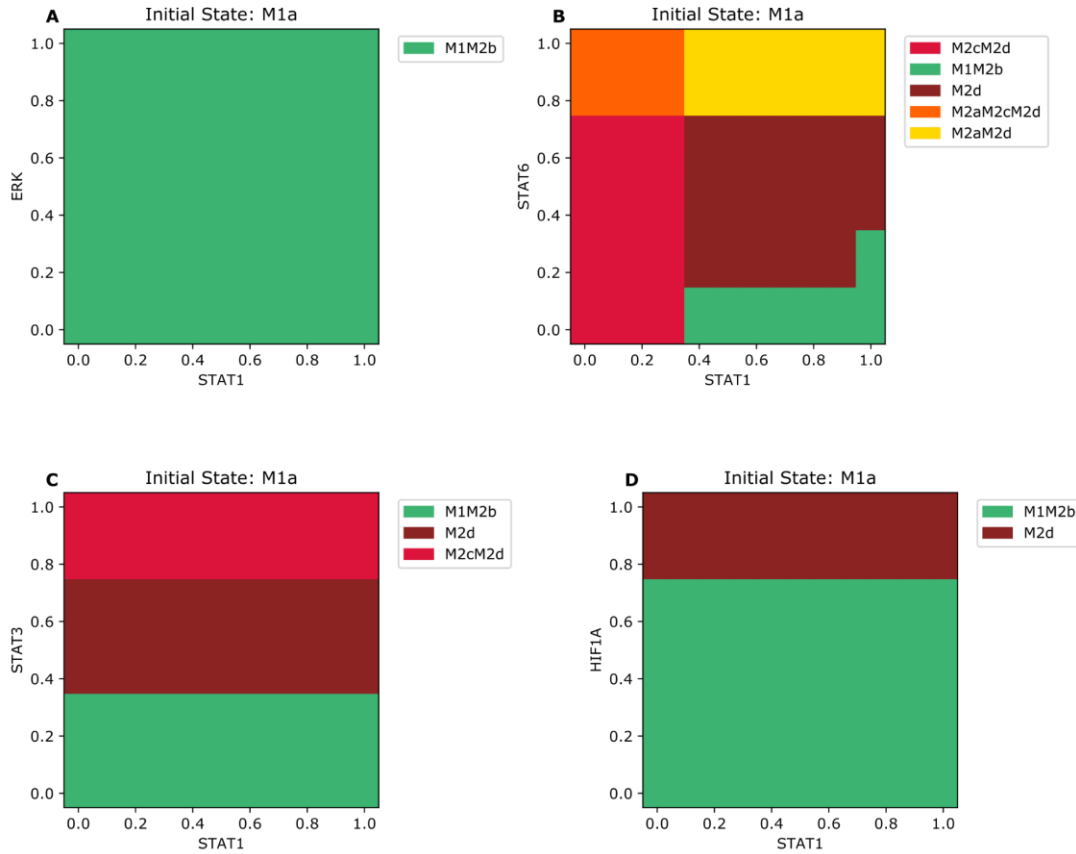


Figura 17. Diagramas de espacio de fenotipo para el fenotipo de macrófago M1a en microambientes opuestos. Todos los paneles del diagrama tienen como estado inicial el macrófago M1a (STAT1 activado). También para todos los paneles, STAT1 aumenta gradualmente en los microambientes de macrófagos opuestos (A) aumento gradual del factor de transcripción ERK en un microambiente proM2b, (B) mejora del factor de transcripción STAT6 en un microambiente pro-M2a (C) aumento gradual del factor de transcripción STAT3 en un microambiente pro-M2c, (D) aumento gradual de HIF1- $\alpha$  en un microambiente pro-M2d.

Comparamos el comportamiento de los subtipos M2 en M1 y los otros microambientes de subtipos M2. Cuando el estado inicial es un macrófago M2a y se introduce en un microambiente pro-M1, se comporta de manera ligeramente diferente cuando evaluamos el escenario viceversa. Si bien los valores de STAT6 son inferiores a 0,35, independientemente del valor de



NFκB, cambiará a un M1M2b híbrido regulador/antitumoral (Figura S16A). Una vez que los valores de STAT6 están entre 0,35 y 0,75, existe biestabilidad basada en el nivel de expresión de NFκB, los valores inferiores a 0,35 cambiarán a un fenotipo M2cM2d, mientras que los superiores a 0,35 se polarizarán a un macrófago M2d. El único para mantener un híbrido que tiene un componente M2a es cuando los valores son superiores a 0,75, se polarizará en dos híbridos: M2aM2d y M2aM2cM2d en función de la cantidad de NFκB. Mientras que el valor de STAT6 es inferior a 0,35, mezclado con una variedad de valores de STAT1 tendremos tres tipos de comportamiento; valores inferiores a 0,25 se desplazará a un monocito, valores entre 0,25 y 0,75 habrá un período de incertidumbre, el fenotipo aún no está definido y valores superiores a 0,75 se polarizará a un macrófago antitumoral M1 (Figura S16B). Los valores de STAT6 entre 0,35 y 0,75, independientemente de la cantidad de STAT1, se polarizarán en un macrófago M2d debido a la secreción de TGF-β. Los valores más altos de STAT6 están asociados con un fenotipo híbrido M2aM2d. Ahora, el comportamiento es diferente si introducimos un macrófago M2a en un microambiente M2b (Figura S16C). Cuando los valores de STAT6 son inferiores a 0,35 mezclados con una cantidad de ERK inferior a 0,25, el macrófago volverá a convertirse en un monocito, pero cuando los valores de ERK estén entre 0,25 y 0,75, no se definirá el fenotipo del macrófago. Los valores de ERK superiores a 0,75 combinados con una baja expresión de STAT6, el macrófago cambiará a un fenotipo M2b (Figura S16C). Durante STAT6 los valores están entre 0,25 y 0,75, sin importar la cantidad de NFκB, transitará a un macrófago M2d. Los valores superiores a 0,75 de STAT6 se asocian con un doble híbrido que incluye el fenotipo M2a. Si los valores de ERK son inferiores a 0,75, cambiará a un fenotipo M2aM2d, mientras que los valores superiores a 0,75 incluirán el fenotipo M2b en un híbrido de tres fenotipos con un comportamiento regulador de macrófagos M2aM2bM2d.

El macrófago M2b como estado inicial se comporta de manera diferente cuando se establece en dos tipos de microambientes M1. En el entorno donde se activa NFkB, el macrófago M2b pasa a dos fenotipos según la expresión de ERK (Figura S17A). Si ERK es superior a 0,45, el macrófago se polarizará a un fenotipo M2cM2d debido a la secreción de la citocina reguladora IL-10, mientras que, cuando los valores sean inferiores, cambiará a un fenotipo M1M2b. En un microentorno activado por STAT1, existe una brecha de incertidumbre cuando la cantidad de ERK y STAT1 está entre 0,25 y 0,75 (Figura S17B). Cuando STAT1 es superior a 0,75, M2b se polarizará a un fenotipo M1, cuando el valor de ERK es inferior a 0,75. Una combinación del valor más alto de STAT1 y ERK se asocia con un M1M2b híbrido. Con valores más altos de ERK mezclados con valores más bajos de STAT1, el macrófago permanecerá en el mismo fenotipo. M2b en un microentorno STAT3 tiene un comportamiento complicado (Figura S17D). Cuando los valores de ERK están entre 0,25 y 0,75 mezclados con un valor más bajo de STAT3, hay un período de incertidumbre. Independientemente del valor de ERK mezclado con un rango de STAT3 entre 0,25 y 0,35, el macrófago cambiará a un fenotipo M2d. Si la cantidad de STAT3 está entre 0,45 y 0,75 combinado con un valor de ERK inferior a 0,75, pasará a un macrófago M2aM2d, los valores más altos de STAT3 están asociados con un M2aM2cM2d. Cuando ERK es superior a 0,75 y STAT3 superior a 0,35, cambiará a un macrófago M2aM2bM2d, los valores más bajos de STAT3 y una gran cantidad de ERK están implicados en que el macrófago se mantiene en un fenotipo M2b (Figura S17D). En un ambiente hipóxico, el período de incertidumbre es cuando tanto HIF1 $\alpha$  como ERK son inferiores a 0,45. En estado hipóxico, un macrófago M2a puede aparecer cuando los valores de ERK son superiores a 0,45 y HIF1 $\alpha$  oscila entre 0,45 y 0,75. Cuando la cantidad de HIF1 $\alpha$  es superior a 0,75, puede haber dos fenotipos posibles basados en la expresión de ERK (Figura S17E). Si ERK es inferior a 0,75, el macrófago se polarizará a un macrófago M2aM2cM2d; en cambio, si los valores de ERK son superiores a 0,75, el macrófago cambiará a un

M2aM2bM2d que incorpora los fenotipos M2b, en lugar de la contraparte M2c (Figura S17E).

El macrófago más contra prudente M2c tiene dominancia en el microambiente M1 si tenemos como estado inicial dicho macrófago. En el caso de NFkB, si STAT3 es inferior a 0,35 combinado con un valor creciente de NFkB (Figura 18A), el macrófago cambiará a un fenotipo M1M2b, en cambio, si STAT3 está entre 0,35 y 0,75, transitará a un macrófago M2d. Pero si STAT3 es superior a 0,75, independientemente del valor de NFkB, se polarizará a un fenotipo M2cM2d. Para STAT1, el patrón de polarización es un poco complejo (Figura 18B). El macrófago puede cambiar a un antitumoral si STAT1 es superior a 0,75 mezclado con STAT3 inferior a 0,35. STAT3 tiene una dominancia frente a STAT1 si el valor es superior a 0,35, el macrófago transitará a un híbrido protumoral y regulador independientemente de la expresión de STAT3. En un microambiente hipóxico, el fenotipo M2a dominará en la dinámica de polarización (Figura 18C). Solo cuando STAT3 es superior a 0,75, el macrófago cambiará a un híbrido M2aM2cM2d con el M2c, pero también con el compartimento M2a. El macrófago M2d tiene un comportamiento diferente en los tipos de microambientes M1. Para NFkB, el macrófago se polarizará a un M1M2b híbrido antitumoral/regulador si el valor de HIF1 $\alpha$  es inferior a 0,75; en cambio, el macrófago permanecerá en el mismo fenotipo (Figura 17A). En un microambiente de interferón, si STAT1 es superior a 0,75 y HIF1 $\alpha$  es inferior a 0,75, el macrófago se polarizará en un tumor M1 y eliminará al macrófago. Pero si HIF1 $\alpha$  es superior a 0,75, mantendrá el mismo fenotipo independientemente de la expresión de STAT1 (Figura 18E). En un período en el que HIF1a oscila entre 0,55 y 0,75 mezclado con una expresión de STAT1 entre 0 y 0,25, el macrófago transitará a un híbrido M1M2b. Hay una gran brecha donde el macrófago se encuentra en un período de incertidumbre (Figura 18E).

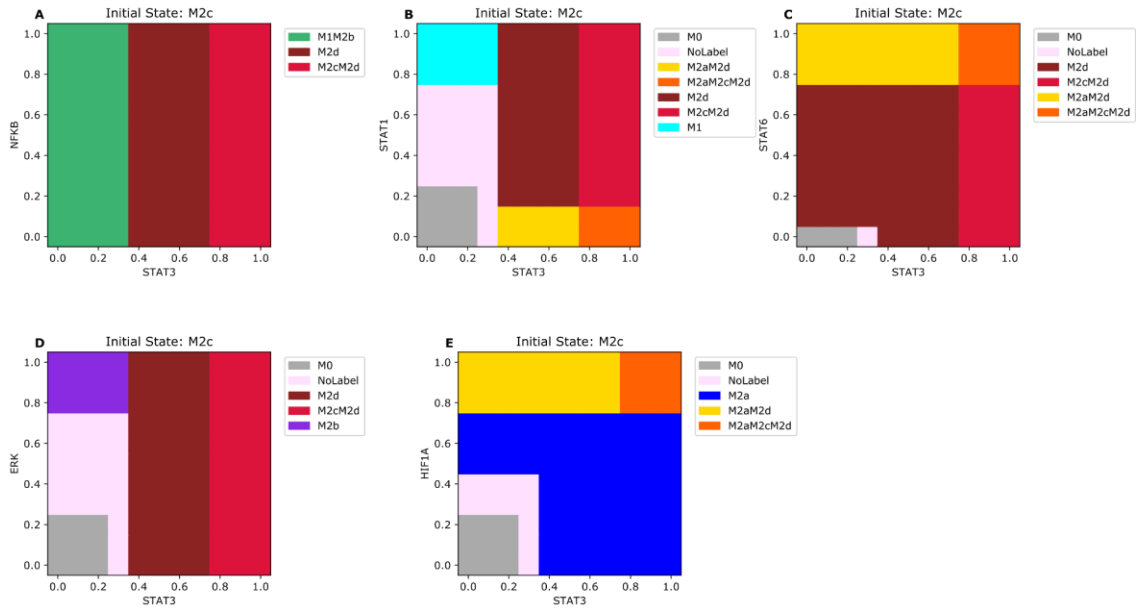


Figura 18. Diagramas de espacio de fenotipo para el fenotipo de macrófago M2c en microambientes opuestos. Todos los paneles del diagrama tienen como estado inicial el macrófago M2c (STAT3 activado). También para todos los paneles, STAT1 aumenta gradualmente en los microambientes de macrófagos opuestos (A) Incremento gradual de NFκB en un microambiente pro-M1, (B) Mejora gradual de STAT1 en un microambiente pro-M1a, (C) mejora de la transcripción de STAT6 factor en un microambiente pro-M2a (D) Aumento gradual del factor de transcripción ERK en un microambiente pro-M2b, (E) aumento gradual de HIF1-α en un microambiente pro-M2d.

## 6.3 Atractores cíclicos como reservorios teóricos cuando están perturbados: un enfoque de polarización de macrófagos en un microambiente tumoral.

6.3.1 Los atractores de ciclo emergen de la perturbación de componentes moleculares en el análisis del destino celular de la polarización de macrófagos.

La red de polarización de macrófagos reconstruida en un microambiente tumoral se simuló meticulosamente como un modelo booleano dinámico utilizando el esquema de actualización síncrona hasta que los sistemas alcanzan sus etapas de equilibrio (atractores) (Figura 1). Para identificar similitudes entre los atractores, hemos hecho un mapa bidimensional utilizando el algoritmo de incrustación de vecinos estocásticos distribuidos (104). Como resultado obtuvimos 27 atractores, de los cuales 19 eran atractores simples y los restantes atractores cíclicos. Para asociar los atractores con una funcionalidad biológica, nombramos cada atractor en base a evidencia experimental *in vitro* considerando seis posibles fenotipos específicos de macrófagos, consulte la Tabla 1 en (102). En esta investigación, definimos un macrófago basado en el posible comportamiento funcional en un microambiente tumoral, es decir, macrófagos que eliminan o promueven tumores (105). De los 19 atractores simples, diez están asociados con un comportamiento promotor de tumores y los restantes están implicados con funciones híbridas que integran propiedades de eliminación y promoción de tumores. A partir de aquí, concluimos que, en un microambiente tumoral, el equilibrio entre los procesos proinflamatorios y antiinflamatorios se inclina hacia las propiedades antiinflamatorias promotoras de tumores (105,106). Por otro lado, todos los atractores del ciclo tienen un fenotipo híbrido con más de dos fenotipos de macrófagos expresados simultáneamente en cada estado. Solo dos atractores de ciclo tienen un período de dos y los restantes tienen un período de cuatro. Desde un punto de vista práctico, podemos sugerir la funcionalidad de cada atractor y los reguladores que involucran en

la red. El atractor de ciclo de dos períodos M0/M1M2c está asociado con la activación de AP-1, STAT3 y NFκB. Para la activación de estos factores de transcripción IL-6, IL1-β e IL-10 son las citocinas exógenas presentes en el microambiente. El atractor de ciclo de cuatro períodos M1/M1M2c/M1/M1M2c está asociado con la expresión de una IL-6 pleiotrópica que está implicada en la inflamación aguda y la proliferación tumoral. La IL-6 tiene la capacidad de activar los factores de transcripción AP-1 y STAT3 (107), ambos factores están implicados en comportamientos duales en el cáncer. La IL-6 está asociada con un vaivén entre la eliminación del tumor y la promoción del tumor. La evidencia experimental ha demostrado que es capaz de promover una retroalimentación positiva entre el cáncer de mama y los macrófagos asociados al tumor para la metástasis y la proliferación(108,109). Los atractores de ciclo de dos y cuatro grados M1M2b/M1M2bM2c y M1M2b/M1M2bM2c/M1M2b/M1M2bM2c están dictados por la expresión de STAT1, AP-1, NFκB y STAT3. El M2b/M1M2bM2c/M2b/M1M2bM2c se mantiene en un ciclo debido a la acción de un proinflamatorio IL1-β. Al igual que la IL6, la IL1-β tiene dos lados en una historia: la promoción de tumores y la inhibición de tumores. Estas citoquinas están conectadas porque están asociadas con la secreción de citoquinas y factores promotores de tumores para mejorar la capacidad de las células de cáncer de mama para prosperar y hacer metástasis(110). Sin embargo, tienen capacidad inhibidora de tumores porque promueven un comportamiento citotóxico tumoral M1 y reclutan TH1 y TH17 como efectos antitumorales(111). Otro ciclo atractor es M0/M2c/M0/M2c, este ciclo atractor está asociado con la expresión de STAT3 causada por IL-10 o IL-6. Curiosamente, cuando alguna de estas citocinas no está presente, el fenotipo M2c se remonta a un monocito con capacidades de secreción M2c.

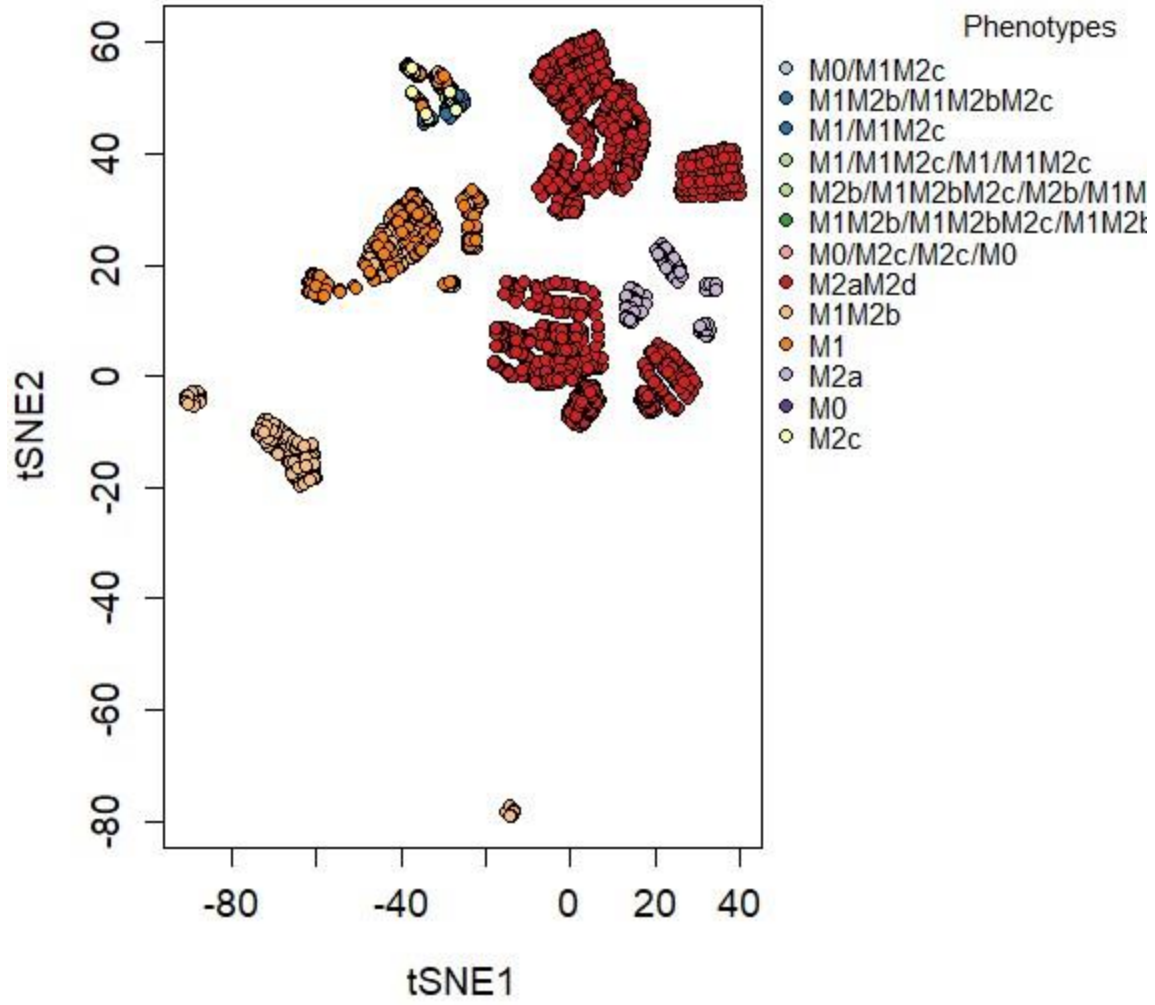


Figura 19. El gráfico t-SNE de los fenotipos obtenidos de nuestra red de polarización de macrófagos. A los atractores se les entregó un punto en un plano x-y basado en la expresión de 0 y 1, y se colocaron cerca atractores con la misma combinación de 0 y 1.

6.3.2 La perturbación de componentes moleculares clave está asociada con transiciones a atractores de ciclo que pueden actuar como reservorios.

Con el propósito de esbozar el paisaje fenotípico, evaluamos las transiciones factibles entre atractores cuando ocurre una perturbación de cambio de bit en el estado de un nodo. Esta perturbación se logró computacionalmente cambiando permanentemente el estado de un nodo de 0 a 1, o viceversa, de cada uno de los atractores. Como muestra la Figura 20, hemos caracterizado el espacio de transiciones factibles para seis atractores individuales obtenidos para el TRN de macrófagos. Comenzaremos describiendo la dinámica del monocito en respuesta a una perturbación interna, vea la Figura 20A. Nuestra primera observación fue que la activación de STAT1 o NF $\kappa$ B en monocitos favorece la transición al fenotipo M1 (Figura 20A). Además, cuando introducimos un monocito en un microambiente IL-10 (simulado por la activación de IL-10), transita a un ciclo atractor con capacidad reguladora. Los monocitos tienen la capacidad de secretar IL-10 y TGF- $\beta$ , ambos TF activan STAT3 de forma independiente(112,113). Además, la secreción autocrina del efector de la secreción inmune TGF- $\beta$  es un factor importante para el mantenimiento y supervivencia de los monocitos, el TGF- $\beta$  también es secretado por los macrófagos M2c (26,114). Por otro lado, los TF asociados al proinflamatorio del fenotipo M1 son NF $\kappa$ B o STAT1. Si inactivamos NF $\kappa$ B, el macrófago M1 transitará a un atractor de ciclo M1/M1M2c/M1/M1M2c donde AP-1 está asociado con M1 y STAT3 con M2c respectivamente (Figura 20B). La activación de AP-1 en macrófagos M1 está implicada en la producción de intermediarios de nitrógeno, IL-6 y TNF- $\alpha$  (115), por lo que desarrolla capacidades tumorocidas(29,116). En cambio, la contraparte de M2c está asociada con la secreción de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-6 (26). La única citoquina en común en el ciclo atractor M1/M1M2c/M1/M1M2c es la IL-6 que dictará las oscilaciones entre estados, una citoquina pleiotrópica con un mecanismo de regulación de la secreción de citoquinas

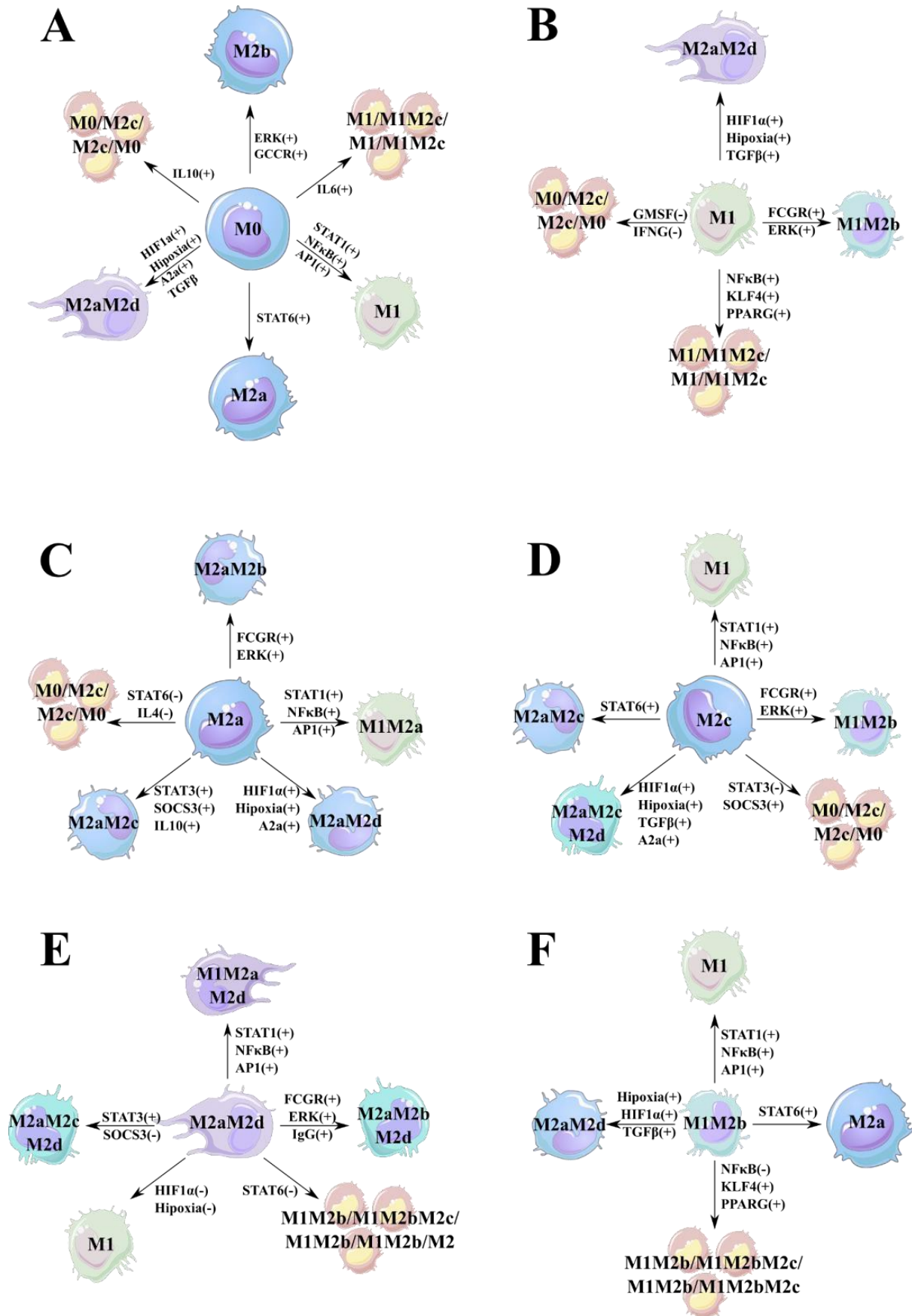


por macrófagos. El interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) es un factor importante debido a su comportamiento proapoptótico y antiproliferativo en TME. Si inactivamos el IFN- $\gamma$  el macrófago M1 transitará a un ciclo atractor M0/M2c/M2c/M0 perdiendo las propiedades antitumorales por la inactivación de STAT1 (Figura 20B) (117). GM-CSF está implicado con componentes proinflamatorios y, si se inactiva, transitará al atractor M0/M2c/M2c/M0 (Figura 20B) (118). Además, la pérdida de este TF se asocia con un monocito ingenuo, porque los monocitos no nativos se diferencian en presencia de GM-CSF y los macrófagos ingenuos son más susceptibles al estímulo ambiental (119).

En términos del macrófago M2a, observamos que a medida que se elimina STAT6, el macrófago cambia al atractor de ciclo M0/M2c/M2c/M0 (Figura 20C). En cambio, el macrófago regulador y protumoral desfavorable M2c es activado por STAT3 y la inhibición de SOCS3 (Figura 20D). Una vez que perturbamos STAT3 en M2C, el macrófago se polariza a un atractor de ciclo M0/M2c/M0/M2c. Si activamos SOCS3, que se activa mediante STAT1 o NF $\kappa$ B, cambiará el fenotipo y entrará en el mismo ciclo atractor (Figura 20C). Desde un sentido biológico, M2aM2d es un macrófago desfavorable porque está asociado con propiedades promotoras de tumores al estimular la producción de citoquinas y factores de crecimiento con capacidad proproliferativa. Nuestro análisis computacional postula que los factores de transcripción clave que dan forma a

M2aM2d son STAT6 y HIF1 $\alpha$  para los macrófagos M2a y M2d respectivamente (Figura 20E). El fenotipo híbrido de macrófagos M2aM2d está implicado en un comportamiento regulador, secretando citocinas y factores de crecimiento para potenciar el crecimiento tumoral, este es uno de los fenotipos que queremos evitar en un entorno hiperregulador (102). Cuando se perturba STAT6, el estado de la red transita al ciclo atractor M1M2b/M1M2bM2c/M1M2b/M1M2bM2c. STAT6 tiene la capacidad de reprimir la expresión del TF asociado al fenotipo M1 (STAT1, NF $\kappa$ B) y al

fenotipo macrófago M2b (AP-1) (26). El macrófago M2b tiene la capacidad de secretar citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF-) y citoquinas antiinflamatorias (IL10) (26,28). Una vez inactivamos la expresión de STAT6, permite la expresión del fenotipo híbrido M1M2b (STAT1 o NFκB mezclado con AP-1). Mientras tanto, esta perturbación inclina la balanza hacia un estado más proinflamatorio, los macrófagos generan un ciclo atractor que va y viene con el componente regulador del fenotipo del macrófago M2c, que contrarresta el estado proinflamatorio secretando IL-10. Finalmente, otro atractor importante es el híbrido M1M2b (Figura 20F) que tiene una mezcla de propiedades favorables y desfavorables en un microambiente tumoral. Para este híbrido, los factores de transcripción importantes son NFκB y AP-1 activados por IL1-β. Si inactivamos IL1-β, se polarizará a un macrófago M1 favorable porque AP-1 ya no está activado y perdemos la contraparte M2b. Pero si inactivamos NFκB inhibiendo TNF-α en el microambiente, el híbrido cambiará a un ciclo atractor M1M2b/M1M2bM2c/M1M2b/M1M2bM2c, que actúa como reservorio para no perder todo el fenotipo híbrido M1M2b. Si activamos PPAR-γ o KLF4, M1M2b transitará a los mismos atractores del ciclo, ya que PPAR-γ o KLF4 eventualmente activarán STAT6, que a su vez tiene la capacidad de inactivar NFκB en desarrollo en la primera perturbación descrita anteriormente. KLF4 y PPAR-γ normalmente se activan en microambientes bajos en oxígeno como una respuesta metabólica en un escenario hipóxico. Además, estos factores están implicados en la liberación de factores de crecimiento y citoquinas asociadas con un macrófago M2a que intenta alimentar a las células cancerosas en un escenario adverso permitiéndoles prosperar.



*Figura 20. Mapa de destino celular de la polarización de macrófagos. De todos los atractores obtenidos, cambiamos el valor del nodo y mantuvimos esta perturbación hasta llegar a un atractor. Si el atractor pasa a otro fenotipo, lo representamos con una línea y el nuevo fenotipo obtenido por la perturbación. El signo más (+) de perturbación simple significa que el nodo se apagó y lo encendimos, mientras que el signo menos (-) significa que la perturbación estaba encendida y lo apagamos. (A) Mapa de destino celular de monocitos (M0). (B) Mapa de destino celular del macrófago M1. (C) Mapa de destino celular del macrófago M2a. (D) Mapa de destino celular del macrófago M2c. (E) Mapa de destino celular del macrófago M2aM2d. (F) Mapa de destino celular del macrófago M1M2b. Los colores representan diferentes estados de polarización de macrófagos.*

## 6.4 Diferenciación Metabólica en la Polarización del Macrófago: Un análisis estadístico y de enriquecimiento

Los datos de metaboloma utilizados para la diferenciación metabólica del macrófago fueron obtenidos de (68). Con la finalidad de diferenciar sus fenotipos, se realizaron múltiples comparaciones, las cuales se pueden dividir en tres grupos. Primero, la comparación del monocito con respecto a los 5 tipos de macrófagos activados. Posterior a eso, la comparación entre el macrófago con capacidad citotóxica activado por (activado por IFN- $\gamma$ +LPS). Finalmente, la comparación entre los macrófagos con capacidad regulatoria, el activado ya sea por IL-4 (M2a), LPS y IgG (M2b), IL-10 (M2c) y IL-6 (M2d). Se realizaron todas estas comparaciones para poder discernir fenotipos metabólicos con base en los factores transcripcionales activados.

## 6.4.1 Diferenciación entre los monocitos y los cinco fenotipos de macrófagos

### 6.4.1.1 M0 vs M1: Análisis de datos y enriquecimiento

Con el propósito de identificar los metabolitos con mayor expresión entre ambas poblaciones, utilizamos O-PLSDA y validación cruzada, ver figura S18. Los metabolitos en mejor posición son tres: el ácido itacónico, ácido quinolínico y Lquinurenina. Notablemente, los tres metabolitos están asociados en dirigir un macrófago con actividad citotóxica y la eliminación de células tumorales (122–124). Además, la gran mayoría de los metabolitos encontrados cuya expresión es alta en los macrófagos de tipo M1 se encuentran en el metabolismo del triptófano, fenilalanina, degradación de ácidos grasos, metabolismo de purinas, degradación de lisina y el metabolismo nicotinato y nicotinamida, este último con una gran importancia para llevar a cabo una respuesta pro-inflamatoria (125,126) (Figura 21). La separación entre los metabo-fenotipos comparados es de 12.7%, lo cual implica que el macrófago de tipo M1 es distinto con este respectivo porcentaje (Figura S19B). En cambio, la variación dentro de las muestras de cada fenotipo es de alrededor el 65%, lo cual menciona que las muestras comparadas tienen la misma variación (Figura S19B).

La vía mayormente enriquecida y con impacto de vía es la biosíntesis aminoácil-tRNA el cual es necesario para la activación de NFκB y la secreción de citocinas pro-inflamatorias (TNF-α y IL-8) (127). Además, la presencia de esta vía metabólica es una cuestión importante para la maduración de un macrófago derivado de un monocito (128). Complementariamente, un gran número de vías están enriquecidas asociadas a los aminoácidos, los cuales son importantes para montar una buena respuesta inmunológica. La biosíntesis de triptófano, fenilalanina y tirosina son de gran importancia para el funcionamiento de la polarización del macrófago. La activación de fenilalanina está implicada en la secreción de IL-1β (129), mientras la

biosíntesis de tirosina es importante para la formación de receptores como fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y activado por mitógeno proteína quinasa (MAPquinasa), los cuales tienen una importancia en la señalización de metabolismo en macrófagos (130,131). El metabolismo del triptófano a pesar de ser activado por citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ), cuando se encuentra sobre expresado se inclina hacia un fenotipo de regulación inmunológico, es decir un macrófago de tipo M2 (132,133). La activación del metabolismo del triptófano está implicada en la producción de quinurenina, el cual tiene la capacidad de regular la respuesta inmunológica debido a su función como un ligando del hidrocarburo arilo receptor (AhR). La pérdida de AhR en macrófagos está implicado en un decaimiento de la producción de óxido nítrico, pero en una secreción descontrolada de citocinas proinflamatorias (134), por lo tanto la regulación de este receptor podría servir como una terapia metabo-inmunológica (135). Un aumento de AhR está implicado en la polarización de monocitos hacia células dendríticas a través de BLIMP-1 (136). La inhibición de aminoácidos de cadena ramificada como la valina, leucina, e isoleucina están implicados en la pérdida de la glucólisis, afectando la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  (137). Igualmente, la pérdida de estos aminoácidos afecta la capacidad fagocítica del macrófago, un comportamiento que usan los tumores para evitar ser eliminados y favorecer el crecimiento tumoral (138). El metabolismo de serina y glicina este asociado a evitar la inhibición de NF $\kappa$ B por un desbalance de redox por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), además fortalece la secreción de citocinas proinflamatorias como IL1 $\beta$  (139,140). El metabolismo de nicotinato y nicotinamida está implicado en aumentar un macrófago con actividad proinflamatoria y la capacidad de inhibir la función antiinflamatoria de los macrófagos (125,141). El aumento del metabolismo de las pirimidinas está relacionado con un aumento de las vías de las pentosas fosfato, cambio que sucede en la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M1 (142), además está implicado en aumentar la secreción de quimiocinas proinflamatorias. Finalmente, el metabolismo de la arginina

cuando hay un estímulo proinflamatorio se cataboliza hacia citrulina y NO, ambos compuestos con una excelente capacidad de eliminación de tumores o patógenos (143).

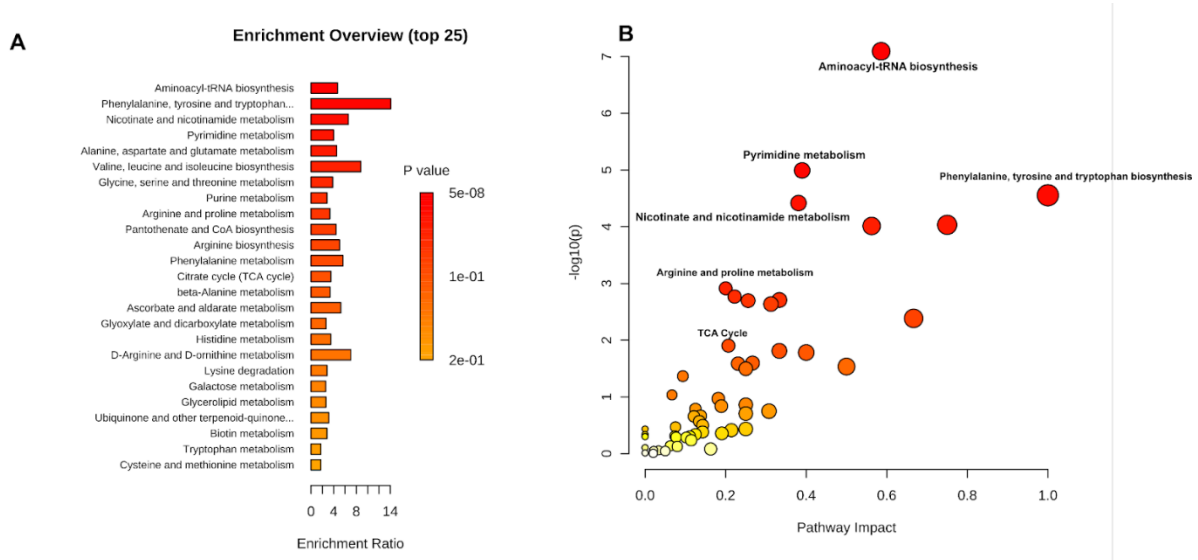


Figura 21. Comparación entre M0 y M1 activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M1.

#### 6.4.1.2 M0 vs M2a: Análisis de datos y enriquecimiento

En esta sección evaluamos las diferencias metabo-fenotípicas entre un monocito (M0) y un macrófago activado por IL-4 (M2a). Dentro de los metabolitos con mayor expresión en el método de validación encontrada identificamos: Ácido 5aminopentanoico, ácido ureido propiónico, ácido glucurónico de difosfato de uridina, mio-inositol y disulfuro de cisteineglutación (Figura S20A). El ácido 5-aminopentanoico es un delta aminoácido que tiene

la capacidad de inhibir la secreción de citocinas proinflamatorias y especies reactivas de nitrógeno, favoreciendo la polarización de un macrófago con capacidad regulatoria (144). En cambio, el ácido ureido propiónico es un intermediario del metabolismo de las  $\beta$ -alaninas, las cuales están implicadas en la regulación del sistema inmunológico (145). Mio-inositol está asociado a aumentar la capacidad fagocítica de los macrófagos, una característica de los macrófagos activados con M2a (146). Por otra parte, Disulfuro de cisteineglutathione está implicado en el reciclaje de glutatión, el metabolismo de dicho compuesto está asociado en la inhibición de la función de un factor transcripcional proinflamatorio NF $\kappa$ B (147). La separación entre los metabolotipos comparados es de 8.1%, lo cual quiere decir que el macrófago de tipo M2a es distinto con este respectivo porcentaje (Figura S20B). En cambio, la variación dentro de las muestras de cada fenotipo es de alrededor el 67.5%, lo cual implica que las muestras comparadas tienen la misma variación (Figura S20B). En el análisis de enriquecimiento se observaron el metabolismo de las purinas, la biosíntesis de arginina, metabolismo de galactosa, la biosíntesis de CoA, el ciclo de Krebs entre otras. El metabolismo de las purinas es un componente importante regulador de la respuesta citotóxica de un macrófago, ya que tiene la capacidad de inhibirlo y favorecer la polarización de un macrófago activado por IL-4 (148). La arginina debido a que el factor estimulante es IL-4, se polarizará hacia la producción de ornitina y urea. Los cuales son componentes importantes en la función de recuperación de tejido por parte del M2a (149). Además, la competencia contra el consumo de la arginina bloquearía la producción de NO, por lo tanto, inhibiendo la polarización de M1 hacia M2a (150). Por lo tanto, el metabolismo de la arginina es un factor polarizante dentro del macrófago.



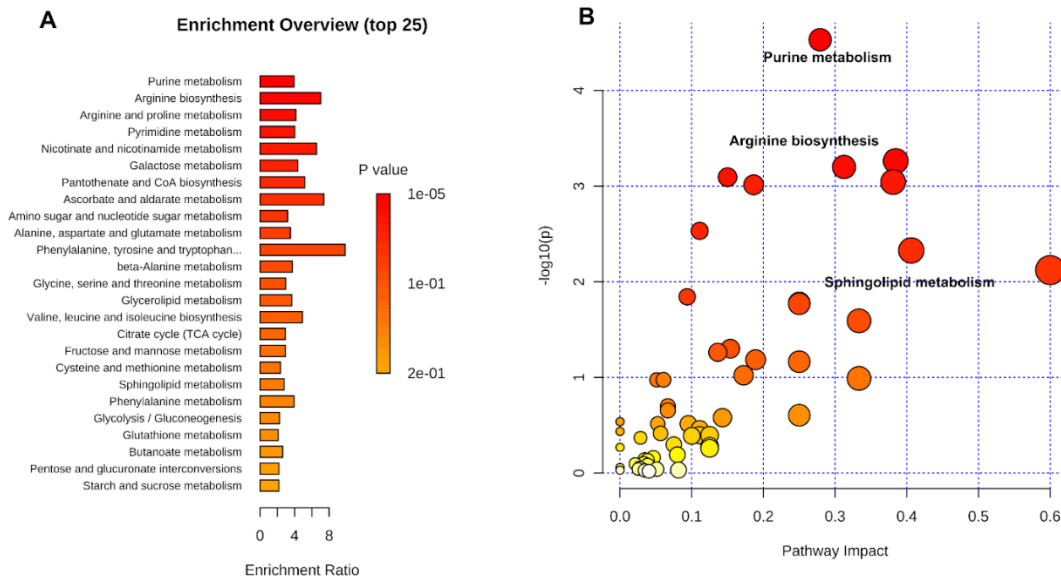


Figura 22. Comparación entre M0 y M2a activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2a.

### 6.4.1.3 M0 vs M2b: Análisis de datos y enriquecimiento

El análisis estadístico entre la diferencia entre el monocito y el macrófago activado por (IgG), muestra tres metabolitos con potencial para ser biomarcadores del fenotipo M2b: L-triptófano, ácido esteárico y MG (16:0/0:0/0:0) (Figura S21A). El metabolismo del triptófano como lo mostramos con anterioridad a una baja expresión tiene un funcionamiento proinflamatorio, pero cuando es activado por estímulo antiinflamatorio tiene un funcionamiento para poder evitar un estado hiper-inflamatorio y favorecer la secreción de citocinas antiinflamatorias (133). El triptófano no solo afecta el microambiente en el que se secreta, si no también tiene la capacidad de inhibir la proliferación de células T y así evitar que estas células lleven a cabo su función (151). Finalmente, MG (16:0/0:0/0:0) es un compuesto implicado en el metabolismo del triacilglicerol el cual se ha asociado en aumentar las funciones proinflamatorias facilitando la secreción de IL1 $\beta$  e IL-6 (152). El

macrófago M2b es el fenotipo con mayor variación con respecto al monocito con un 14.3% y una variación entre las muestras de casi el 60%, manteniendo en promedio la misma variación entre las comparaciones. El análisis de enriquecimiento del macrófago M2b muestra las mismas vías metabólicas que las anteriores comparaciones, sin embargo, está presente el ciclo de Krebs, el metabolismo de Nicotinate y nicotinamida, el metabolismo de purinas y pirimidinas, metabolismo de lípidos y el metabolismo de alanina, asparagina y aspartato (Figura 23). El ciclo de Krebs en los macrófagos de tipo M2 se encuentra intacto, es decir se lleva a cabo todo el proceso para poder utilizar la energía para los receptores de manosa y lecitina necesarios para poder llevar cabo sus funciones regulatorias y de recuperación de tejido (153). El metabolismo de la alanina y asparagina se mantiene enriquecido en la mayoría de las comparaciones, en cambio la acumulación de aspartato es una característica presente solo en los macrófagos M1 y M2b debido a que ayuda al metabolismo de la  $\beta$ -alanina para favorecer el metabolismo de nicotinato y nicotaminada, metabolismo asociado a un fenotipo proinflamatorio (122). El metabolismo de lípidos, en particular la de los glicerofosfolípidos está implicado en favorecer un comportamiento de regulación de tejido mediante la secreción de TGF- $\beta$  (154). Este fenotipo de macrófago tiene la capacidad de eliminar células tumorales por la secreción de citocinas proinflamatorias, pero teniendo las propiedades de un macrófago regulatorio para poder evitar un estado hiper-inflamatorio.

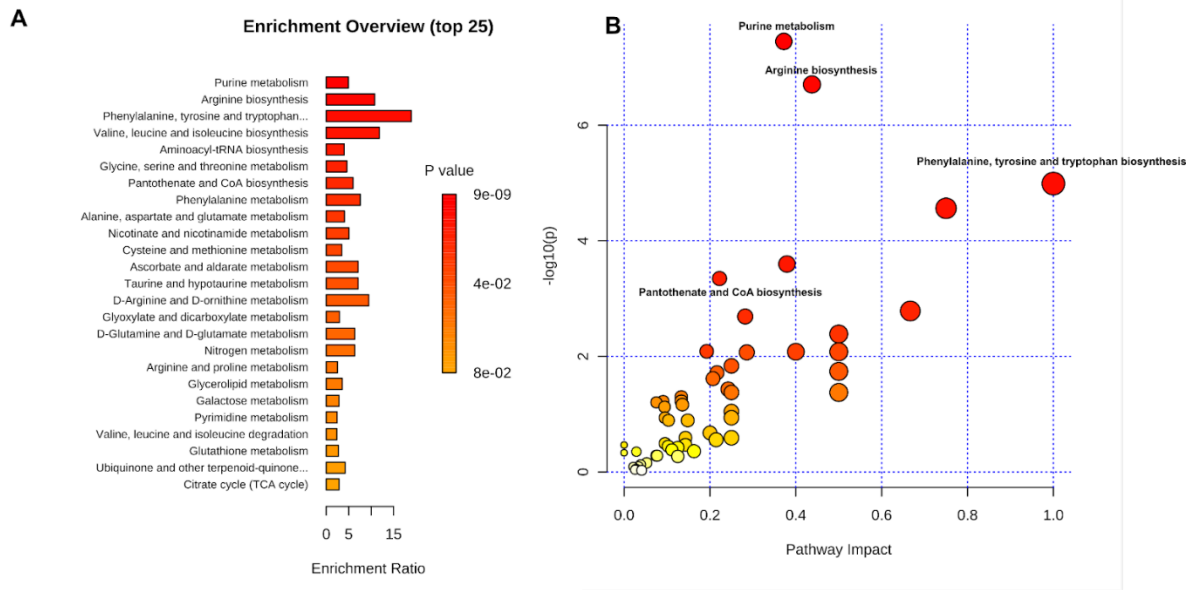


Figura 23. Comparación entre M0 y M2b activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change fue mayor a 2 y un p valor menor a 0.05, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2b.

#### 6.4.1.4 M0 vs M2c: Análisis de datos y enriquecimiento

En esta sección analizamos las diferencias metabólicas entre el macrófago activado por IL10 (M2c) y el monocito (M0). Primer evaluaremos los análisis estadísticos mediante el método de O-PLSDA. En la figura S22A, se encuentran los metabolitos mayormente diferenciados entre los macrófagos M2c con respecto a los monocitos, de los cuales son D-glucosa y MG (18:1(9Z) /0:0/0:0) (Figura 22C). La D-glucosa es un monosacárido el cual está presente en un sin fin de vías metabólicas, pero nosotros nos enfocaremos en el principal productor de energía: la vía glucolítica. En los macrófagos activados por IL-10, la glucólisis tiene la capacidad de secretar y de estabilizar a los macrófagos activados por IL-10 (155). Además, la oxidación de ácidos grasos no es el único factor para obtener energía y poder funcionar como un macrófago regulatorio, la glucólisis igual forma parte para ejercer este tipo de función (156). Sin embargo, microambientes con un alto contenido de glucosa, conlleva a una hiperreactividad del receptor IL-10 por lo tanto esta citocina no puede activar a STAT3, implicado con una inflamación crónica en pacientes con diabetes tipo 2

(157,158). La oxidación de ácidos grasos es un competente crucial en la polarización de los macrófagos hacia una función regulatoria, a partir de estas vías se obtiene la energía para poder llevar a cabo la secreción de IL-10 y su capacidad de carroñero (159). Curiosamente el macrófago activado por IL10 tiene la más baja variación fenotípica (8%) comparado con el monocito, la variación entre muestra se mantiene con el promedio de 60% (Figura S22B).

En el análisis de enriquecimiento las vías mayormente expresadas son el metabolismo de purinas, las biosíntesis de arginina y la biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano (Figura 24). La adenosina es una purina con un componente importante para la polarización hacia un macrófago activado por IL-10 porque genera una mejor activación de STAT3 y genera un microambiente para poder llevar a cabo sus funciones regulatorias (160). La biosíntesis de arginina junto con el IL-10 tiene la capacidad de aumentar la fosforilación oxidativa (161), la vía principal para obtener energía y no depender de manera directa de la glucólisis (153). Además, si la fosforilación oxidativa se mantiene intacta se facilita la polarización hacia un macrófago de tipo M2 (162). La biosíntesis de tirosina igual es importante ya que se encuentra en la mayoría de los receptores que llevan a cabo funciones regulatorias y están ligadas con la generación de arginina (163,164). Finalmente, el triptófano regula la expresión de IL-10 al aumentarle mediante la acción de (AhR) (165).

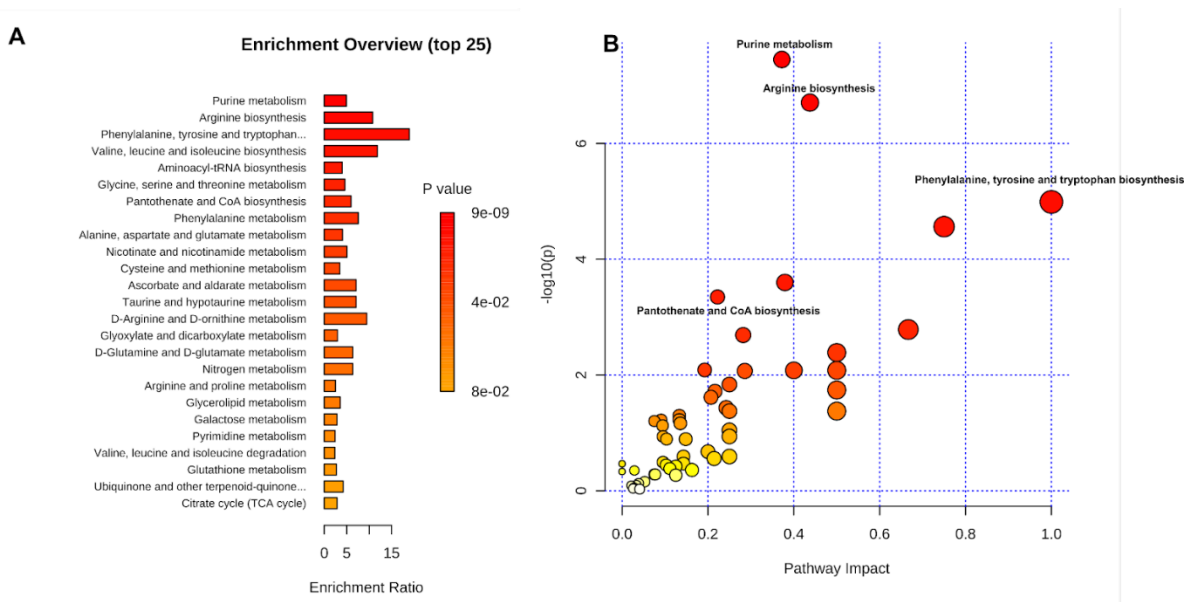


Figura 24. Comparación entre M0 y M2c activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2c

#### 6.4.1.5 M0 vs M2d: Análisis de datos y enriquecimiento

En la siguiente sección se comparó el macrófago activado por IL-6+LIF (M2d) con respecto al monocito (M0). Los metabolitos mayormente diferenciados de la comparación fueron: Prolilglicina, ácido 5-aminopentanoico y la 2-oxoarginina (Figura S23A). La prolilglicina está conformado por la prolina y la glicina. La prolina se ha demostrado que sirve para aumentar la actividad del ciclo de Krebs y favorecer un comportamiento ligado a la recuperación de tejido (166), el cual está intacto en los macrófagos de tipo M2 (167). Mientras tanto, la glicina está asociado en inhibir la activación de NF $\kappa$ B, por lo tanto, inhibiendo función citotóxica. Simultáneamente, la glicina favorece el comportamiento de recuperación de tejido al favorecer la activación de STAT6 (M2a) (168). Por otra parte, el 5-aminopentanoico es un metabolito asociado a la degradación de ácidos grasos, el cual es de gran relevancia porque tiene la capacidad de generar un comportamiento de recuperación de tejido (169). Concomitantemente este metabolito favorecer el escape de las células tumorales por ser eliminados por el sistema inmune debido a las propiedades regulatorias del macrófago (170). La 2-oxoarginina está implicado en la vía del metabolismo de la arginina, la cual ya sido estipulado la importancia en el comportamiento regulatorio. Además, IL-6, uno de los estimulantes de este tipo de macrófago favorece el metabolismo de la arginina hacia un comportamiento de regulación de tejido (171). El macrófago activado por IL-6 y LIF tiene una de las más bajas de variación fenotípica (10%) comparado con el monocito, la variación entre muestra se mantiene con el promedio de 65% (Figura S23B).

En el análisis de enriquecimiento se encuentran la vía de las purinas, la biosíntesis de la arginina y el ciclo de Krebs. Todas las vías metabólicas

mencionadas apuntan a un comportamiento de recuperación de tejido y de regulación del sistema inmunológico (Figura 25).

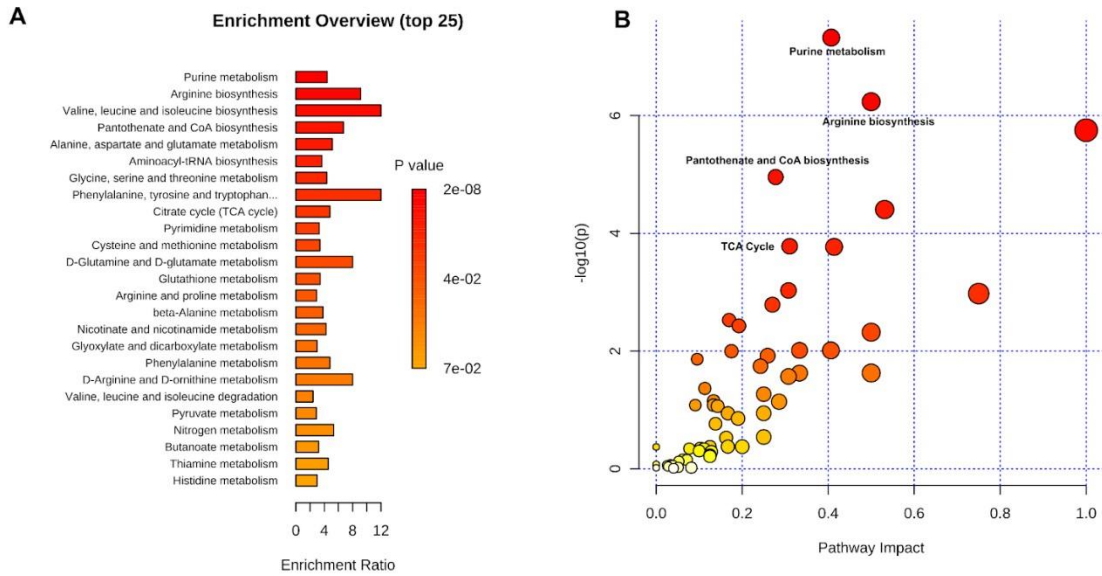


Figura 25. Comparación entre M0 y M2d activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2d.

### 6.4.2 Comparación del macrófago activado por LPS e IFN- $\gamma$ entre todos los macrófagos de tipo M2

En esta sección compararemos al macrófago citotóxico con respecto a los distintos macrófagos de tipo M2. Para no ser repetitivos solo mencionaremos ciertas vías metabólicas y su posible comportamiento del macrófago. Cuando comparamos M1 vs M2a, podemos observar una mayor presencia de metabolismo asociado a pirimidinas y de ácidos grasos (Figura S24). Estos metabolitos están más implicados en llevar a cabo una función de recuperación de tejido, característica asociada al macrófago activado por IL-4. A pesar de que el macrófago de tipo M2b tiene enriquecido asociado a un comportamiento citotóxico, al hacer la comparación entre estas poblaciones,

las vías metabólicas enriquecidas estarán asociadas al comportamiento de recuperación de tejido. Se encuentra activado la vía del ciclo de Krebs, la cual en el macrófago M2b se encuentra intacto y es la principal fuente de energía. Se encuentra la activación de degradación de ácidos grasos asociados a recuperación de tejido, pero igual se encuentra activado la síntesis de arginina el cual está implicado en la regulación del sistema inmunológico (Figura 26A y B). Tanto el enriquecimiento de la comparación entre M1 vs M2c (Figura S25A y B) y M1 vs M2d (Figura S26A y B) muestran vías metabólicas implicadas en recuperación de tejido y regulación del sistema inmunológico.

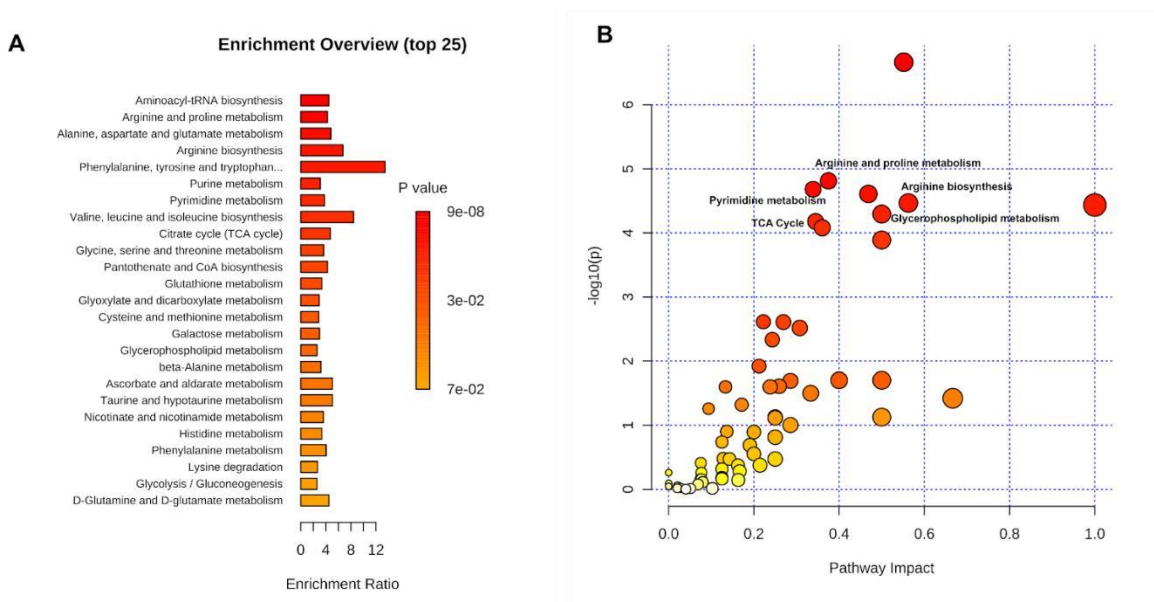


Figura 26. Comparación entre M1 y M2b activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2b.

### 6.4.3 Comparación entre los macrófagos activados por M2 independiente de su estímulo de activación

6.4.3.1 Diferencia entre el macrófago activado por IL4 y los demás macrófagos de tipo M2.

Al comparar las poblaciones con respecto a M2a, podemos observar las diferencias entre M2b y M2c. Por ejemplo, M2b tiene vías metabólicas enriquecidas implicadas en funciones proinflamatorias como por ejemplo el metabolismo de nicotinate y nicotinamide y la vía de aminoacyl-tRNA (Figura 27A y B). En cambio, las vías metabólicas para el macrófago M2c están asociados a comportamientos de regulación del sistema inmunológico para facilitar el escape de las células tumorales (Figura S27A y B). Como los macrófagos de tipo M2d son diferenciados por IL-6 y LIF, debido a IL-6 tiene algunas vías metabólicas ligadas a un comportamiento inflamatorio (Figura S28A y B).

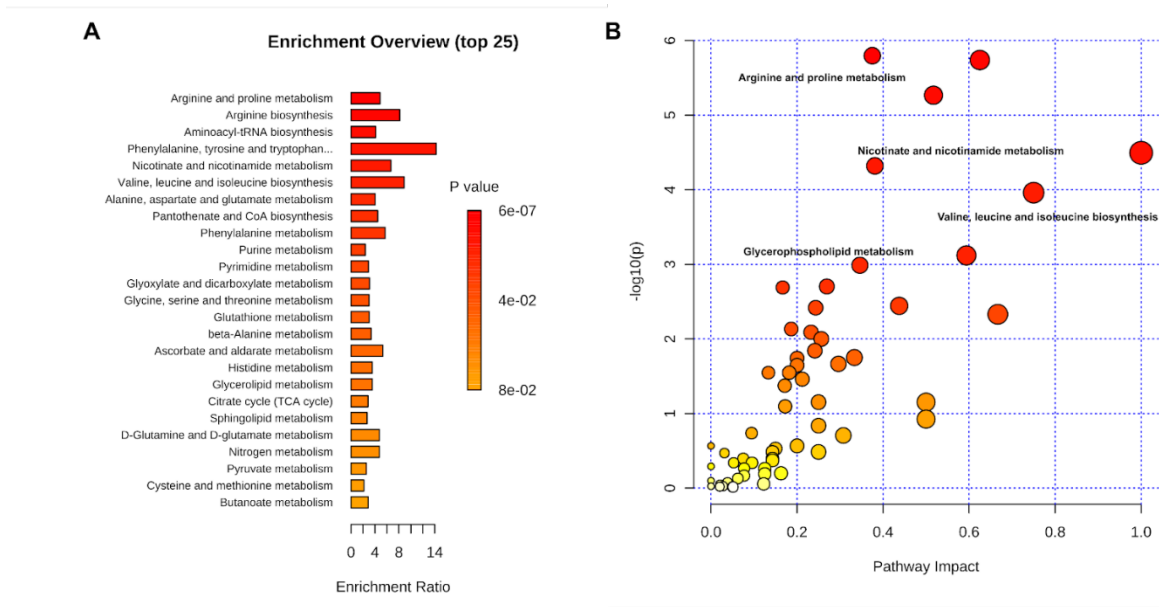


Figura 27. Comparación entre M2a y M2b activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2b.



## 6.5 Integración Metabólica del Macrófago con Metabolitos y Factores Transcripcionales

El metabolismo es un factor crucial para poder llevar a cabo la activación del macrófago y sus funciones fenotípicas. La caracterización metabólica y transcripcional de los macrófagos sólo se ha hecho para el macrófago activado por

LPS + IFN $\gamma$  e IL-4, es decir el macrófago de tipo inflamatorio M1 y el de recuperación de tejido M2a. Hasta la fecha de presentar esta tesis, solo un trabajo ha explorado diferenciar el metabolismo en los distintos tipos de macrófagos M2 (68). Es de resaltar que se han reportado avances significativos en integrar metabolismo y regulación transcripcional en monocito y el macrófago activado por LPS + IFN $\gamma$  (172). A pesar de la importancia de esta contribución, es un reto el estudio integrativo entre el metabolismo y regulación transcripcional, para los estadios de polarización del macrófago. Una serie de preguntas aún están abiertas, entre estas: 1) cómo factores transcripcionales con una capacidad polarizante (tales como STATs, NF $\kappa$ B) incide en las vías de señalización metabólica, además 2) cómo los procesos metabólicos tienen la capacidad de regular los factores transcripcionales con capacidad polarizante para mantener actividades específicas efectoras. Es por eso la necesidad de un modelo de integración, cuyo objetivo es en algún momento poder realizar simulaciones dinámicas del modelo. Con el objetivo de integrar la regulación con el metabolismo en macrófagos en esta sección de la tesis utilizamos la siguiente estrategia. Primero nos dimos a la tarea de caracterizar en la literatura los hallmarks metabólicos de cada uno de los macrófagos activados. Empecemos con el macrófago M1. El macrófago M1 se caracteriza por una vía glucolítica activa, que junto con la vía de las pentosas fosfato (173,174), se coordinan para obtener energía y llevar a cabo sus funciones pro-inflamatorias (175). Una peculiaridad del macrófago M1 es que el ciclo de Krebs se divide en dos partes: acumulación de citrato y de succinato (176–178). Otra característica

de los macrófagos activados mediante LPS + IFN $\gamma$  es una baja expresión de la fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos (179). En cambio, los macrófagos activados por IL-4 (M2) se comportan metabólicamente de manera distinta. Desde el punto de vista metabólico, este tipo de macrófago se caracteriza por un aumento de la fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos (180). En la primera parte de esta tesis, hemos mostrado cómo construimos una red de manera concisa sobre la polarización metabólica del macrófago basado en información experimental. Primero nos enfocamos en la activación del metabolismo de la glucosa. Para poder integrar esta parte necesitamos hablar sobre la regulación del blanco mamífero de rapamicina (mTOR), su activación por AKT y por la proteína quinasa activada por AMP 5' (AMPK). Ambas son importantes para censar energía que se necesita en la célula. Específicamente, mTOR censa y combina la disponibilidad de nutrientes con la regulación de los procesos metabólicos posteriores, como la síntesis de proteínas, la glucólisis y la lipogénesis de novo. Mientras tanto, AMPK detecta el estado de energía de una célula y, cuando es baja, inhibe las vías anabólicas e impulsa las catabólicas. Es por eso por lo que estos factores transcripcionales son pieza importante dentro de nuestra red. mTOR se divide en dos componentes: objetivo de mamíferos del complejo de rapamicina 1 (mTORC1) y objetivo de mamíferos del complejo de rapamicina 2 (mTORC2), la única diferencia entre estos componentes es que mTORC1 es sensible a raptor y mTORC2 a rictor. AKT1 es activado ya sea por LPS o IFN- $\gamma$  (181) y tiene la capacidad de activar a mTORC1 al inhibir la unión del complejo TSC1/TSC2 (182). A su vez, este complejo de manera indirecta favorece la expresión de IL-1 $\beta$  (183). Una vez activado, mTORC1 tiene la capacidad de favorecer la vía glucolítica al activar a HIF1- $\alpha$  (184). Sin embargo, la IL-10 (185) y la hipoxia (186) tienen la capacidad de inhibir la función de mTORC1 principalmente en un microambiente tumoral (Figura 28). AKT2, activado por IL-4 (macrófago de tipo M2), tiene la capacidad de inhibir a mTORC1 y FOXO1. FOXO1 activa la vía glucolítica en macrófagos al igual que mTORC1 (187), además está asociado en activar la expresión de TLR4

(188). AMPK tiene la capacidad de inducir el comportamiento de un macrófago activado por IL-4. Este factor transcripcional tiene la capacidad de inhibir a mTORC1 (189) y por lo tanto de manera indirecta inhibe la glucólisis y favorece la fosforilación oxidativa mediante la activación por IL-10 (190) (Figura 28). Este factor puede ser inhibido por LPS o IFN- $\gamma$  y así favorecer la polarización del macrófago a un comportamiento glucolítico (191). AMPK igual tiene la capacidad de inhibir la expresión de NF $\kappa$ B, el cual está asociado en activar genes para la secreción de citocinas proinflamatorias (192). Otra vía de gran importancia en macrófagos M1 es la vía de las pentosas fosfatos (PPP). En cáncer, la PPP es una vía metabólica requerida para la formación de ribonucleótidos y de NADPH, la cual esta última conforma un elemento central para constituir el sistema de defensa antioxidante. Por esta razón, un tratamiento dirigido a bloquear esta vía propicia un desbalance en el estrés oxidativo (ROS) y consecuentemente la inducción de la apoptosis (193–195). Sin embargo, en trabajos recientes en macrófagos y neutrófilos, la PPP tiene un fenotipo metabólico diferente para que estas células puedan llevar a cabo sus funciones pro-inflamatorias y defensoras del sistema innato (196–198). Así, en el caso particular de los neutrófilos, la producción de fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADPH) es metabólicamente dirigido hacia la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Debido a que la PPP es inhibida por la expresión de Carbohydrate kinase-like protein (CARKL), el cual a su vez es inhibido por la expresión de LPS (199), se ha reportado que la PPP se expresa exclusivamente en macrófago de tipo M1 (Figura 28). La sobreexpresión de CARKL se asocia con una reducción de genes pro-inflamatorios (173). Concomitantemente, la expresión de ROS en macrófagos y neutrófilos no es solo para eliminar al insulto (patógeno externo), sino que también tiene la capacidad de inhibir la fosforilación oxidativa (200) y favorecer la glucólisis al estabilizar la expresión de HIF1- $\alpha$  (201).

Otra vía importante para señalar es el ciclo de Krebs, el cual tiene comportamientos distintos si eres un macrófago activado por LPS + IFN- $\gamma$  o

IL-4. Empecemos con los macrófagos activados por LPS + IFN- $\gamma$ , como mencionamos anteriormente, el ciclo de Krebs no está completamente activo en este macrófago, en cambio se acumulan citrato y succinato, ambos con funciones inmunológicas distintas. El citrato puede tener dos tipos de comportamientos, en el citosol aumenta la transformación de la arginina hacia la producción de especies reactivas de nitrógeno (202) (NO) y ROS, además favorece la síntesis de ácidos grasos un componente importante para la generación de citocinas pro-inflamatorias (Figura 28). La otra vía del citrato es convertirse a itaconato, el cual tiene un rol dual, a niveles bajos favorece la acumulación de succinato al inhibir a la enzima que lo transforma a fumarato (203), pero en niveles altos tiene la capacidad inhibir la generación de ROS y la secreción de genes pro-inflamatorios (124) (Figura 28). Este metabolito podría actuar como un marcador para determinar el tipo de comportamiento posible de los macrófagos dentro de un microambiente inflamatorio. Succinato, el metabolito que se acumula en un macrófago M1, tiene un comportamiento totalmente pro-inflamatorio. La acumulación de este metabolito favorece la estabilización de HIF1- $\alpha$  y favorecer la glucólisis, al igual en la generación de ROS y NO y así evitar la fosforilación oxidativa (Figura 28). Sin embargo, este metabolito puede ser inhibido de manera indirecta si STAT6 (M2) se encuentra activado ya que permite que el ciclo de Krebs aumente su actividad metabólica evitando acumulación de metabolitos. Finalmente, el otro compuesto importante del ciclo de Krebs es el  $\alpha$ -cetoglutarato, el cual aumenta su expresión debido a la transformación de la glutamina mediante la glutaminólisis el cual se incrementa por la presencia de IL-10 (204) (Figura 28). Este metabolito interfiere en la acumulación de succinato y por lo tanto inhibe sus funciones pro-inflamatorias. Además favorece la polarización del macrófago hacia un comportamiento M2 por la activación de la vía JMJD3, el cual terminara activando a STAT6 y a PPAR $\gamma$  y así favoreciendo el FAO. Sin embargo, IFN- $\gamma$  o el IFN- $\beta$  tiene la capacidad de inhibir las funciones del metabolito, inhibiendo así la función de JMJD3 y así evitar su polarización hacia un comportamiento M2 (205). El  $\alpha$ -

cetoglutarato tiene la capacidad de inhibir a NFκB y por lo tanto inhibir la glucólisis y la secreción de citocinas proinflamatorias (206,207) (Figura 28).

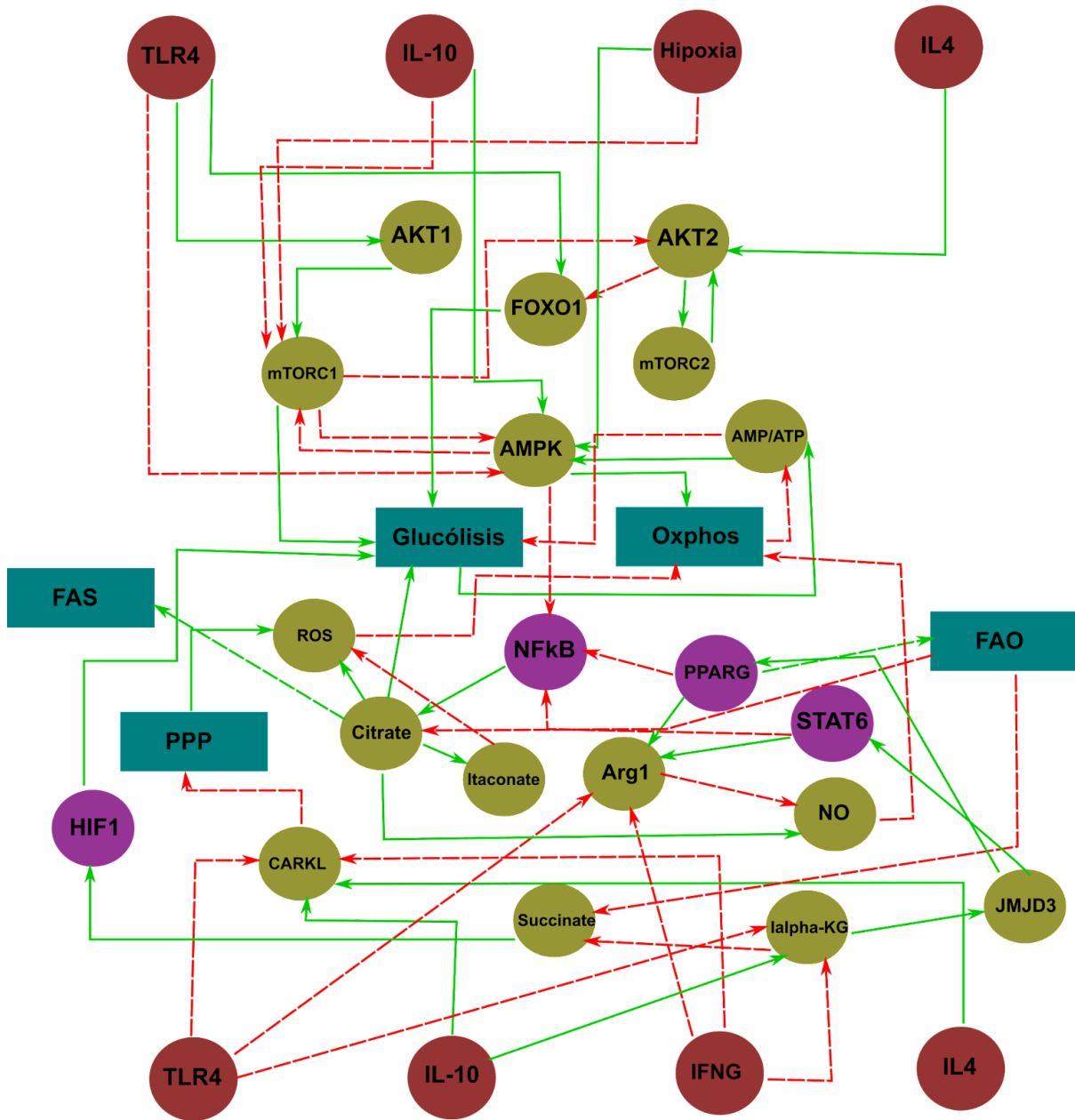


Figura 28. Integración metabólica de metabolitos y factores transcripcionales. Círculos en color marrón son factores extracelulares que activan a factores internos. En color verde son metabolitos dentro del macrófago. En cambio, en color morado son factores transcripcionales. Finalmente, en el recuadro azul vías metabólicas importantes en la polarización del macrófago. En color verde es activación, en cambio en color rojo es inactivación.

## 7 Discusión

La interacción entre el sistema inmunológico, el microambiente y el cáncer es una vía atractiva para diseñar tratamientos efectivos. El desarrollo de enfoques computacionales que contribuyan a esclarecer sus mecanismos es una tarea necesaria. Este trabajo presentó una red reguladora de señalización curada de alta calidad entre factores derivados del cáncer, macrófagos y un análisis booleano extenso. A diferencia de informes anteriores, presentamos un modelo con interacciones adicionales validadas experimentalmente y un análisis en profundidad del fenotipo híbrido de los macrófagos. Como Palma et al. concluyó anteriormente, estos estados estacionarios intermedios apoyan la hipótesis de que la polarización de los macrófagos es un proceso continuo y no binario, como se suele sugerir. Además, nuestro amplio análisis nos permitió identificar fenotipos que sugirieron nuevas interpretaciones fisiológicas asociadas con fenotipos de macrófagos híbridos. Concluimos que los fenotipos híbridos evolucionan limitados por una interacción permanente con el medio ambiente con base en nuestros resultados. Postulamos que algunos de ellos tienen implicaciones terapéuticas al potenciar la capacidad tumoricida (M1M2d y M1M2b) o promover mecanismos reguladores (M2bM2d, M2aM2d y M2cM2d) frente al cáncer.

En particular, nuestro análisis nos permite construir hipótesis sobre los estados híbridos que favorecen o contrastan el fenotipo del cáncer. Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que M1M2d, un macrófago regulador tumoricida, podría eliminar potencialmente las células tumorales debido a la secreción de citocinas citotóxicas e IL-12 que ayuda a diferenciar las células T CD4 +. Como sabemos, M1 es un jugador esencial en la defensa del huésped, pero si no está regulado, podría causar daño tisular. Por otro lado,

la parte M2d del fenotipo híbrido secretaría IL-10 y TGF- $\beta$ , citocinas reguladoras que eventualmente mantendrían a raya la acción provocada por las citocinas citotóxicas. Este fenotipo inducirá una proporción de citocinas citotóxicas / reguladoras que podría erradicar las células tumorales y evitar el daño tisular. Además, M1M2b tiene una función similar a la M1M2d. Regularía con IL-10 el daño causado por las acciones citotóxicas. Sin embargo, eventualmente eliminaría las células tumorales a través de la acción de M1 y curaría el daño causado por la eliminación de las células tumorales por la acción de M2b.

Por otro lado, M2bM2d, M2aM2d y M2cM2d son estados híbridos con un fenotipo maligno que expresan HIF1 $\alpha$ . Cuando un tumor crece y aumenta su diámetro, el oxígeno suministrado se vuelve insuficiente en las regiones internas, creando áreas hipóxicas o necróticas (93). La respuesta de hipoxia a través de HIF1 $\alpha$  no solo afecta la polarización de macrófagos (120) sino que también recluta macrófagos y células estromales mesenquimales en estas regiones (121,122). Los tres fenotipos de macrófagos tienen diferentes acciones sobre la progresión tumoral. Por ejemplo, M2bM2d favorecerá el proceso angiogénico con el aporte del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A).

Mientras tanto, el híbrido M2aM2d sería el fenotipo más peligroso porque podría curar la "herida" causada por el crecimiento del tumor. Además, M2aM2d favorece la angiogénesis tumoral al secretar PDGF, TGF- $\beta$ , IL-8, CXCL12 y VEGF-A, contribuyendo así a la metástasis de la angiogénesis tumoral. Una pizca de evidencia experimental adicional que describe esta adaptación a la hipoxia la proporciona M2a, que inhibe la expansión de las células T, lo que reduce la eliminación del tumor (100). Finalmente, M2cM2d y otros híbridos malignos estarían restringidos espacialmente en un área hipóxica, comportándose como reguladores que secretan IL-10 y TGF- $\beta$ , creando un escenario de progresión de proliferación tumoral. Hipotéticamente, la inhibición de IL-10 o la coactivación de CD40, IL-12, IL-8 y TNF- $\alpha$ , podrían repolarizar estos macrófagos al fenotipo M1, donde se ha

demostrado el desarrollo tumoral inverso (123). En general, postulamos que estos híbridos de comportamiento de los macrófagos son malignos porque podrían promover la carcinogénesis y regular el sistema inmunológico a favor del fenotipo tumoral (124,125).

Los avances recientes han arrojado nueva luz sobre las diferentes células que constituyen nichos especializados y los mecanismos que promueven la interacción célula a célula. Es relevante el conocimiento del contenido celular y la diversidad del microambiente tumoral en la transformación maligna y otras enfermedades metastásicas. La mayoría de los tejidos humanos, incluida la mama, mantienen su reposición continua a partir de células madre primarias. El microambiente que mantiene la homeostasis promueve la diferenciación celular de acuerdo con las demandas funcionales y suprime la emergencia potencial de células aberrantes. La interacción puede ser directa o indirecta entre macrófagos malignos y no malignos que presumiblemente influyen poderosamente en el resultado de la enfermedad, y la secreción de citocinas por los macrófagos es un factor fundamental para la transición epitelial a mesenquimal (EMT) en el cáncer de mama. Si promueven la retención de células primitivas dentro de sus nichos para evitar la movilización hacia el torrente sanguíneo o hacia los tejidos externos, como ocurre en la médula ósea, sigue siendo un asunto en cuestión (123,126). A pesar de que estaba más allá del alcance de este artículo, está quedando claro el papel crítico de la polarización de macrófagos M1 / M2 en la progresión maligna de TNBC. Estos híbridos de macrófagos malignos expresan principalmente citocinas de tipo II, lo que promueve el crecimiento de CSC (células madre cancerosas). Los macrófagos M2 protegen a las CSC de los mecanismos de vigilancia inmunitaria, inducen microambientes antiinflamatorios que funcionan como onco-promotores y contribuyen a la resistencia a los fármacos, particularmente en las últimas etapas de la tumorigénesis (123).

En nuestro enfoque TGEM, mutamos NFκB y HIF1α. NFκB es un regulador maestro con más avances en su activación y translocación, y en base a nuestros resultados, es un enfoque fundamental para eliminar las células



tumorales. Tiene papeles vitales en la función de los macrófagos. El enfoque de nanopartículas desarrolla un cambio de un tipo de macrófago M2 a M1, muy similar a nuestro enfoque TGEM (127) . Sin embargo, no basta con apuntar a NFκB. Es por eso por lo que eliminamos HIF1α, porque este factor se ve afectado por la hipoxia, una condición constitutiva en un microambiente tumoral, y desencadena un efecto de polarización M2 (128). En nuestro TGEM, obtenemos tres fenotipos híbridos que todos tenían M1 combinado con un macrófago de comportamiento regulador. Cuando eliminamos HIF1α, los macrófagos todavía van a migrar a regiones hipóxicas, pero no por la misma razón descrita anteriormente. Esta vez, la acumulación espacial de macrófagos en las áreas hipóxicas se debe a su capacidad para eliminar las células apoptóticas, activando la secreción de IL-12 e IFN-γ generando una retroalimentación positiva con las células T CD4 + que terminarán teóricamente en la eliminación del tumor. Por este motivo, la hipoxia ya no puede influir en nuestro TGEM. No se inmovilizará en regiones de hipoxia, lo que contribuirá a un pronóstico adverso en el cáncer de mama. Aunque este enfoque muestra un buen comportamiento de los macrófagos en un microambiente tumoral, debemos ocuparnos de las limitaciones del modelo booleano. No existe una escala de calificación en los factores asociados debido al hecho de que los modelos booleanos sólo modelan niveles 0 o 1, por lo que no podemos evaluar cuánto es suficiente un factor de transcripción para obtener un subtipo de macrófago específico. Como hemos demostrado, esta reconstrucción incluye la información necesaria para explorar y proporcionar evidencia de la transformación de polarización de los macrófagos. Sin embargo, deberíamos actualizar los componentes y sus reglas booleanas (Figura 1), ya que aparecerán más evidencias experimentales en el futuro próximo, y además dibujar una descripción más precisa de este fenómeno. Finalmente, consideramos el fenotipo M0 como un monocito, que es un precursor de la activación de los macrófagos. Sin embargo, este tipo de célula tiene una heterogeneidad que podría manipularse de manera diferente en las células cancerosas (129). Creemos

que el continuo de monocitos o la reprogramación por parte de las células cancerosas puede ser una variable esencial para determinar el comportamiento del continuo de macrófagos. Este comportamiento debe ser estudiado para comprender completamente la polarización de los macrófagos y la complejidad entre ellos. Alternativamente, considerar la heterogeneidad de la población mieloide (monocitos y neutrófilos) establece una perspectiva de futuro que es muy atractiva. Aquí, nuestro objetivo es comprender los mecanismos moleculares y externos que orquestan la polarización de los macrófagos y desarrollar estrategias terapéuticas potenciales. Varias estrategias se centran en disminuir el reclutamiento de macrófagos en el sitio del tumor, lo que muestra la limitación de la vascularización del tumor y la metástasis en modelos de ratón (130). Sin embargo, estos tratamientos solo reducen el crecimiento tumoral al reducir las células M2 (131), perdiendo las propiedades beneficiosas de los macrófagos de tipo M1. Demostramos que nuestro macrófago diseñado disminuyó los fenotipos híbridos malignos y se adaptó a las perturbaciones causadas por el microambiente tumoral. Nuestro enfoque teórico sigue una estrategia combinada, que creemos será la clave para diseñar posibles terapias con macrófagos. Nuestro modelo teórico también sugirió que el mejor enfoque para vencer el cáncer no es cambiar M2 a M1, como hacen la mayoría de los métodos farmacéuticos. Este cambio se pierde fácilmente porque se ve afectado por el microambiente del tumor (132). En cambio, una estrategia terapéutica óptima podría ser resaltar las mejores características en los escenarios pro y antiinflamatorio. Por ejemplo, en nuestro enfoque, llegamos a la conclusión de que la acción simultánea de HIF1 $\alpha$  y NF $\kappa$ B nos permite lograr un "control" sobre la influencia de la hipoxia y el comportamiento citotóxico de los macrófagos. Finalmente, nuestros enfoques computacionales pueden contribuir a sentar las bases de la dinámica de la población de macrófagos a través de la eliminación hasta el equilibrio y el escape, las tres fases de la inmunoedición del cáncer, como sellos distintivos de la progresión del cáncer de mama. Las direcciones futuras y los desafíos pendientes en la investigación de la biología de

transición de la inmunovigilancia a los macrófagos supresores incluirán análisis genómicos o citométricos de alto rendimiento de las poblaciones M1 y M2 en el microambiente tumoral asociado al cáncer de mama. La comprensión del proceso dinámico desde la inmunovigilancia hasta la progresión maligna puede desentrañar los principios de las funciones duales de protección o daños al huésped de los macrófagos M1 y M2 en la inmunomodulación de tumores. Finalmente, luchar contra el cáncer de mama altamente invasivo al allanar nuevas vías en inmunoterapias.

## 8 Conclusiones

Comprender la respuesta fisiológica que surgió de la compleja interacción entre macrófagos y Cáncer, es un objetivo valioso para diseñar potencialmente tratamientos contra dicha enfermedad. Dada la complejidad de esta enfermedad pandémica, el modelado de redes booleanas es una de las estrategias viables para una mejor comprensión de cómo la enfermedad comienza y progresa. En este trabajo, nos hemos centrado sobre el papel que juegan los macrófagos dentro de un microambiente tumoral dado su abundancia relativa predominante en otras células del sistema inmunitario. Para ello, necesitamos construir un sistema altamente red de señalización curada de las células cancerígenas y factores derivados a estas células y macrófagos. Estos mecanismos de señalización se podrían construir para otras enfermedades, por ejemplo el COVID-19.

## 9 Referencias Bibliográficas

1. Locati M, Mantovani A, Sica A. Macrophage activation and polarization as an adaptive component of innate immunity. *Adv Immunol* (2013) 120:163–184. doi: 10.1016/B978-0-12417028-5.00006-5
2. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* (2012) 122:787–795. doi: 10.1172/JCI59643
3. Harris RA. Spatial, Temporal, and Functional Aspects of Macrophages during “The Good, the Bad, and the Ugly” Phases of Inflammation. *Front Immunol* (2014) 5:612. doi: 10.3389/fimmu.2014.00612
4. Rivera LB, Bergers G. Location, Location, Location: Macrophage Positioning within Tumors Determines Pro- or Antitumor Activity. *Cancer Cell* (2013) 24:687–689. doi: 10.1016/j.ccr.2013.11.014
5. McGettrick AF, O’Neill LAJ. How metabolism generates signals during innate immunity and inflammation. *J Biol Chem* (2013) 288:22893–22898. doi: 10.1074/jbc.R113.486464
6. O’Neill LAJ, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* (2013) 493:346–355. doi: 10.1038/nature11862
7. Biswas SK, Mantovani A. Orchestration of Metabolism by Macrophages. *Cell Metabolism* (2012) 15:432–437. doi: 10.1016/j.cmet.2011.11.013
8. O’Neill LAJ, Kishton RJ, Rathmell J. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:553–565. doi: 10.1038/nri.2016.70
9. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* (2011) 144:646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
10. Weinberg, A. R. *The Biology of Cancer: Second International Student Edition*. W.W. Norton & Company (2013). 28 p. [https://books.google.com/books/about/The\\_Biology\\_of\\_Cancer.html?hl=&id=3WebDwAAQB\\_AJ](https://books.google.com/books/about/The_Biology_of_Cancer.html?hl=&id=3WebDwAAQB_AJ)
11. Pecorino L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*. Oxford University Press (2012). 342 p. [https://books.google.com/books/about/Molecular\\_Biology\\_of\\_Cancer.html?hl=&id=tl\\_vcU85\\_QU4C](https://books.google.com/books/about/Molecular_Biology_of_Cancer.html?hl=&id=tl_vcU85_QU4C)
12. DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res* (2007) 9:212. doi: 10.1186/bcr1746

13. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* (2008) 454:436–444. doi: 10.1038/nature07205
14. Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* (2003) 3:89–101. doi: 10.1038/nrc989
15. DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer and Metastasis Reviews* (2010) 29:309–316. doi: 10.1007/s10555-010-9223-6
16. Qian B-Z, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* (2010) 141:39–51. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014
17. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* (2010) 140:883–899. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.025
18. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF- $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends in Immunology* (2010) 31:220–227. doi: 10.1016/j.it.2010.04.002
19. Shields JD, Kourtis IC, Tomei AA, Roberts JM, Swartz MA. Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* (2010) 328:749–752. doi: 10.1126/science.1185837
20. Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Current Opinion in Genetics & Development* (2008) 18:11–18. doi: 10.1016/j.gde.2007.12.007
21. Biswas SK, Allavena P, Mantovani A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol* (2013) 35:585–600. doi: 10.1007/s00281-013-0367-7
22. Schultze JL, Schmidt SV. Molecular features of macrophage activation. *Seminars in Immunology* (2015) 27:416–423. doi: 10.1016/j.smim.2016.03.009
23. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* (2000) 164:6166–6173. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166
24. Mills CD. Anatomy of a Discovery: M1 and M2 Macrophages. *Frontiers in Immunology* (2015) 6: doi: 10.3389/fimmu.2015.00212
25. Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol* (2008) 180:2011–2017. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2011
26. Rhee I. Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment. *Arch Pharm Res* (2016) 39:1588–1596. doi: 10.1007/s12272-016-0820-y

27. Van Dyken SJ, Locksley RM. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol* (2013) 31:317–343. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095906
28. Wang L-X, Zhang S-X, Wu H-J, Rong X-L, Guo J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol* (2019) 106:345–358. doi: 10.1002/JLB.3RU1018-378RR
29. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports* (2014) 6: doi: 10.12703/p6-13
30. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Sacconi A, Sironi M, Bottazzi B, Doni A, Vincenzo B, Pasqualini F, et al. A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood* (2006) 107:2112–2122. doi: 10.1182/blood-2005-01-0428
31. Wang Q, Ni H, Lan L, Wei X, Xiang R, Wang Y. Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. *Cell Res* (2010) 20:701–712. doi: 10.1038/cr.2010.52
32. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles M-P, Grimaud L, Lenoir J, Preisser L, Anegon I, Catala L, Ifrah N, et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* (2007) 110:4319–4330. doi: 10.1182/blood-2007-02-072587
33. Hagemann T, Wilson J, Burke F, Kulbe H, Li NF, Plüddemann A, Charles K, Gordon S, Balkwill FR. Ovarian Cancer Cells Polarize Macrophages Toward A Tumor-Associated Phenotype. *The Journal of Immunology* (2006) 176:5023–5032. doi: 10.4049/jimmunol.176.8.5023
34. Seager RJ, Hajal C, Spill F, Kamm RD, Zaman MH. Dynamic interplay between tumour, stroma and immune system can drive or prevent tumour progression. *Convergent Science Physical Oncology* (2017) 3:034002. doi: 10.1088/2057-1739/aa7e86
35. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol* (2005) 175:342–349. doi: 10.4049/jimmunol.175.1.342
36. Foey AD. Macrophage Polarisation: A collaboration of Differentiation, Activation and PreProgramming? *Journal of Clinical & Cellular Immunology* (2015) 06: doi: 10.4172/21559899.1000293
37. Ivashkiv LB. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends in Immunology* (2013) 34:216–223. doi: 10.1016/j.it.2012.11.001

38. Essandoh K, Li Y, Huo J, Fan G-C. MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock* (2016) 46:122–131. doi: 10.1097/SHK.0000000000000604
39. Wang R-S, Saadatpour A, Albert R. Boolean modeling in systems biology: an overview of methodology and applications. *Phys Biol* (2012) 9:055001. doi: 10.1088/14783975/9/5/055001
40. Xiao Y. A tutorial on analysis and simulation of boolean gene regulatory network models. *Curr Genomics* (2009) 10:511–525. doi: 10.2174/138920209789208237
41. Rex J, Albrecht U, Ehling C, Thomas M, Zanger UM, Sawodny O, Häussinger D, Ederer M, Feuer R, Bode JG. Model-Based Characterization of Inflammatory Gene Expression Patterns of Activated Macrophages. *PLoS Comput Biol* (2016) 12:e1005018. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005018
42. Palma A, Jarrah AS, Tieri P, Cesareni G, Castiglione F. Gene Regulatory Network Modeling of Macrophage Differentiation Corroborates the Continuum Hypothesis of Polarization States. *Front Physiol* (2018) 9:1659. doi: 10.3389/fphys.2018.01659
43. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* (2005) 5:953–964. doi: 10.1038/nri1733
44. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol* (2016) 17:34–40. doi: 10.1038/ni.3324
45. De Palma M, Lewis CE. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer Cell* (2013) 23:277–286. doi: 10.1016/j.ccr.2013.02.013
46. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, Kim MV, Bivona MR, Liu K, Pamer EG, Li MO. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* (2014) 344:921–925. doi: 10.1126/science.1252510
47. Franklin RA, Li MO. The ontogeny of tumor-associated macrophages: a new understanding of cancer-elicited inflammation. *Oncol Immunology* (2014) 3:e955346. doi: 10.4161/21624011.2014.955346
48. Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ, Natoli G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends in Immunology* (2015) 36:229–239. doi: 10.1016/j.it.2015.02.004
49. Lahmar Q, Keirsse J, Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, Van Ginderachter JA. Tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in the tumor microenvironment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* (2016) 1865:23–34. doi: 10.1016/j.bbcan.2015.06.009

50. Wang J, Li D, Cang H, Guo B. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Medicine* (2019) 8:4709–4721. doi: 10.1002/cam4.2327
51. Herbert SP, Stainier DYR. Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2011) 12:551–564. doi: 10.1038/nrm3176
52. Gonda TA, Tu S, Wang TC. Chronic inflammation, the tumor microenvironment and carcinogenesis. *Cell Cycle* (2009) 8:2005–2013. doi: 10.4161/cc.8.13.8985
53. Rodier F, Coppé J-P, Patil CK, Hoeijmakers WAM, Muñoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* (2009) 11:973–979. doi: 10.1038/ncb1909
54. Adeegbe DO, Nishikawa H. Natural and Induced T Regulatory Cells in Cancer. *Frontiers in Immunology* (2013) 4: doi: 10.3389/fimmu.2013.00190
55. Mbongue J, Nicholas D, Firek A, Langridge W. The role of dendritic cells in tissue-specific autoimmunity. *J Immunol Res* (2014) 2014:857143. doi: 10.1155/2014/857143
56. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* (2002) 23:549–555. doi: 10.1016/s1471-4906(02)02302-5
57. Zhu L, Zhao Q, Yang T, Ding W, Zhao Y. Cellular Metabolism and Macrophage Functional Polarization. *International Reviews of Immunology* (2015) 34:82–100. doi: 10.3109/08830185.2014.969421
58. Goede KE de, de Goede KE, Harber KJ, Van den Bossche J. Let's Enter the Wonderful World of Immunometabolites. *Trends in Endocrinology & Metabolism* (2019) 30:329–331. doi: 10.1016/j.tem.2019.03.004
59. Loftus RM, Finlay DK. Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator. *J Biol Chem* (2016) 291:1–10. doi: 10.1074/jbc.R115.693903
60. El Kasmi KC, Stenmark KR. Contribution of metabolic reprogramming to macrophage plasticity and function. *Semin Immunol* (2015) 27:267–275. doi: 10.1016/j.smim.2015.09.001
61. Andrejeva G, Rathmell JC. Similarities and Distinctions of Cancer and Immune Metabolism in Inflammation and Tumors. *Cell Metab* (2017) 26:49–70. doi: 10.1016/j.cmet.2017.06.004
62. Vats D, Mukundan L, Odegaard JI, Zhang L, Smith KL, Morel CR, Wagner RA, Greaves DR, Murray PJ, Chawla A. Oxidative metabolism and PGC-



- 1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab* (2006) 4:13–24. doi: 10.1016/j.cmet.2006.05.011
63. Müssel C, Hopfensitz M, Kestler HA. BoolNet—an R package for generation, reconstruction and analysis of Boolean networks. *Bioinformatics* (2010) 26:1378–1380. doi: 10.1093/bioinformatics/btq124
64. Novák V, Perfilieva I, Mockor J. *Mathematical Principles of Fuzzy Logic*. Springer Science & Business Media (2012). 320 p. <https://play.google.com/store/books/details?id=uzPjBwAAQBAJ>
65. Villarreal C, Padilla-Longoria P, Alvarez-Buylla ER. General theory of genotype to phenotype mapping: derivation of epigenetic landscapes from N-node complex gene regulatory networks. *Phys Rev Lett* (2012) 109:118102. doi: 10.1103/PhysRevLett.109.118102
66. Martinez-Sanchez ME, Huerta L, Alvarez-Buylla ER, Villarreal Luján C. Role of Cytokine Combinations on CD4+ T Cell Differentiation, Partial Polarization, and Plasticity: Continuous Network Modeling Approach. *Front Physiol* (2018) 9:877. doi: 10.3389/fphys.2018.00877
67. Enciso J, Mendoza L, Álvarez-Buylla ER, Pelayo R. Dynamical modeling predicts an inflammation-inducible CXCR7+ B cell precursor with potential implications in lymphoid blockage pathologies. *PeerJ* (2020) 8:e9902. doi: 10.7717/peerj.9902
68. Anders CB, Lawton TMW, Smith HL, Garret J, Doucette MM, Ammons MCB. Use of integrated metabolomics, transcriptomics, and signal protein profile to characterize the effector function and associated metabotype of polarized macrophage phenotypes. *J Leukoc Biol* (2022) 111:667–693. doi: 10.1002/JLB.6A1120-744R
69. Wishart DS, Guo A, Oler E, Wang F, Anjum A, Peters H, Dizon R, Sayeeda Z, Tian S, Lee BL, et al. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Res* (2022) 50:D622–D631. doi: 10.1093/nar/gkab1062
70. Pang Z, Zhou G, Ewald J, Chang L, Hacariz O, Basu N, Xia J. Using MetaboAnalyst 5.0 for LC-HRMS spectra processing, multi-omics integration and covariate adjustment of global metabolomics data. *Nat Protoc* (2022) 17:1735–1761. doi: 10.1038/s41596-022-00710-w
71. Chong J, Wishart DS, Xia J. Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis. *Curr Protoc Bioinformatics* (2019) 68:e86. doi: 10.1002/cpbi.86
72. Pang Z, Chong J, Li S, Xia J. MetaboAnalystR 3.0: Toward an Optimized Workflow for Global Metabolomics. *Metabolites* (2020) 10: doi: 10.3390/metabo10050186
73. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* (2014) 5:461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461

74. Malyshev I, Malyshev Y. Current Concept and Update of the Macrophage Plasticity Concept: Intracellular Mechanisms of Reprogramming and M3 Macrophage “Switch” Phenotype. *Biomed Res Int* (2015) 2015: doi: 10.1155/2015/341308
75. Kratochvill F, Neale G, Haverkamp JM, Van de Velde L-A, Smith AM, Kawauchi D, McEvoy J, Roussel MF, Dyer MA, Qualls JE, et al. TNF Counterbalances the Emergence of M2 Tumor Macrophages. *Cell Rep* (2015) 12:1902–1914. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.033
76. Hutchins AP, Diez D, Miranda-Saavedra D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Brief Funct Genomics* (2013) 12:489–498. doi: 10.1093/bfpg/elt028
77. Duluc D, Corvaisier M, Blanchard S, Catala L, Descamps P, Gamelin E, Ponsoda S, Delneste Y, Hebbbar M, Jeannin P. Interferon- $\gamma$  reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *International Journal of Cancer* (2009) 125:367–373. doi: 10.1002/ijc.24401
78. Binnemars-Postma K, Bansal R, Storm G, Prakash J. Targeting the Stat6 pathway in tumor-associated macrophages reduces tumor growth and metastatic niche formation in breast cancer. *FASEB J* (2018) 32:969–978. doi: 10.1096/fj.201700629R
79. O’Carroll C, Fagan A, Shanahan F, Carmody RJ. Identification of a unique hybrid macrophage-polarization state following recovery from lipopolysaccharide tolerance. *J Immunol* (2014) 192:427–436. doi: 10.4049/jimmunol.1301722
80. Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* (2009) 86:1065–1073. doi: 10.1189/jlb.0609385
81. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* (2008) 8:958–969. doi: 10.1038/nri2448
82. Iriki T, Ohnishi K, Fujiwara Y, Horlad H, Saito Y, Pan C, Ikeda K, Mori T, Suzuki M, Ichiyasu H, et al. The cell-cell interaction between tumor-associated macrophages and small cell lung cancer cells is involved in tumor progression via STAT3 activation. *Lung Cancer* (2017) 106:22–32. doi: 10.1016/j.lungcan.2017.01.003
83. Belli C, Trapani D, Viale G, D’Amico P, Duso BA, Della Vigna P, Orsi F, Curigliano G. Targeting the microenvironment in solid tumors. *Cancer Treatment Reviews* (2018) 65:22–32. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.02.004

84. Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskiene B, Miliauskas S, Vaitkiene S, Sakalauskas R. Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer. *BMC Immunol* (2018) 19:3. doi: 10.1186/s12865-018-0241-4
85. Jin M-Z, Jin W-L. The updated landscape of tumor microenvironment and drug repurposing. *Signal Transduct Target Ther* (2020) 5:166. doi: 10.1038/s41392-020-00280-x
86. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, Kolahian S, Javaheri T, Zare P. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal* (2020) 18:59. doi: 10.1186/s12964-020-05304
87. Wang J, Lin D, Peng H, Huang Y, Huang J, Gu J. Cancer-derived immunoglobulin G promotes tumor cell growth and proliferation through inducing production of reactive oxygen species. *Cell Death Dis* (2013) 4:e945. doi: 10.1038/cddis.2013.474
88. Hu D, Zheng H, Liu H, Li M, Ren W, Liao W, Duan Z, Li L, Cao Y. Immunoglobulin Expression and Its Biological Significance in Cancer Cells. *Cellular & Molecular Immunology* (2008) 5:319–324. doi: 10.1038/cmi.2008.39
89. Singh SR, Rameshwar P, Siegel P. Targeting tumor microenvironment in cancer therapy. *Cancer Letters* (2016) 380:203–204. doi: 10.1016/j.canlet.2016.04.009
90. Liu H, Shi B, Huang C-C, Eksarko P, Pope RM. Transcriptional diversity during monocyte to macrophage differentiation. *Immunol Lett* (2008) 117:70–80. doi: 10.1016/j.imlet.2007.12.012
91. Choi J, Gyamfi J, Jang H, Koo JS. The role of tumor-associated macrophage in breast cancer biology. *Histol Histopathol* (2018) 33:133–145. doi: 10.14670/HH-11-916
92. Fernandez-Banet J, Esposito A, Coffin S, Horvath IB, Estrella H, Schefzick S, Deng S, Wang K, AChing K, Ding Y, et al. OASIS: web-based platform for exploring cancer multi-omics data. *Nat Methods* (2016) 13:9–10. doi: 10.1038/nmeth.3692
93. Kumar V. Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic Signal* (2013) 9:145–165. doi: 10.1007/s11302-012-9349-9
94. Obradović MMS, Hamelin B, Manevski N, Couto JP, Sethi A, Coissieux M-M, Müntz S, Okamoto R, Kohler H, Schmidt A, et al. Glucocorticoids promote breast cancer metastasis. *Nature* (2019) 567:540–544. doi: 10.1038/s41586-019-1019-4

95. Michiels C, Tellier C, Feron O. Cycling hypoxia: A key feature of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta* (2016) 1866:76–86. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.06.004
96. Szanto A, Balint BL, Nagy ZS, Barta E, Dezso B, Pap A, Szeles L, Poliska S, Oros M, Evans RM, et al. STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR $\gamma$ -regulated gene expression in macrophages and dendritic cells. *Immunity* (2010) 33:699–712. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.009
97. Lloyd-Price J, Gupta A, Ribeiro AS. Robustness and information propagation in attractors of Random Boolean Networks. *PLoS One* (2012) 7:e42018. doi: 10.1371/journal.pone.0042018
98. Balleza E, Alvarez-Buylla ER, Chaos A, Kauffman S, Shmulevich I, Aldana M. Critical dynamics in genetic regulatory networks: examples from four kingdoms. *PLoS One* (2008) 3:e2456. doi: 10.1371/journal.pone.0002456
99. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* (2011) 11:750–761. doi: 10.1038/nri3088
100. Turnquist C, Ryan BM, Horikawa I, Harris BT, Harris CC. Cytokine Storms in Cancer and COVID-19. *Cancer Cell* (2020) 38:598–601. doi: 10.1016/j.ccell.2020.09.019
101. Dorrington MG, Fraser IDC. NF- $\kappa$ B Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Front Immunol* (2019) 10:705. doi: 10.3389/fimmu.2019.00705
102. Cordeiro-da-Silva A, Tavares J, Araújo N, Cerqueira F, Tomás A, Kong Thoo Lin P, Ouaisi A. Immunological alterations induced by polyamine derivatives on murine splenocytes and human mononuclear cells. *Int Immunopharmacol* (2004) 4:547–556. doi: 10.1016/j.intimp.2004.02.009
103. Bhattacharjee HK, Bansal VK, Nepal B, Srivastava S, Dinda AK, Misra MC. Is Interleukin 10 (IL10) Expression in Breast Cancer a Marker of Poor Prognosis? *Indian J Surg Oncol* (2016) 7:320–325. doi: 10.1007/s13193-016-0512-6
104. Avila-Ponce de León U, Vázquez-Jiménez A, Matadamas-Guzman M, Pelayo R, Resendis-Antonio O. Transcriptional and Microenvironmental Landscape of Macrophage Transition in Cancer: A Boolean Analysis. *Front Immunol* (2021) 12:642842. doi: 10.3389/fimmu.2021.642842
105. Long KB, Collier AI, Beatty GL. Macrophages: Key orchestrators of a tumor microenvironment defined by therapeutic resistance. *Mol Immunol* (2019) 110:3–12. doi: 10.1016/j.molimm.2017.12.003

106. Van Maaten, Hinton. Visualizing data using t-SNE. *J Mach Learn Res* <https://www.jmlr.org/papers/volume9/vandermaaten08a/vandermaaten08a.pdf?fbclid>
107. Wang H, Yung MMH, Ngan HYS, Chan KKL, Chan DW. The Impact of the Tumor Microenvironment on Macrophage Polarization in Cancer Metastatic Progression. *Int J Mol Sci* (2021) 22: doi: 10.3390/ijms22126560
108. Cheng H, Wang Z, Fu L, Xu T. Macrophage Polarization in the Development and Progression of Ovarian Cancers: An Overview. *Front Oncol* (2019) 9:421. doi: 10.3389/fonc.2019.00421
109. Wang, Boxel-Dezaire. STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. *Proc Estonian Acad Sci Biol Ecol* <https://www.pnas.org/content/110/42/16975.short>
110. Manore SG, Doheny DL, Wong GL, Lo H-W. IL-6/JAK/STAT3 Signaling in Breast Cancer Metastasis: Biology and Treatment. *Front Oncol* (2022) 12:866014. doi: 10.3389/fonc.2022.866014
111. Radharani NNV, Yadav AS, Nimma R, Kumar TVS, Bulbule A, Chanukuppa V, Kumar D, Patnaik S, Rapole S, Kundu GC. Tumor-associated macrophage derived IL-6 enriches cancer stem cell population and promotes breast tumor progression via Stat-3 pathway. *Cancer Cell Int* (2022) 22:122. doi: 10.1186/s12935-022-02527-9
112. Oh K, Lee O-Y, Park Y, Seo MW, Lee D-S. IL-1 $\beta$  induces IL-6 production and increases invasiveness and estrogen-independent growth in a TG2-dependent manner in human breast cancer cells. *BMC Cancer* (2016) 16:724. doi: 10.1186/s12885-016-2746-7
113. North RJ, Neubauer RH, Huang JJ, Newton RC, Loveless SE. Interleukin 1-induced, T cell-mediated regression of immunogenic murine tumors. Requirement for an adequate level of already acquired host concomitant immunity. *J Exp Med* (1988) 168:2031–2043. doi: 10.1084/jem.168.6.2031
114. Prasse A, Germann M, Pechkovsky DV, Markert A, Verres T, Stahl M, Melchers I, Luttmann W, Müller-Quernheim J, Zissel G. IL-10-producing monocytes differentiate to alternatively activated macrophages and are increased in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol* (2007) 119:464–471. doi: 10.1016/j.jaci.2006.09.030
115. Nguyen H-H, Tran B-T, Muller W, Jack RS. IL-10 acts as a developmental switch guiding monocyte differentiation to macrophages during a murine peritoneal infection. *J Immunol* (2012) 189:3112–3120. doi: 10.4049/jimmunol.1200360

116. Gonzalez-Junca A, Driscoll KE, Pellicciotta I, Du S, Lo CH, Roy R, Parry R, Tenvooren I, Marquez DM, Spitzer MH, et al. Autocrine TGF $\beta$  Is a Survival Factor for Monocytes and Drives Immunosuppressive Lineage Commitment. *Cancer Immunol Res* (2019) 7:306–320. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0310
117. Schonthaler HB, Guinea-Viniegra J, Wagner EF. Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway. *Ann Rheum Dis* (2011) 70 Suppl 1:i109–12. doi: 10.1136/ard.2010.140533
118. Liu Y-C, Zou X-B, Chai Y-F, Yao Y-M. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int J Biol Sci* (2014) 10:520–529. doi: 10.7150/ijbs.8879
119. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- $\gamma$  in tumor progression and regression: a review. *Biomarker Research* (2020) 8:1–16. doi: 10.1186/s40364-020-00228-x
120. Petrina M, Martin J, Basta S. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor has come of age: From a vaccine adjuvant to antiviral immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* (2021) 59:101–110. doi: 10.1016/j.cytogfr.2021.01.001
121. Kumar V. Macrophages: the potent immunoregulatory innate immune cells. *Macrophage Act -Biol Dis* (2019) <https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=XKf8DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Macrophages+The+Potent+Immunoregulatory+Innate+Immune+Cells&ots=ZizrIN7BhE&sig=GelOW47WUMHTQWsT466U-BBCT8Q>
122. Moffett JR, Arun P, Puthillathu N, Vengilote R, Ives JA, Badawy AA-B, Namboodiri AM. Quinolate as a Marker for Kynurenine Metabolite Formation and the Unresolved Question of NAD<sup>+</sup> Synthesis During Inflammation and Infection. *Front Immunol* (2020) 11:31. doi: 10.3389/fimmu.2020.00031
123. Pemberton LA, Kerr SJ, Smythe G, Brew BJ. Quinolinic acid production by macrophages stimulated with IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IFN- $\alpha$ . *J Interferon Cytokine Res* (1997) 17:589–595. doi: 10.1089/jir.1997.17.589
124. Zhu X, Guo Y, Liu Z, Yang J, Tang H, Wang Y. Itaconic acid exerts anti-inflammatory and antibacterial effects via promoting pentose phosphate pathway to produce ROS. *Sci Rep* (2021) 11:18173. doi: 10.1038/s41598-021-97352-x
125. Audrito V, Messina VG, Deaglio S. NAMPT and NAPRT: Two Metabolic Enzymes With Key Roles in Inflammation. *Front Oncol* (2020) 10:358. doi: 10.3389/fonc.2020.00358
126. Weiss R, Schilling E, Grahner A, Kölling V, Dorow J, Ceglarek U, Sack U, Hauschildt S. Nicotinamide: a vitamin able to shift macrophage

- differentiation toward macrophages with restricted inflammatory features. *Innate Immun* (2015) 21:813–826. doi: 10.1177/1753425915602545
127. Jobin PG, Solis N, Machado Y, Bell PA, Kwon NH, Kim S, Overall CM, Butler GS. Matrix metalloproteinases inactivate the proinflammatory functions of secreted moonlighting tryptophanyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* (2019) 294:12866–12879. doi: 10.1074/jbc.RA119.009584
128. Krause SW, Rehli M, Kreutz M, Schwarzfischer L, Paulauskis JD, Andreesen R. Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage maturation. *J Leukoc Biol* (1996) 60:540–545. doi: 10.1002/jlb.60.4.540
129. Jing C, Castro-Dopico T, Richoz N, Tuong ZK, Ferdinand JR, Lok LSC, Loudon KW, Banham GD, Mathews RJ, Cader Z, et al. Macrophage metabolic reprogramming presents a therapeutic target in lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2020) 117:15160–15171. doi: 10.1073/pnas.2000943117
130. Natoli G, Pileri F, Gualdrini F, Ghisletti S. Integration of transcriptional and metabolic control in macrophage activation. *EMBO Rep* (2021) 22:e53251. doi: 10.15252/embr.202153251
131. Geiß C, Salas E, Guevara-Coto J, Régnier-Vigouroux A, Mora-Rodríguez RA. Multistability in Macrophage Activation Pathways and Metabolic Implications. *Cells* (2022) 11: doi: 10.3390/cells11030404
132. Wang X-F, Wang H-S, Wang H, Zhang F, Wang K-F, Guo Q, Zhang G, Cai S-H, Du J. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in immune tolerance: focus on macrophage polarization of THP-1 cells. *Cell Immunol* (2014) 289:42–48. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.02.005
133. Sorgdrager FJH, Naudé PJW, Kema IP, Nollen EA, Deyn PPD. Tryptophan Metabolism in Inflammation: From Biomarker to Therapeutic Target. *Front Immunol* (2019) 10:2565. doi: 10.3389/fimmu.2019.02565
134. Climaco-Arvizu S, Domínguez-Acosta O, Cabañas-Cortés MA, Rodríguez-Sosa M, Gonzalez FJ, Vega L, Elizondo G. Aryl hydrocarbon receptor influences nitric oxide and arginine production and alters M1/M2 macrophage polarization. *Life Sci* (2016) 155:76–84. doi: 10.1016/j.lfs.2016.05.001
135. Campesato LF, Budhu S, Tchaicha J, Weng C-H, Gigoux M, Cohen IJ, Redmond D, Mangarin L, Pourpe S, Liu C, et al. Blockade of the AHR restricts a Treg-macrophage suppressive axis induced by L-Kynurenine. *Nat Commun* (2020) 11:4011. doi: 10.1038/s41467-020-17750-z
136. Goudot C, Coillard A, Villani A-C, Gueguen P, Cros A, Sarkizova S, Tang-Huau T-L, Bohec M, Baulande S, Hacohen N, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity* (2017) 47:582–596.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.08.016

137. Papathanassiou AE, Ko J-H, Imprialou M, Bagnati M, Srivastava PK, Vu HA, Cucchi D, McAdoo SP, Ananieva EA, Mauro C, et al. BCAT1 controls metabolic reprogramming in activated human macrophages and is associated with inflammatory diseases. *Nat Commun* (2017) 8:16040. doi: 10.1038/ncomms16040
138. Silva LS, Poschet G, Nonnenmacher Y, Becker HM, Sapcariu S, Gaupel A-C, Schlotter M, Wu Y, Kneisel N, Seiffert M, et al. Branched-chain ketoacids secreted by glioblastoma cells via MCT1 modulate macrophage phenotype. *EMBO Rep* (2017) 18:2172–2185. doi: 10.15252/embr.201744154
139. Rodriguez AE, Ducker GS, Billingham LK, Martinez CA, Mainolfi N, Suri V, Friedman A, Manfredi MG, Weinberg SE, Rabinowitz JD, et al. Serine Metabolism Supports Macrophage IL-1 $\beta$  Production. *Cell Metab* (2019) 29:1003–1011.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2019.01.014
140. Kelly B, Pearce EL. Amino Assets: How Amino Acids Support Immunity. *Cell Metab* (2020) 32:154–175. doi: 10.1016/j.cmet.2020.06.010
141. Managò A, Audrito V, Mazzola F, Sorci L, Gaudino F, Gizzi K, Vitale N, Incarnato D, Minazzato G, Ianniello A, et al. Extracellular nicotinate phosphoribosyltransferase binds Toll like receptor 4 and mediates inflammation. *Nature Communications* (2019) 10: doi: 10.1038/s41467-019-12055-2
142. Galván-Peña S, O'Neill LAJ. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol* (2014) 5:420. doi: 10.3389/fimmu.2014.00420
143. Schairer DO, Chouake JS, Nosanchuk JD, Friedman AJ. The potential of nitric oxide releasing therapies as antimicrobial agents. *Virulence* (2012) 3:271–279. doi: 10.4161/viru.20328
144. Sugiyama Y, Hiraiwa Y, Hagiya Y, Nakajima M, Tanaka T, Ogura S-I. 5Aminolevulinic acid regulates the immune response in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *BMC Immunol* (2018) 19:41. doi: 10.1186/s12865-018-0277-5
145. Prabha ANL, Leelamma S, Kurup PA. Similar effects of  $\beta$ -alanine and taurine in cholesterol metabolism. *J Biosci* (1988) 13:263–268. doi: 10.1007/BF02712150
146. Chen X-H, Zhang B-W, Li H, Peng X-X. Myo-inositol improves the host's ability to eliminate balofloxacin-resistant *Escherichia coli*. *Sci Rep* (2015) 5:10720. doi: 10.1038/srep10720
147. Rouzer CA, Scott WA, Griffith OW, Hamill AL, Cohn ZA. Glutathione metabolism in resting and phagocytizing peritoneal macrophages. *J Biol Chem* (1982) 257:2002–2008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6120172>



148. Ohradanova-Repic A, Machacek C, Charvet C, Lager F, Le Roux D, Platzer R, Leksa V, Mitulovic G, Burkard TR, Zlabinger GJ, et al. Extracellular Purine Metabolism Is the Switchboard of Immunosuppressive Macrophages and a Novel Target to Treat Diseases With Macrophage Imbalances. *Front Immunol* (2018) 9:852. doi: 10.3389/fimmu.2018.00852
149. Hardbower DM, Asim M, Luis PB, Singh K, Barry DP, Yang C, Steeves MA, Cleveland JL, Schneider C, Piazuolo MB, et al. Ornithine decarboxylase regulates M1 macrophage activation and mucosal inflammation via histone modifications. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2017) 114:E751–E760. doi: 10.1073/pnas.1614958114
150. Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravorty D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. *PLoS Pathog* (2010) 6:e1000899. doi: 10.1371/journal.ppat.1000899
151. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* (1999) 189:1363–1372. doi: 10.1084/jem.189.9.1363
152. Castoldi A, Monteiro LB, van Teijlingen Bakker N, Sanin DE, Rana N, Corrado M, Cameron AM, Hässler F, Matsushita M, Caputa G, et al. Triacylglycerol synthesis enhances macrophage inflammatory function. *Nat Commun* (2020) 11:4107. doi: 10.1038/s41467-02017881-3
153. Jha AK, Huang SC-C, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, Chmielewski K, Stewart KM, Ashall J, Everts B, et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* (2015) 42:419–430. doi: 10.1016/j.immuni.2015.02.005
154. Zhang C, Wang Y, Wang F, Wang Z, Lu Y, Xu Y, Wang K, Shen H, Yang P, Li S, et al. Quantitative profiling of glycerophospholipids during mouse and human macrophage differentiation using targeted mass spectrometry. *Sci Rep* (2017) 7:412. doi: 10.1038/s41598-017-00341-2
155. Chiba S, Hisamatsu T, Suzuki H, Mori K, Kitazume MT, Shimamura K, Mizuno S, Nakamoto N, Matsuoka K, Naganuma M, et al. Glycolysis regulates LPS-induced cytokine production in M2 polarized human macrophages. *Immunol Lett* (2017) 183:17–23. doi: 10.1016/j.imlet.2017.01.012
156. Suzuki H, Hisamatsu T, Chiba S, Mori K, Kitazume MT, Shimamura K, Nakamoto N, Matsuoka K, Ebinuma H, Naganuma M, et al. Glycolytic pathway affects differentiation of human monocytes to regulatory macrophages. *Immunol Lett* (2016) 176:18–27. doi: 10.1016/j.imlet.2016.05.009

157. Barry JC, Shakibakho S, Durrer C, Simtchouk S, Jawanda KK, Cheung ST, Mui AL, Little JP. Hyporesponsiveness to the anti-inflammatory action of interleukin-10 in type 2 diabetes. *Sci Rep* (2016) 6:21244. doi: 10.1038/srep21244
158. Hong E-G, Ko HJ, Cho Y-R, Kim H-J, Ma Z, Yu TY, Friedline RH, Kurt-Jones E, Finberg R, Fischer MA, et al. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes* (2009) 58:2525–2535. doi: 10.2337/db08-1261
159. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal* (2009) 2:re3. doi: 10.1126/scisignal.272re3
160. Koscsó B, Csóka B, Kókai E, Németh ZH, Pacher P, Virág L, Leibovich SJ, Haskó G. Adenosine augments IL-10-induced STAT3 signaling in M2c macrophages. *J Leukoc Biol* (2013) 94:1309–1315. doi: 10.1189/jlb.0113043
161. Dowling JK, Afzal R, Gearing LJ, Cervantes-Silva MP, Annett S, Davis GM, De Santi C, Assmann N, Dettmer K, Gough DJ, et al. Mitochondrial arginase-2 is essential for IL-10 metabolic reprogramming of inflammatory macrophages. *Nat Commun* (2021) 12:1460. doi: 10.1038/s41467-021-21617-2
162. Wang F, Zhang S, Vuckovic I, Jeon R, Lerman A, Folmes CD, Dzeja PP, Herrmann J. Glycolytic Stimulation Is Not a Requirement for M2 Macrophage Differentiation. *Cell Metab* (2018) 28:463–475.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2018.08.012
163. Morrison AC, Correll PH. Activation of the stem cell-derived tyrosine kinase/RON receptor tyrosine kinase by macrophage-stimulating protein results in the induction of arginase activity in murine peritoneal macrophages. *J Immunol* (2002) 168:853–860. doi: 10.4049/jimmunol.168.2.853
164. Chang CI, Zoghi B, Liao JC, Kuo L. The involvement of tyrosine kinases, cyclic AMP/protein kinase A, and p38 mitogen-activated protein kinase in IL-13-mediated arginase I induction in macrophages: its implications in IL-13-inhibited nitric oxide production. *J Immunol* (2000) 165:2134–2141. doi: 10.4049/jimmunol.165.4.2134
165. Lanis JM, Alexeev EE, Curtis VF, Kitzenberg DA, Kao DJ, Battista KD, Gerich ME, Glover LE, Kominsky DJ, Colgan SP. Tryptophan metabolite activation of the aryl hydrocarbon receptor regulates IL-10 receptor expression on intestinal epithelia. *Mucosal Immunol* (2017) 10:1133–1144. doi: 10.1038/mi.2016.133
166. Olivares O, Mayers JR, Gouirand V, Torrence ME, Gicquel T, Borge L, Lac S, Roques J, Lavaut M-N, Berthezène P, et al. Collagen-derived proline promotes pancreatic ductal adenocarcinoma cell survival under nutrient

- limited conditions. *Nat Commun* (2017) 8:16031. doi: 10.1038/ncomms16031
167. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol* (2019) 10:1462. doi: 10.3389/fimmu.2019.01462
168. Gan Z, Zhang M, Xie D, Wu X, Hong C, Fu J, Fan L, Wang S, Han S. Glycinergic Signaling in Macrophages and Its Application in Macrophage-Associated Diseases. *Front Immunol* (2021) 12:762564. doi: 10.3389/fimmu.2021.762564
169. Wu H, Han Y, Rodriguez Sillke Y, Deng H, Siddiqui S, Treese C, Schmidt F, Friedrich M, Keye J, Wan J, et al. Lipid droplet-dependent fatty acid metabolism controls the immune suppressive phenotype of tumor-associated macrophages. *EMBO Mol Med* (2019) 11:e10698. doi: 10.15252/emmm.201910698
170. Siddiqui S, Glauben R. Fatty Acid Metabolism in Myeloid-Derived Suppressor Cells and Tumor-Associated Macrophages: Key Factor in Cancer Immune Evasion. *Cancers* (2022) 14: doi: 10.3390/cancers14010250
171. Dichtl S, Lindenthal L, Zeitler L, Behnke K, Schlösser D, Strobl B, Scheller J, El Kasmi KC, Murray PJ. Lactate and IL6 define separable paths of inflammatory metabolic adaptation. *Sci Adv* (2021) 7: doi: 10.1126/sciadv.abg3505
172. Sergushichev AA, Loboda AA, Jha AK, Vincent EE, Driggers EM, Jones RG, Pearce EJ, Artyomov MN. GAM: a web-service for integrated transcriptional and metabolic network analysis. *Nucleic Acids Research* (2016) 44:W194–W200. doi: 10.1093/nar/gkw266
173. Baardman J, Verberk SGS, Prange KHM, van Weeghel M, van der Velden S, Ryan DG, Wüst RCI, Neele AE, Speijer D, Denis SW, et al. A Defective Pentose Phosphate Pathway Reduces Inflammatory Macrophage Responses during Hypercholesterolemia. *Cell Rep* (2018) 25:2044–2052.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2018.10.092
174. Erlich JR, To EE, Luong R, Liong F, Liong S, Oseghale O, Miles MA, Bozinovski S, Brooks RD, Vlahos R, et al. Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway Promote LPS-Induced NOX2 Oxidase- and IFN- $\beta$ -Dependent Inflammation in Macrophages. *Antioxidants (Basel)* (2022) 11: doi: 10.3390/antiox11081488
175. Freemerman AJ, Johnson AR, Sacks GN, Milner JJ, Kirk EL, Troester MA, Macintyre AN, Goraksha-Hicks P, Rathmell JC, Makowski L. Metabolic reprogramming of macrophages: glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype. *J Biol Chem* (2014) 289:7884–7896. doi: 10.1074/jbc.M113.522037

176. Meiser J, Krämer L, Sapcariu SC, Battello N, Ghelfi J, D'Herouel AF, Skupin A, Hiller K. Pro-inflammatory Macrophages Sustain Pyruvate Oxidation through Pyruvate Dehydrogenase for the Synthesis of Itaconate and to Enable Cytokine Expression. *J Biol Chem* (2016) 291:3932–3946. doi: 10.1074/jbc.M115.676817
177. Ryan DG, O'Neill LAJ. Krebs cycle rewired for macrophage and dendritic cell effector functions. *FEBS Lett* (2017) 591:2992–3006. doi: 10.1002/1873-3468.12744
178. Williams NC, O'Neill LAJ. A Role for the Krebs Cycle Intermediate Citrate in Metabolic Reprogramming in Innate Immunity and Inflammation. *Front Immunol* (2018) 9:141. doi: 10.3389/fimmu.2018.00141
179. Feingold KR, Shigenaga JK, Kazemi MR, McDonald CM, Patzek SM, Cross AS, Moser A, Grunfeld C. Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages. *J Leukoc Biol* (2012) 92:829–839. doi: 10.1189/jlb.1111537
180. Huang SC-C, Everts B, Ivanova Y, O'Sullivan D, Nascimento M, Smith AM, Beatty W, Love-Gregory L, Lam WY, O'Neill CM, et al. Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. *Nat Immunol* (2014) 15:846–855. doi: 10.1038/ni.2956
181. Arranz A, Doxaki C, Vergadi E, Martinez de la Torre Y, Vaporidi K, Lagoudaki ED, Ieronymaki E, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN, et al. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109:9517–9522. doi: 10.1073/pnas.1119038109
182. Zhu L, Yang T, Li L, Sun L, Hou Y, Hu X, Zhang L, Tian H, Zhao Q, Peng J, et al. TSC1 controls macrophage polarization to prevent inflammatory disease. *Nat Commun* (2014) 5:4696. doi: 10.1038/ncomms5696
183. Yang T, Zhu L, Zhai Y, Zhao Q, Peng J, Zhang H, Yang Z, Zhang L, Ding W, Zhao Y. TSC1 controls IL-1 $\beta$  expression in macrophages via mTORC1-dependent C/EBP $\beta$  pathway. *Cell Mol Immunol* (2016) 13:640–650. doi: 10.1038/cmi.2015.43
184. Cheng S-C, Quintin J, Cramer RA, Shepardson KM, Saeed S, Kumar V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Martens JHA, Rao NA, Aghajanirofeh A, et al. mTOR- and HIF1 $\alpha$ -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* (2014) 345:1250684. doi: 10.1126/science.1250684
185. Ip WKE, Hoshi N, Shouval DS, Snapper S, Medzhitov R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science* (2017) 356:513–519. doi: 10.1126/science.aal3535
186. Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer* (2008) 8:851–864. doi: 10.1038/nrc2501

187. Yan K, Da T-T, Bian Z-H, He Y, Liu M-C, Liu Q-Z, Long J, Li L, Gao C-Y, Yang S-H, et al. Multi-omics analysis identifies FoxO1 as a regulator of macrophage function through metabolic reprogramming. *Cell Death Dis* (2020) 11:800. doi: 10.1038/s41419-020-02982-0
188. Fan W, Morinaga H, Kim JJ, Bae E, Spann NJ, Heinz S, Glass CK, Olefsky JM. FoxO1 regulates Tlr4 inflammatory pathway signalling in macrophages. *EMBO J* (2010) 29:4223–4236. doi: 10.1038/emboj.2010.268
189. Agarwal S, Bell CM, Rothbart SB, Moran RG. AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Control of mTORC1 Is p53- and TSC2-independent in Pemetrexed-treated Carcinoma Cells. *J Biol Chem* (2015) 290:27473–27486. doi: 10.1074/jbc.M115.665133
190. Zhu YP, Brown JR, Sag D, Zhang L, Suttles J. Adenosine 5'-Monophosphate- Activated Protein Kinase Regulates IL-10-Mediated Anti-Inflammatory Signaling Pathways in Macrophages. *The Journal of Immunology* (2015) 194:584–594. doi: 10.4049/jimmunol.1401024
191. Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J. Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Promotes Macrophage Polarization to an Anti-Inflammatory Functional Phenotype. *The Journal of Immunology* (2008) 181:8633–8641. doi: 10.4049/jimmunol.181.12.8633
192. Salminen A, Hyttinen JMT, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NFκB signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med* (2011) 89:667–676. doi: 10.1007/s00109-011-0748-0
193. Liu C-L, Hsu Y-C, Lee J-J, Chen M-J, Lin C-H, Huang S-Y, Cheng S-P. Targeting the pentose phosphate pathway increases reactive oxygen species and induces apoptosis in thyroid cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* (2020) 499:110595. doi: 10.1016/j.mce.2019.110595
194. Patra KC, Hay N. The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci* (2014) 39:347–354. doi: 10.1016/j.tibs.2014.06.005
195. Schittenhelm D, Neuss-Radu M, Verma N, Pink M, Schmitz-Spanke S. ROS and pentose phosphate pathway: mathematical modelling of the metabolic regulation in response to xenobiotic-induced oxidative stress and the proposed Impact of the gluconate shunt. *Free Radic Res* (2019) 53:979–992. doi: 10.1080/10715762.2019.1660777
196. Britt EC, Lika J, Giese MA, Schoen TJ, Seim GL, Huang Z, Lee PY, Huttenlocher A, Fan J. Switching to the cyclic pentose phosphate pathway powers the oxidative burst in activated neutrophils. *Nat Metab* (2022) 4:389–403. doi: 10.1038/s42255-022-00550-8
197. Ham M, Lee J-W, Choi AH, Jang H, Choi G, Park J, Kozuka C, Sears DD, Masuzaki H, Kim JB. Macrophage glucose-6-phosphate dehydrogenase stimulates proinflammatory responses with oxidative stress. *Mol Cell Biol* (2013) 33:2425–2435. doi: 10.1128/MCB.01260-12

198. Nagy C, Haschemi A. Time and Demand are Two Critical Dimensions of Immunometabolism: The Process of Macrophage Activation and the Pentose Phosphate Pathway. *Front Immunol* (2015) 6:164. doi: 10.3389/fimmu.2015.00164
199. Haschemi A, Kosma P, Gille L, Evans CR, Burant CF, Starkl P, Knapp B, Haas R, Schmid JA, Jandl C, et al. The sedoheptulose kinase CARLK directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab* (2012) 15:813–826. doi: 10.1016/j.cmet.2012.04.023
200. Canton M, Sánchez-Rodríguez R, Spera I, Venegas FC, Favia M, Viola A, Castegna A. Reactive Oxygen Species in Macrophages: Sources and Targets. *Front Immunol* (2021) 12:734229. doi: 10.3389/fimmu.2021.734229
201. Wang D, Malo D, Hekimi S. Elevated mitochondrial reactive oxygen species generation affects the immune response via hypoxia-inducible factor-1alpha in long-lived Mcl1+/- mouse mutants. *J Immunol* (2010) 184:582–590. doi: 10.4049/jimmunol.0902352
202. Rossetti C, Peri F. *The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Non Infectious Inflammation*. Springer Nature (2020). 174 p. <https://play.google.com/store/books/details?id=IGMGEEAAAQBAJ>
203. Lin J, Ren J, Gao DS, Dai Y, Yu L. The Emerging Application of Itaconate: Promising Molecular Targets and Therapeutic Opportunities. *Front Chem* (2021) 9:669308. doi: 10.3389/fchem.2021.669308
204. Liu P-S, Wang H, Li X, Chao T, Teav T, Christen S, Di Conza G, Cheng W-C, Chou C-H, Vavakova M, et al.  $\alpha$ -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. *Nat Immunol* (2017) 18:985–994. doi: 10.1038/ni.3796
205. Ming-Chin Lee K, Achuthan AA, De Souza DP, Lupancu TJ, Binger KJ, Lee MKS, Xu Y, McConville MJ, de Weerd NA, Dragoljevic D, et al. Type I interferon antagonism of the JMJD3-IRF4 pathway modulates macrophage activation and polarization. *Cell Rep* (2022) 39:110719. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110719
206. Di Conza G, Tsai C-H, Ho P-C. Fifty Shades of  $\alpha$ -Ketoglutarate on Cellular Programming. *Mol Cell* (2019) 76:1–3. doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.002
207. Wang X, Liu R, Qu X, Yu H, Chu H, Zhang Y, Zhu W, Wu X, Gao H, Tao B, et al.  $\alpha$ Ketoglutarate-Activated NF- $\kappa$ B Signaling Promotes Compensatory Glucose Uptake and Brain Tumor Development. *Mol Cell* (2019) 76:148–162.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2019.07.007
208. Henze A-T, Mazzone M. The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages. *J*

*Clin Invest* (2016) 126:3672–3679. doi: 10.1172/JCI84427

209. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* (1999) 79:991–995. doi: 10.1038/sj.bjc.6690158
210. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* (2004) 104:2224–2234. doi: 10.1182/blood-2004-03-1109
211. Vahidian F, Duijf PHG, Safarzadeh E, Derakhshani A, Baghbanzadeh A, Baradaran B. Interactions between cancer stem cells, immune system and some environmental components: Friends or foes? *Immunology Letters* (2019) 208:19–29. doi: 10.1016/j.imlet.2019.03.004
212. Cacho-Díaz B, García-Botello DR, Wegman-Ostrosky T, Reyes-Soto G, Ortiz-Sánchez E, Herrera-Montalvo LA. Tumor microenvironment differences between primary tumor and brain metastases. *Journal of Translational Medicine* (2020) 18: doi: 10.1186/s12967-019-02189-8
213. Rubio C, Munera-Maravilla E, Lodewijk I, Suarez-Cabrera C, Karaivanova V, RuizPalomares R, Paramio JM, Dueñas M. Macrophage polarization as a novel weapon in conditioning tumor microenvironment for bladder cancer: can we turn demons into gods? *Clinical and Translational Oncology* (2019) 21:391–403. doi: 10.1007/s12094-018-1952-y
214. Szade K, Gulati GS, Chan CKF, Kao KS, Miyanishi M, Marjon KD, Sinha R, George BM, Chen JY, Weissman IL. Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. *Antioxidants & Redox Signaling* (2018) 29:191–204. doi: 10.1089/ars.2017.7419
215. Li K, Lu L, Xue C, Liu J, He Y, Zhou J, Xia Z, Dai L, Luo Z, Mao Y, et al. Polarization of tumor-associated macrophage phenotype via porous hollow iron nanoparticles for tumor immunotherapy in vivo. *Nanoscale* (2020) 12:130–144. doi: 10.1039/c9nr06505a
216. Raggi F, Pelassa S, Pierobon D, Penco F, Gattorno M, Novelli F, Eva A, Varesio L, Giovarelli M, Bosco MC. Regulation of Human Macrophage M1–M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1. *Front Immunol* (2017) 8:1097. doi: 10.3389/fimmu.2017.01097
217. Jeong J, Suh Y, Jung K. Context Drives Diversification of Monocytes and Neutrophils in Orchestrating the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* (2019) 10:1817. doi: 10.3389/fimmu.2019.01817
218. Qian B, Deng Y, Im JH, Muschel RJ, Zou Y, Li J, Lang RA, Pollard JW. A distinct macrophage population mediates metastatic breast cancer cell

extravasation, establishment and growth. *PLoS One* (2009) 4:e6562. doi: 10.1371/journal.pone.0006562

219. Fritz JM, Tennis MA, Orlicky DJ, Lin H, Ju C, Redente EF, Choo KS, Staab TA, Bouchard RJ, Merrick DT, et al. Depletion of tumor-associated macrophages slows the growth of chemically induced mouse lung adenocarcinomas. *Front Immunol* (2014) 5:587. doi: 10.3389/fimmu.2014.00587
220. Andón FT, Digifico E, Maeda A, Erreni M, Mantovani A, Alonso MJ, Allavena P. Targeting tumor associated macrophages: The new challenge for nanomedicine. *Semin Immunol* (2017) 34:103–113. doi: 10.1016/j.smim.2017.09.004





## 10. Anexos

### 10.1 Anexo A: Material Suplementario de la tesis

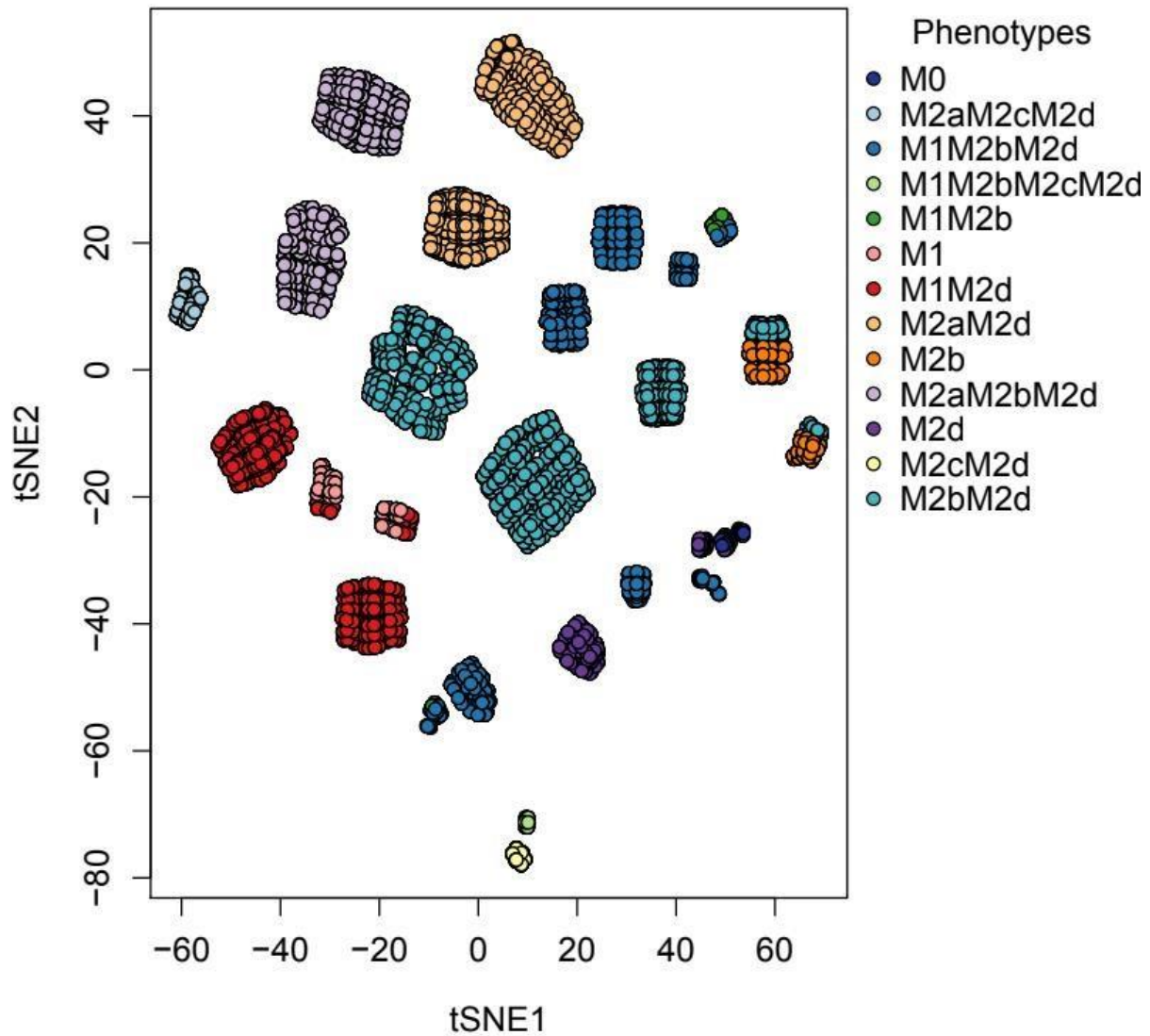


Figura S1. Gráfico t-SNE de los fenotipos obtenidos de nuestra red de polarización de macrófagos. A los atractores se les entregó un punto en un plano x-y basado en la expresión de 0 y 1, los atractores con la misma combinación de 0 y 1 se colocaron cerca.

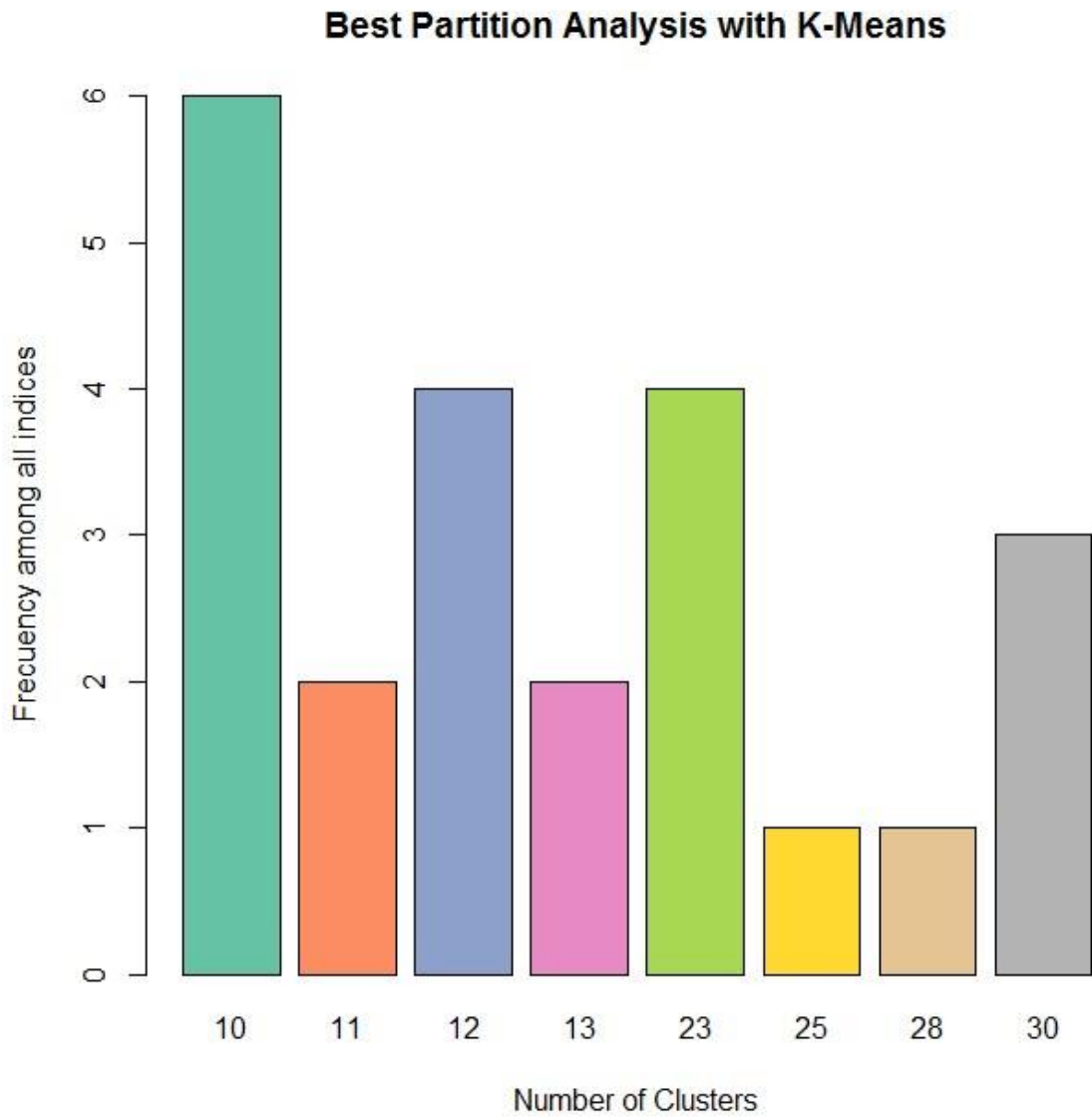


Figura S2. El número óptimo de clústeres para K-medias. Evaluamos 23 métricas para determinar el número de clústeres para obtener el mejor esquema de clústeres, usamos los datos obtenidos de los puntos t-SNE para evaluar el número de clústeres que explicarán la distribución de fenotipos.

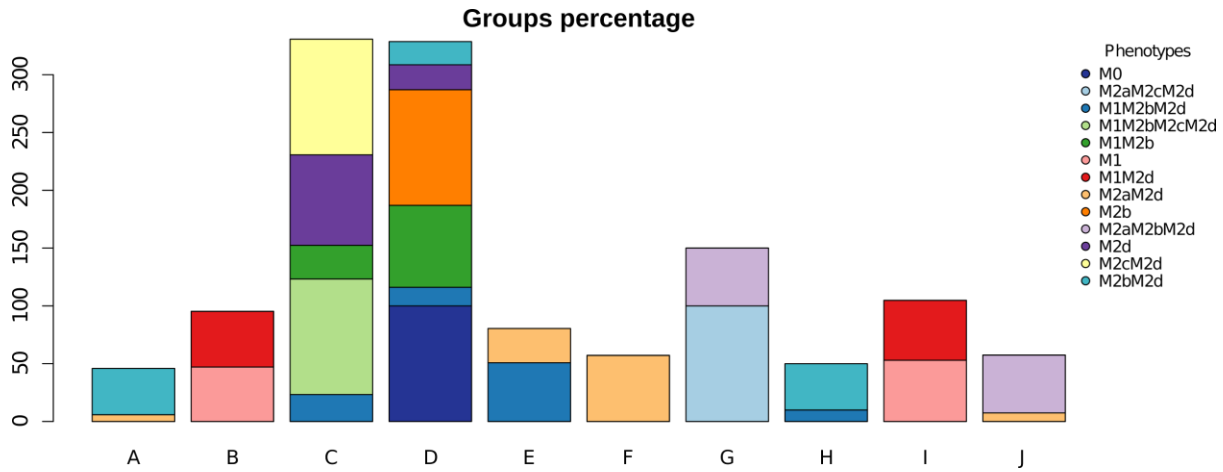


Figura S3. Porcentaje de grupos de cada fenotipo en los 10 grupos utilizados en K-medias. Cada color está asociado con un determinado fenotipo y cada barra representa un grupo.

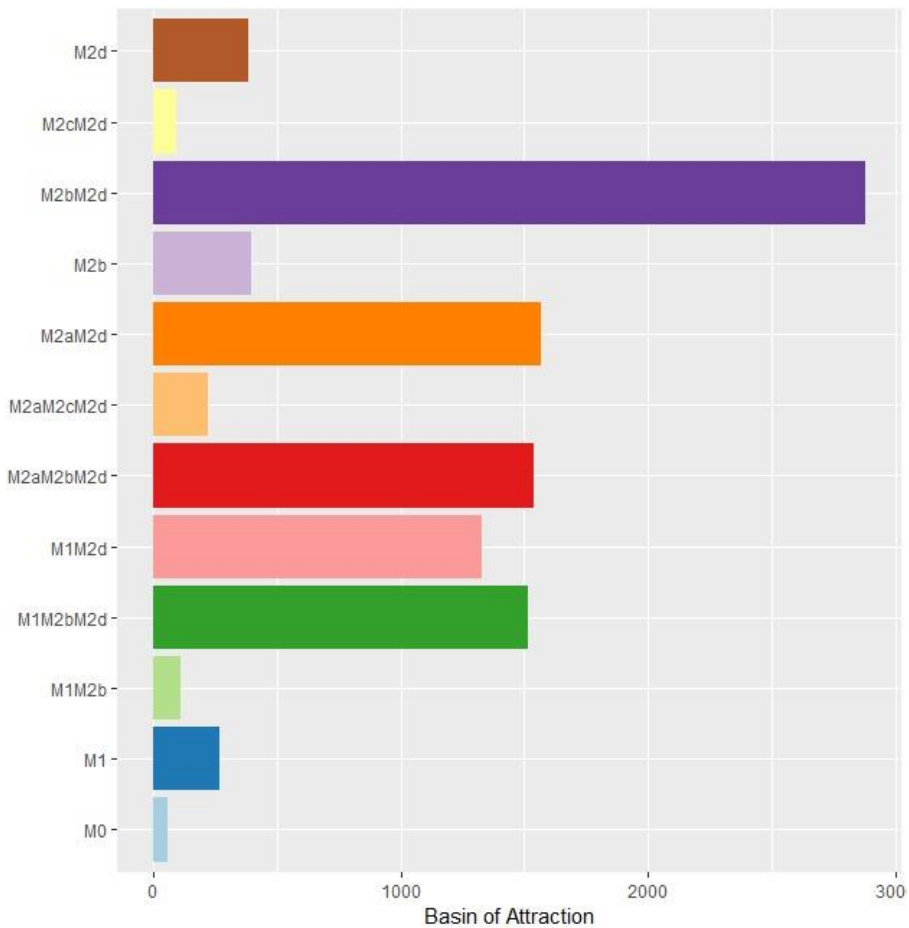


Figura S4. Cuenca de atracción de los fenotipos obtenidos de nuestra red de polarización de macrófagos. Diagrama de caja de los atractores obtenidos de nuestra red reguladora transcripcional de polarización de macrófagos. Exploramos todas las posibles condiciones iniciales en función del número de nodos  $2^{29}$ .

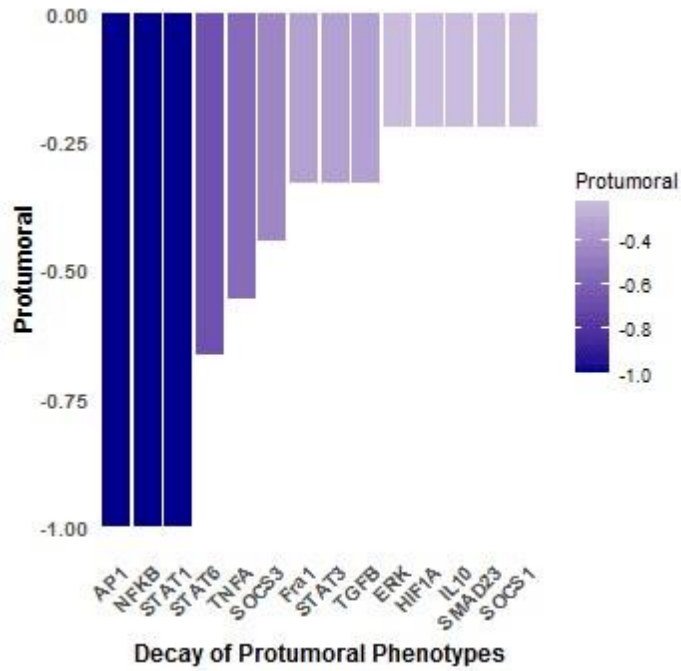


Figure S5. Decay of pro-tumoral phenotypes when overexpressed transcriptional factors. The number of pro-tumoral macrophage phenotypes depicted in Figure 3A were counted. Protumoral phenotypes are attractors that have a M2 macrophage phenotype but do not have a M1 phenotype. In Figure 3A are 9 pro-tumoral phenotypes, we divided the number of protumoral phenotypes lost (gray areas) when the perturbations were applied on said nodes.

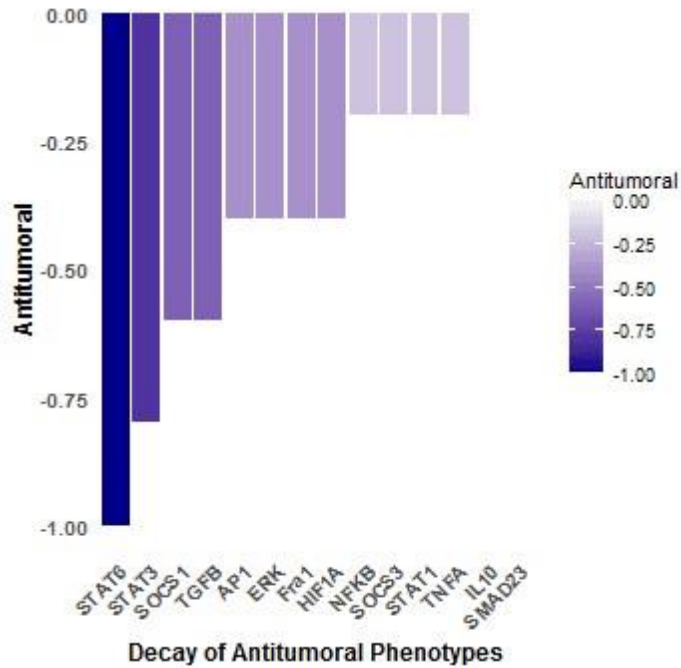


Figura S6. Deterioro de fenotipos antitumorales cuando se sobreexpresan factores transcripcionales. Se contó el número de fenotipos de macrófagos protumorales representados en la figura 3A. Los fenotipos protumorales son atractores que tienen un fenotipo de macrófago M2 pero no tienen un fenotipo M1. En la figura 3A hay 5 fenotipos antitumorales, dividimos el número de fenotipos antitumorales perdidos (áreas grises) cuando se aplicaron las perturbaciones en dichos nodos.

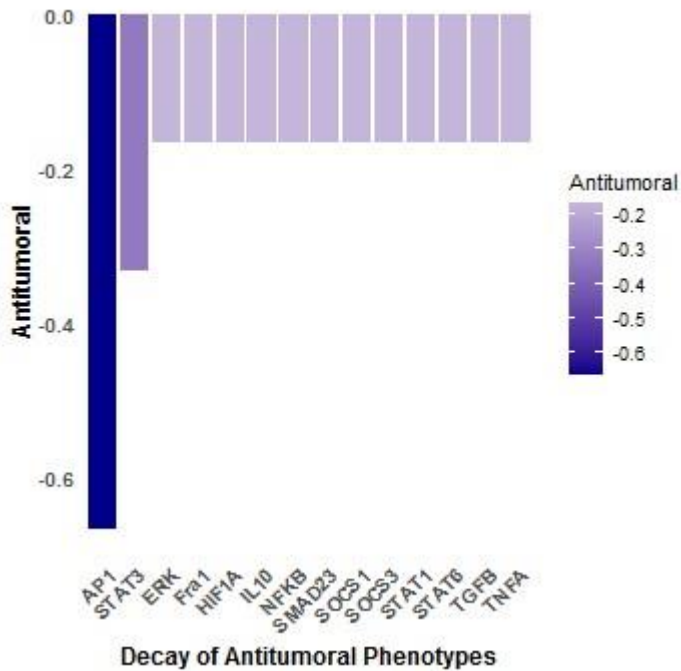


Figura S7. Desintegración de los fenotipos antitumorales cuando eliminamos los factores transcripcionales. Se contó el número de fenotipos de macrófagos protumorales representados en la figura 3B. Los fenotipos protumorales son atractores que tienen un

fenotipo de macrófago M2, pero no tienen un fenotipo M1. En la figura 3B hay 5 fenotipos antitumorales, dividimos el número de fenotipos antitumorales perdidos (áreas grises) cuando se aplicaron las perturbaciones en dichos nodos.

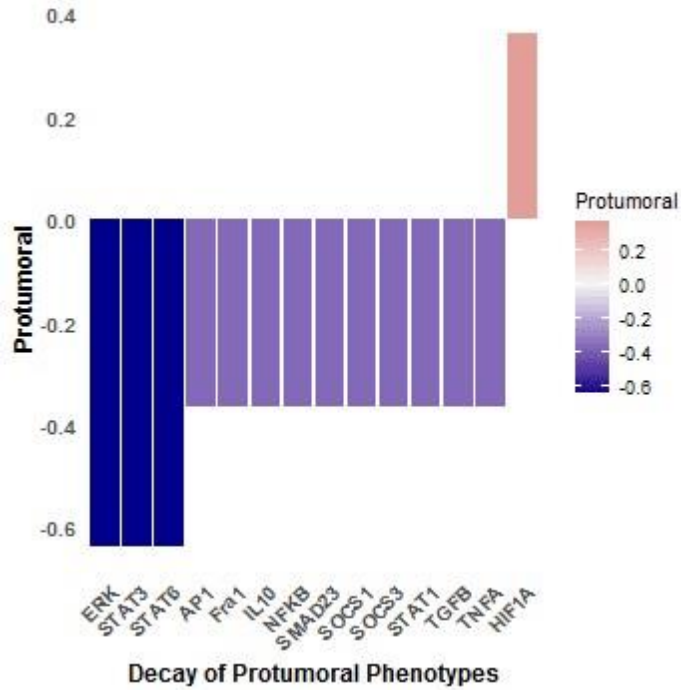


Figura S8. Desintegración de los fenotipos protumorales cuando eliminamos los factores transcripcionales. Se contó el número de fenotipos de macrófagos protumorales representados en la figura 3B. Los fenotipos protumorales son atractores que tienen un fenotipo de macrófago M2, pero no tienen un fenotipo M1. En la figura 3B hay 10 fenotipos protumorales, dividimos el número de fenotipos protumorales perdidos (áreas grises) cuando se aplicaron las perturbaciones en dichos nodos.

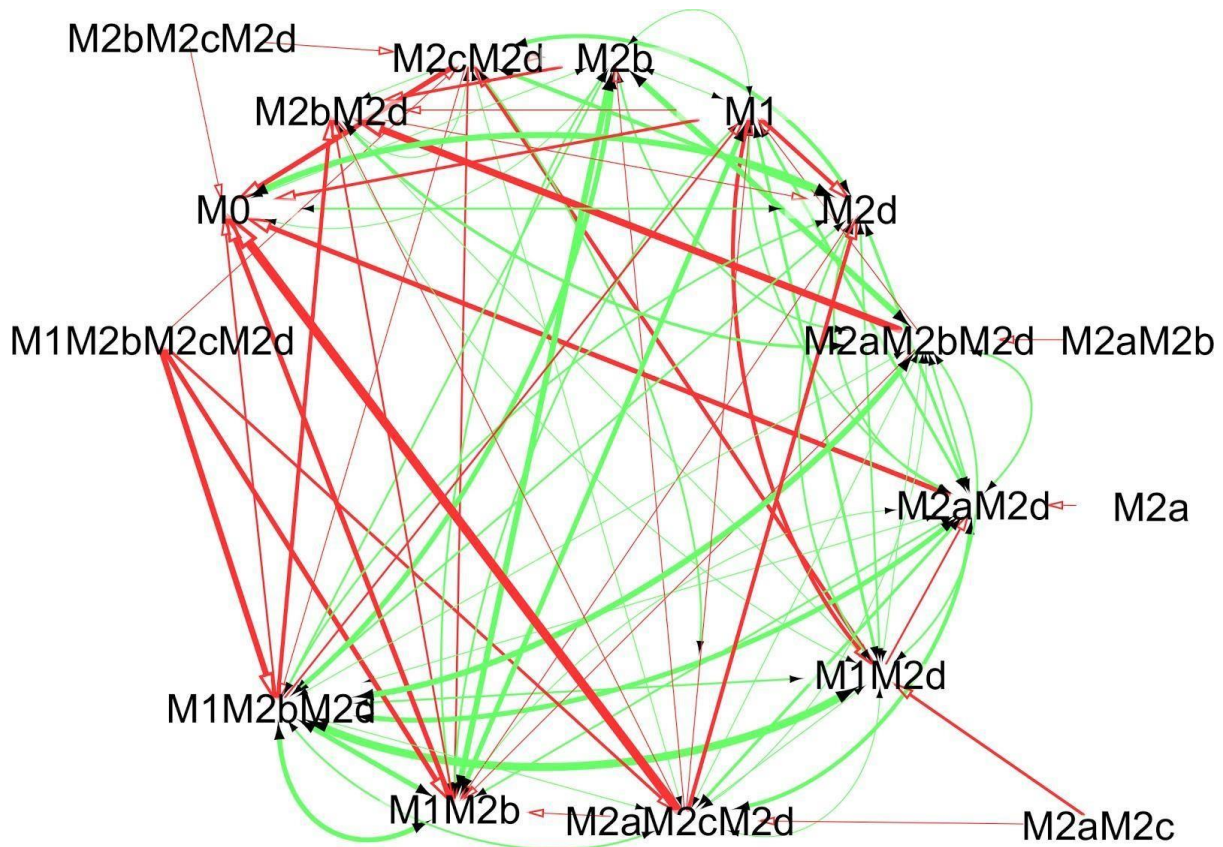


Figura S9. Mapa de destino celular de polarización de macrófagos. Red de polarización de macrófagos y su interacción entre fenotipos. El color rojo significa que la transición de ese fenotipo a otro es irreversible, mientras que el verde significa que es reversible. El grosor de la línea significa el número de nodos que están involucrados en dicha transición, mientras más delgada sea la línea, significa que solo un nodo es suficiente para dictar dicha transición entre fenotipos.



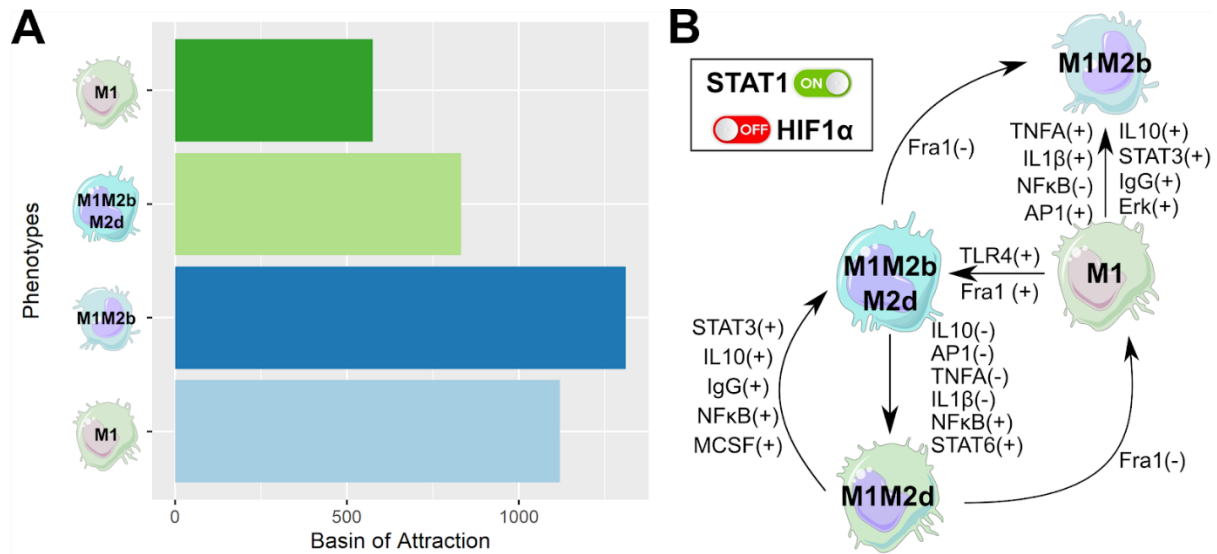


Figura S10. Mapa de destino celular de polarización de macrófagos. Red de polarización de macrófagos y su interacción entre fenotipos. El color rojo significa que la transición de ese fenotipo a otro es irreversible, mientras que el verde significa que es reversible. El grosor de la línea significa el número de nodos que están involucrados en dicha transición, mientras más delgada sea la línea, significa que solo un nodo es suficiente para dictar dicha transición entre fenotipos.

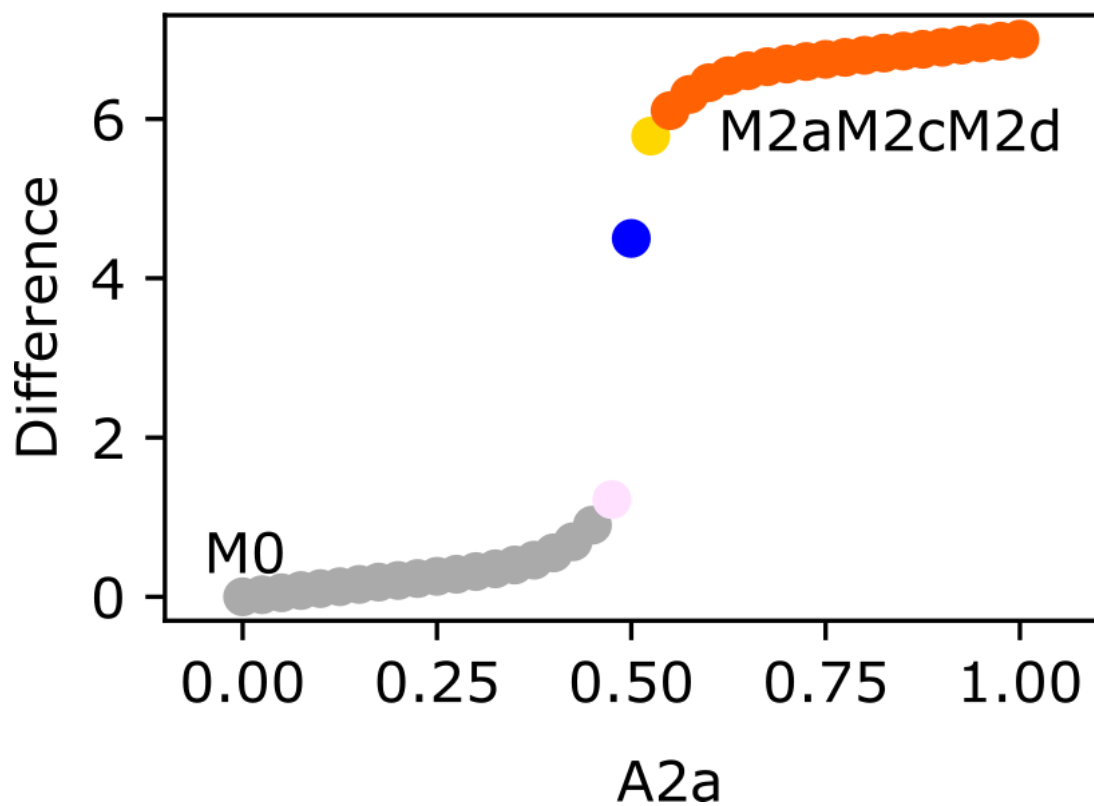


Figura S11. Polarización de macrófagos en diferentes citocinas exógenas individuales. Todos los paneles tienen como estado inicial el fenotipo M0 (monocitos). El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M0 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citoquinas exógenas. Aumento gradual de Adenosinas.

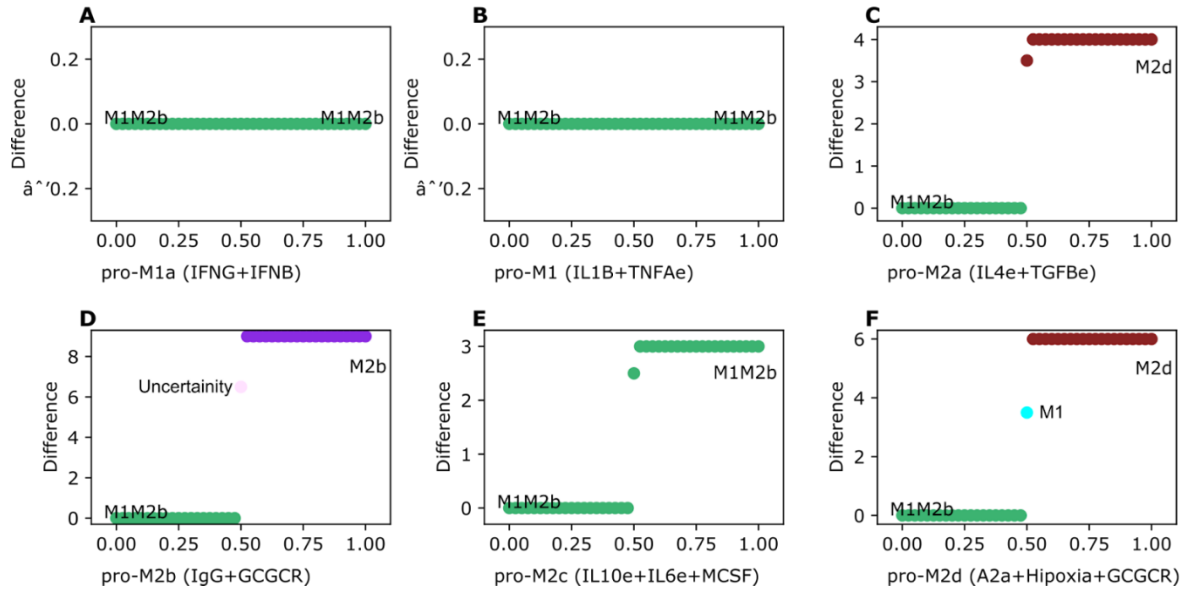


Figura S12. Polarización de macrófagos en diferentes microambientes asociados al fenotipo. Todos los paneles tienen como estado inicial el fenotipo M1M2b. El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M0 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citoquinas exógenas. (A) aumento gradual de interferón-gamma (IFNG) e interferón-beta (IFNB) en el entorno M1a, (B) mejora del factor de necrosis tumoral alfa (TNFAe) y la interleucina 1-beta (IL1B) para el microentorno M1, (C) aumento gradual de interleucina-4 y factor de crecimiento tumoral, un microambiente pro-M2a, (D) aumento gradual de inmunoglobulina y glucocorticoides, el microambiente pro-M2b, (E) aumento gradual de interleucina-10, estimulante de colonias de macrófagos factor e interleucina-6, el entorno pro-M2c, y (F) aumento gradual de

adenosinas, hipoxia y glucocorticoides, el entorno pro-M2d.

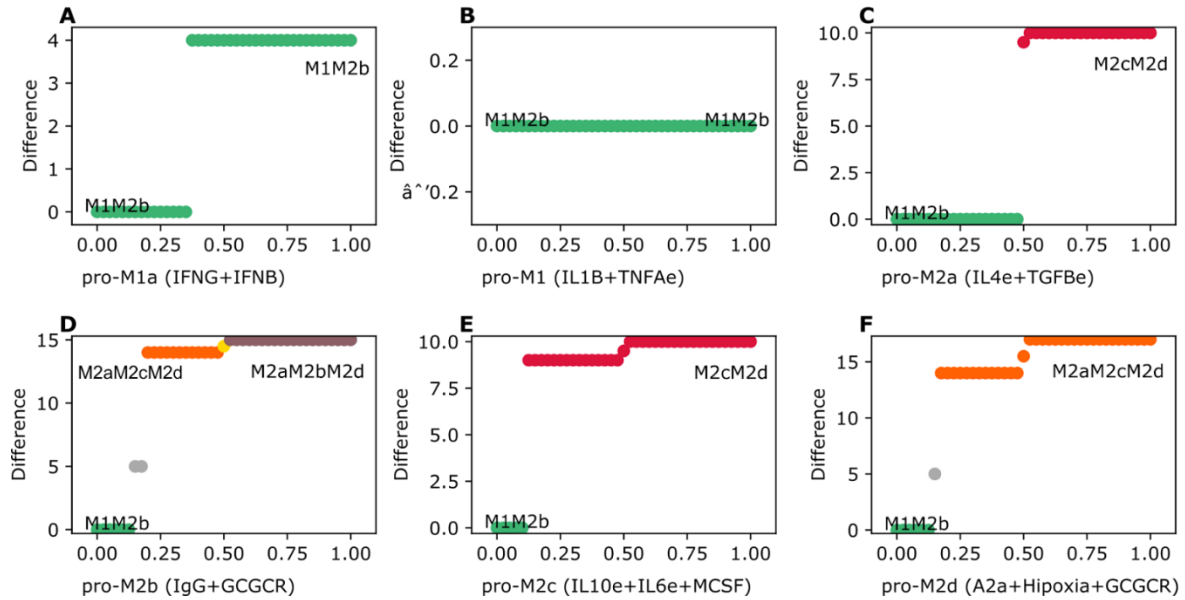


Figura S13. Polarización de macrófagos en diferentes microambientes asociados al fenotipo. Todos los paneles tienen como estado inicial el fenotipo M2bM2d. El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M0 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citoquinas exógenas. (A) aumento gradual de interferón-gamma (IFNG) e interferón-beta (IFNB) en el entorno M1a, (B) mejora del factor de necrosis tumoral alfa (TNFAe) y la interleucina 1-beta (IL1B) para el microentorno M1, (C) aumento gradual de interleucina-4 y factor de crecimiento tumoral, un microambiente pro-M2a, (D) aumento gradual de inmunoglobulina y glucocorticoides, el microambiente pro-M2b, (E) aumento gradual de interleucina-10, estimulante de colonias de macrófagos factor e interleucina-6, el entorno pro-M2c, y (F) aumento gradual de adenosinas, hipoxia y glucocorticoides, el entorno pro-M2d.

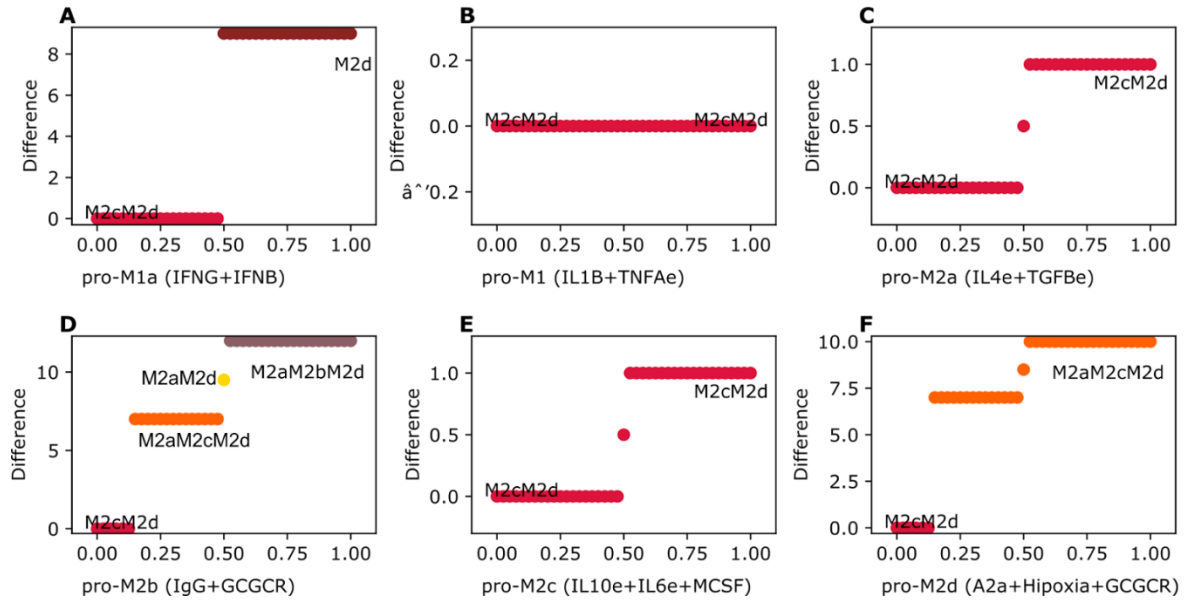


Figura S14. Polarización de macrófagos en diferentes microambientes asociados al fenotipo. Todos los paneles tienen como estado inicial el fenotipo M2cM2d. El gráfico muestra en el eje y la diferencia entre los valores del estado inicial M0 y el estado estacionario final, mientras que el eje x representa el aumento gradual de las citoquinas exógenas. (A) aumento gradual de interferón-gamma (IFNG) e interferón-beta (IFNB) en el entorno M1a, (B) mejora del factor de necrosis tumoral alfa (TNFAe) y la interleucina 1-beta (IL1B) para el microentorno M1, (C) aumento gradual de interleucina-4 y factor de crecimiento tumoral, un microambiente pro-M2a, (D) aumento gradual de inmunoglobulina y glucocorticoides, el microambiente pro-M2b, (E) aumento gradual de interleucina-10, estimulante de colonias de macrófagos factor e interleucina-6, el entorno pro-M2c, y (F) aumento gradual de adenosinas, hipoxia y glucocorticoides, el entorno pro-M2d.

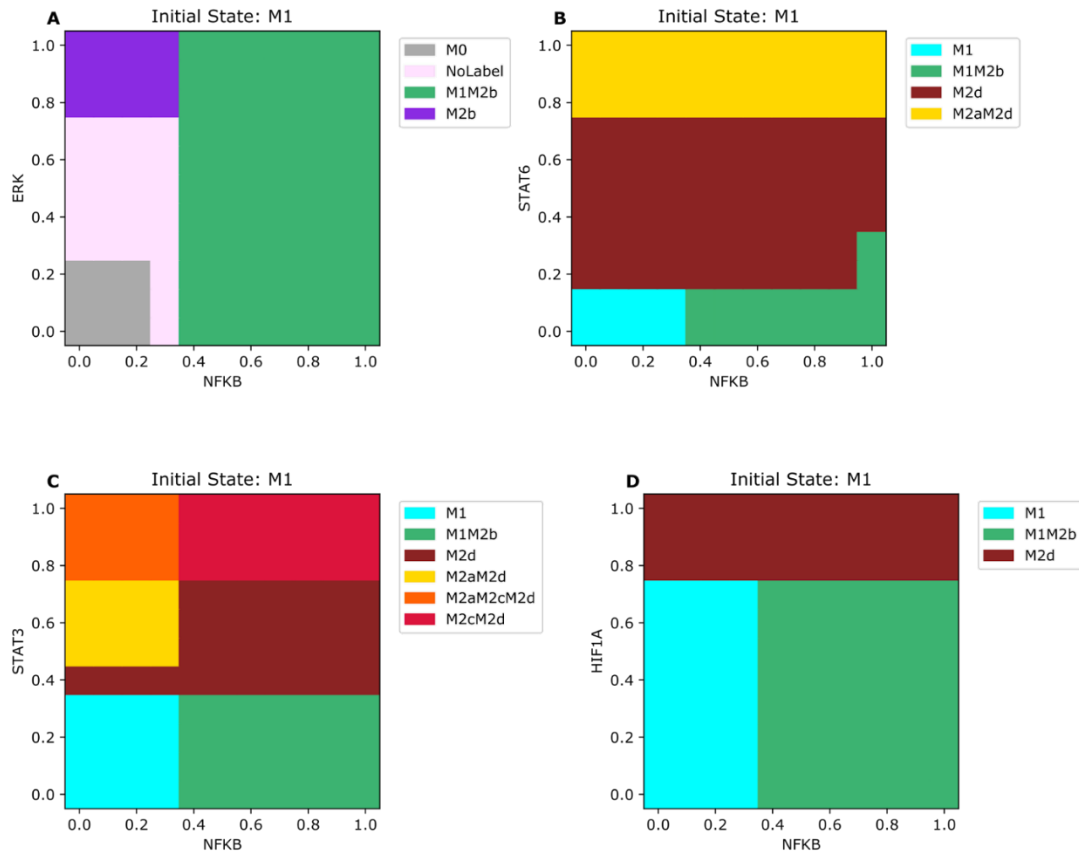


Figura S15. Diagramas de espacio de fenotipo para el fenotipo de macrófago M1 en microambientes opuestos. Todos los paneles del diagrama tienen como estado inicial el macrófago M1 (NFκB activado). También para todos los paneles, NFκB ha aumentado gradualmente en los microambientes de macrófagos opuestos (A) aumento gradual del factor de transcripción ERK en un microambiente pro-M2b, (B) mejora del factor de transcripción STAT6 en un microambiente pro-M2a (C) aumento gradual del factor de transcripción STAT3 en un microambiente pro-M2c, (D) aumento gradual de HIF1-α en un microambiente pro-M2d.

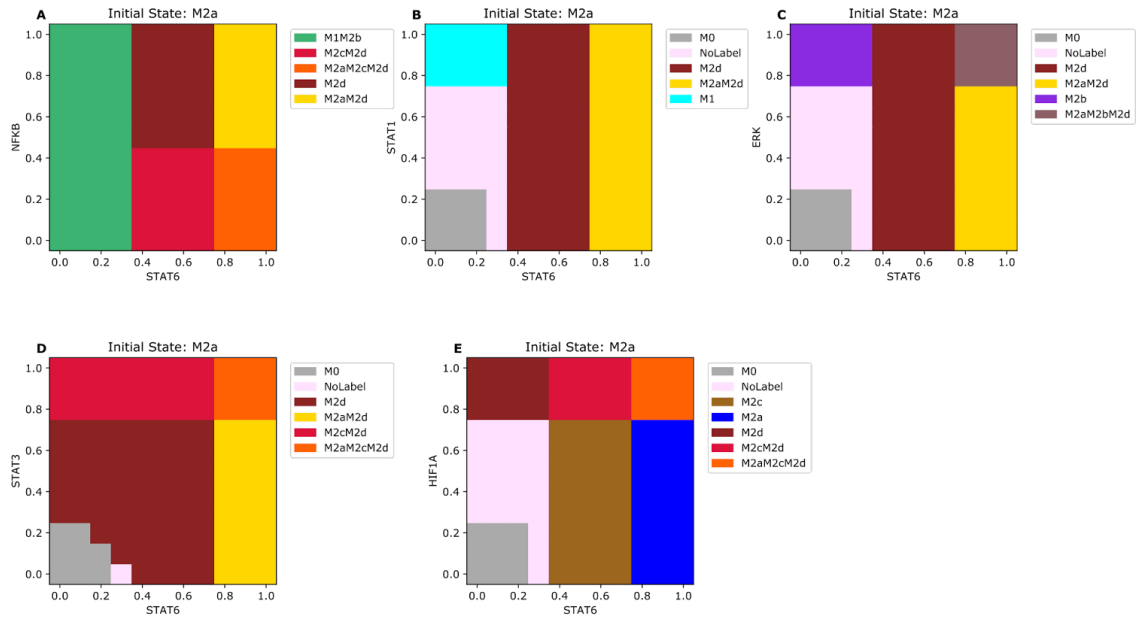


Figura S16. Diagramas de espacio de fenotipo para el fenotipo de macrófago M2a en microambientes opuestos. Todos los paneles del diagrama tienen el macrófago M2a (STAT6 activado) como estado inicial. También para todos los paneles, STAT6 aumenta gradualmente en los microambientes de macrófagos opuestos (A) Incremento gradual de NFκB en un microambiente pro-M1, (B) Mejora gradual de STAT1 en un microambiente pro-M1a, (C) Aumento gradual de ERK factor de transcripción en un microambiente pro-M2b, (D) mejora gradual del factor de transcripción STAT3, en un microambiente pro-M2c, y (E) aumento gradual de HIF1-α en un microambiente pro-M2d.

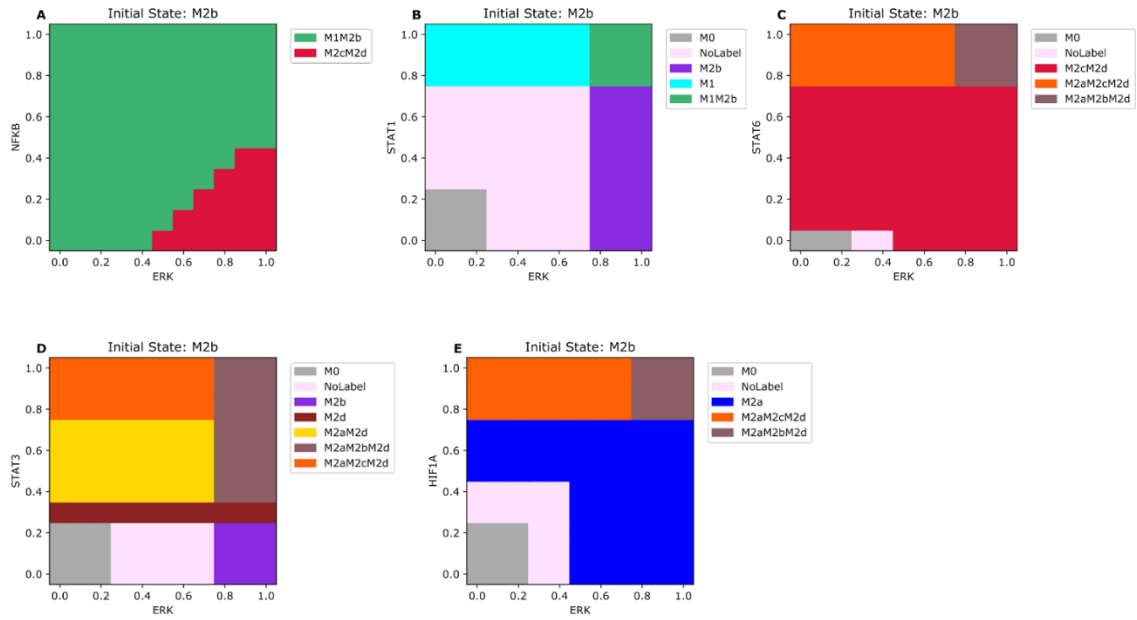


Figura S17. Diagramas de espacio fenotípico para el fenotipo de macrófagos M2b en microambientes opuestos. Todos los paneles del diagrama tienen el macrófago M2b (ERK activado) como estado inicial. También para todos los paneles, ERK aumenta gradualmente en los microambientes de macrófagos opuestos (A) Aumento gradual de NFκB en un microambiente pro-M1, (B) Mejora gradual de STAT1 en un microambiente pro-M1a, (C) Aumento gradual de la Factor de transcripción STAT6 en un microambiente pro-M2a, (D) mejora gradual del factor de transcripción STAT3, en un microambiente pro-M2c, y (E) aumento gradual de HIF1-α en un microambiente pro-M2d.



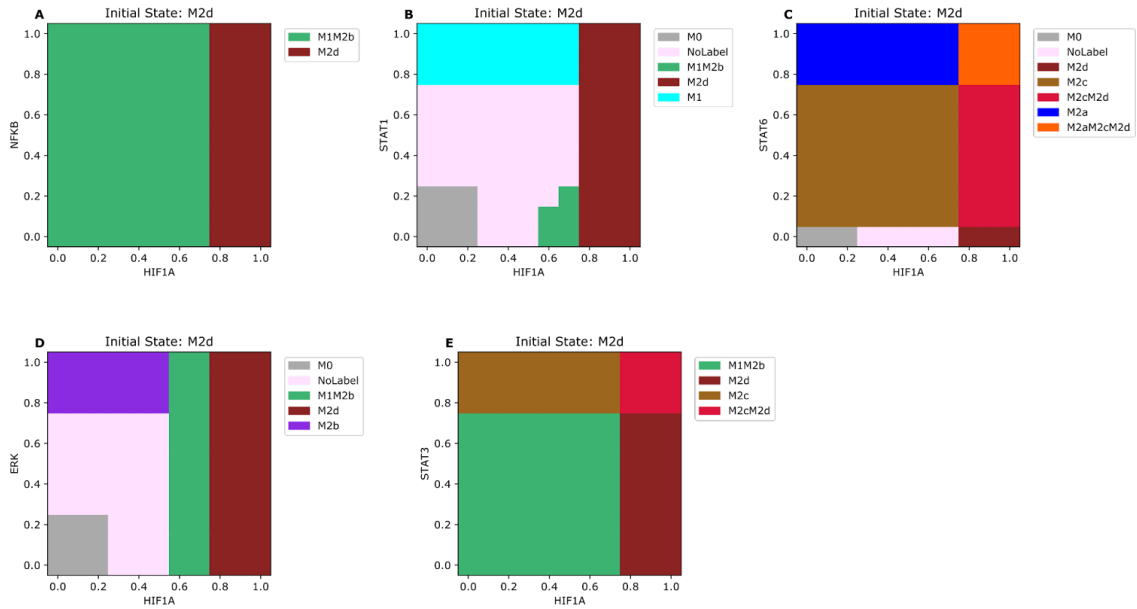


Figura S18. Diagramas de espacio fenotípico para el fenotipo de macrófagos M2c en microambientes opuestos. Todos los paneles del diagrama tienen el macrófago M2c (HIF1- $\alpha$  activado) como estado inicial. También para todos los paneles, HIF1- $\alpha$  aumenta gradualmente en los microambientes de macrófagos opuestos (A) Incremento gradual de NFkB en un microambiente pro-M1, (B) Mejora gradual de STAT1 en un microambiente pro-M1a, (C) Aumento gradual del factor de transcripción STAT6 en un microambiente pro-M2a, (D) aumento gradual del factor de transcripción ERK en un microambiente pro-M2b, y (E) aumento gradual del factor de transcripción STAT3, en un microambiente pro-M2c.

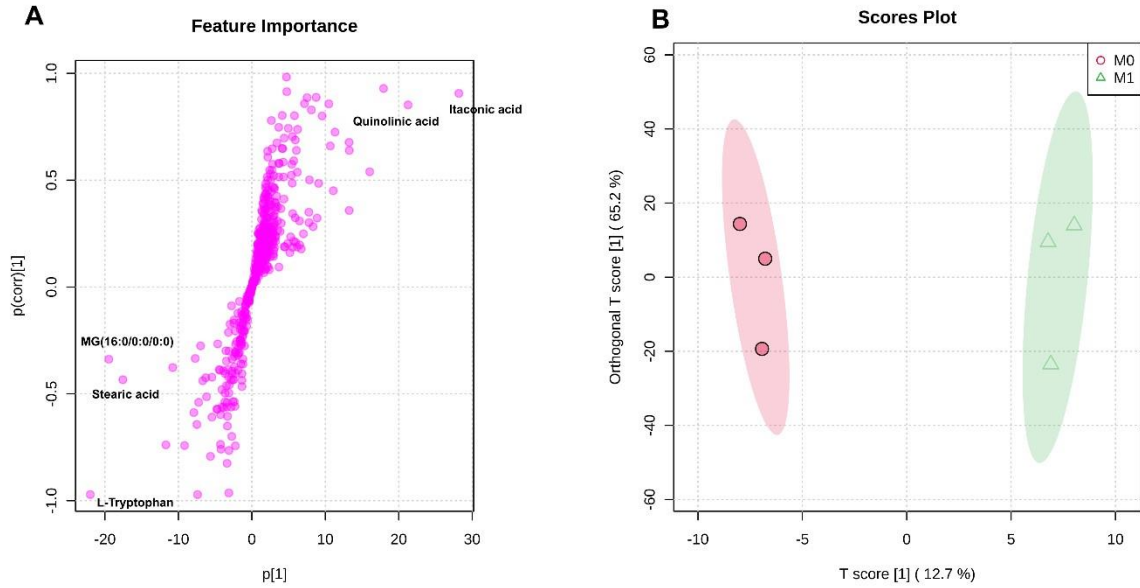


Figura S 19. O-PLSDA de la diferencia metabólica entre el monocito (M0) y el macrófago activado por IFN- $\gamma$  y LPS. (A) Gráfico de la importancia de los metabolitos mayormente diferenciados entre los monocitos y los macrófagos de tipo M1, (B) Grafico S la diferencia entre las muestras obtenidas de cada fenotipo evaluado.

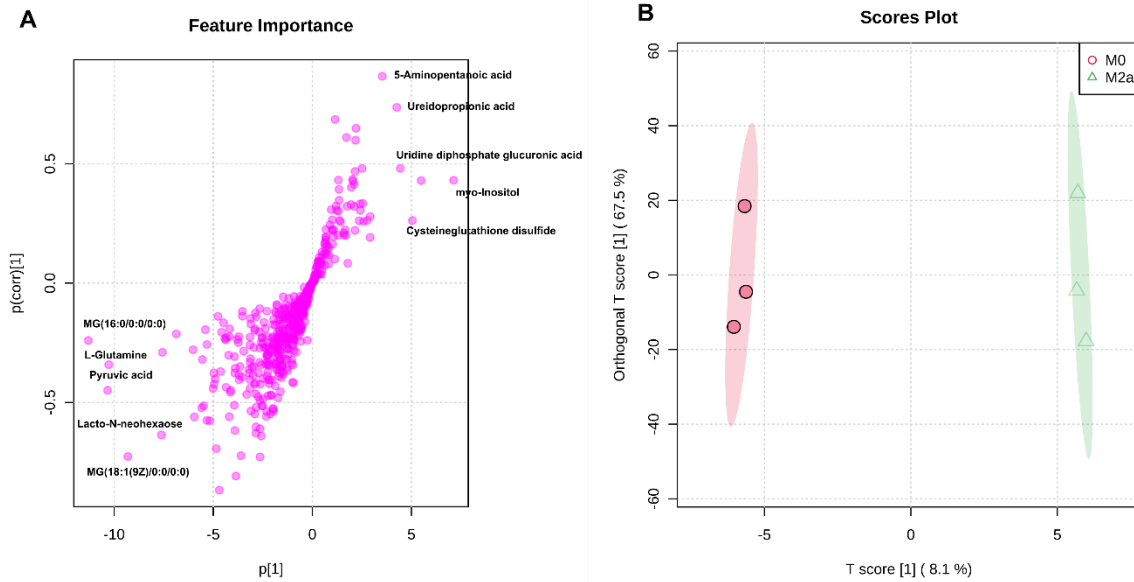


Figura S20. O-PLSDA de la diferencia metabólica entre el monocito (M0) y el macrófago activado por IL-4. (A) Gráfico de la importancia de los metabolitos mayormente diferenciados entre los monocitos y los macrófagos de tipo M2a, (B) Grafico S la diferencia entre las muestras obtenidas de cada fenotipo evaluado

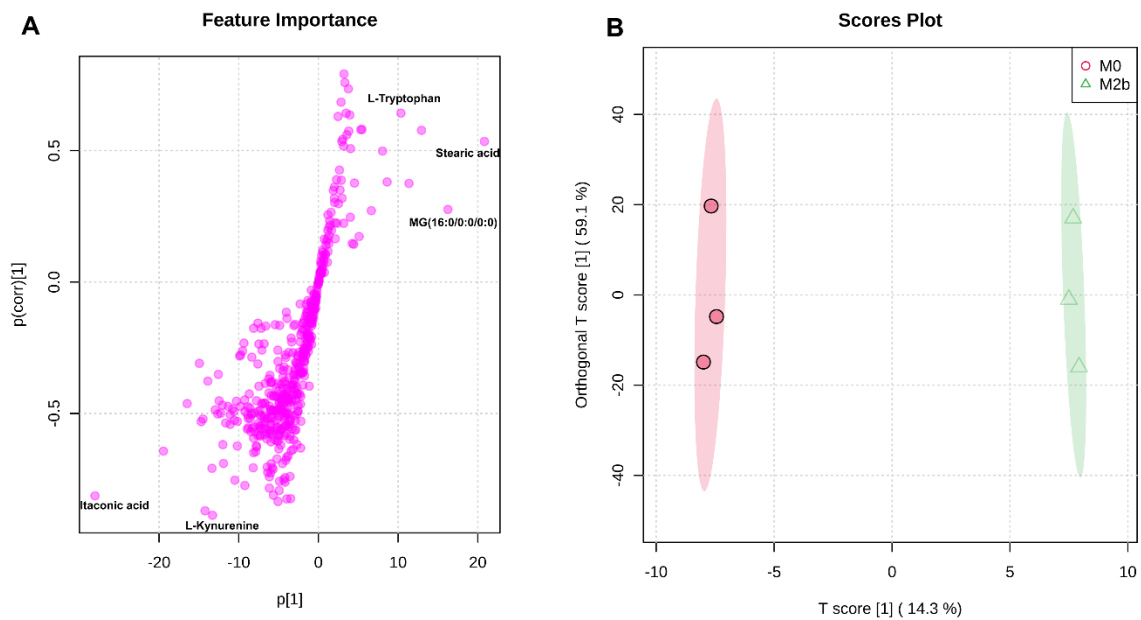


Figura S21. O-PLSDA de la diferencia metabólica entre el monocito (M0) y el macrófago activado por IgG (A) Gráfico de la importancia de los metabolitos mayormente diferenciados entre los monocitos y los macrófagos de tipo M2b, (B) Grafico S la diferencia entre las muestras obtenidas de cada fenotipo evaluado.

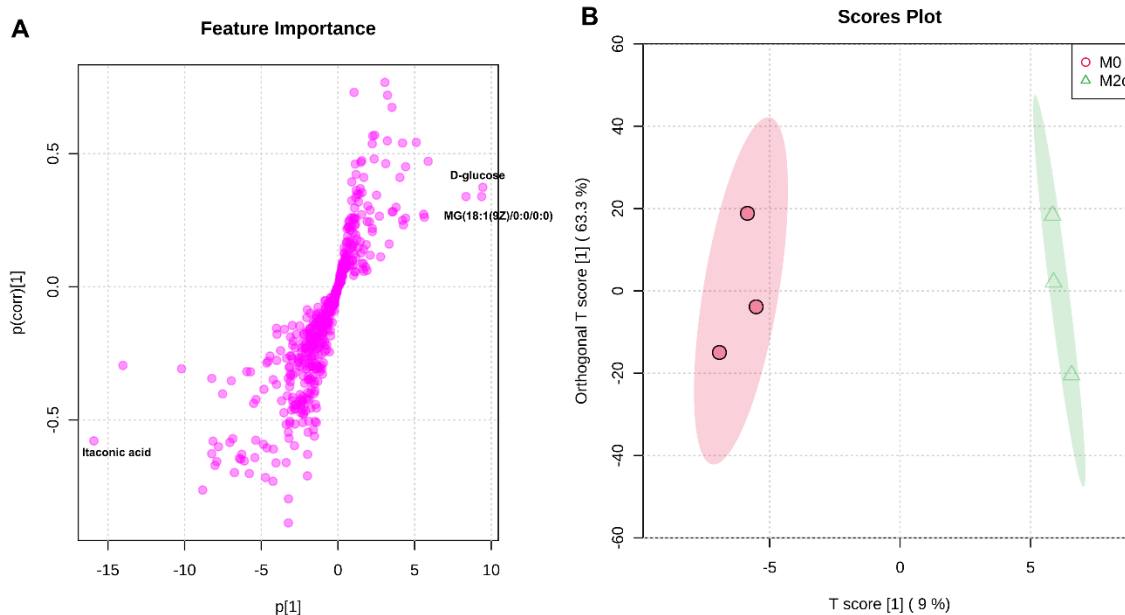


Figura S22. O-PLS-DA de la diferencia metabólica entre el monocito (M0) y el macrófago activado por IL-10. (A) Gráfico de la importancia de los metabolitos mayormente diferenciados entre los monocitos y los macrófagos de tipo M2c, (B) Grafico S la diferencia entre las muestras obtenidas de cada fenotipo evaluado.

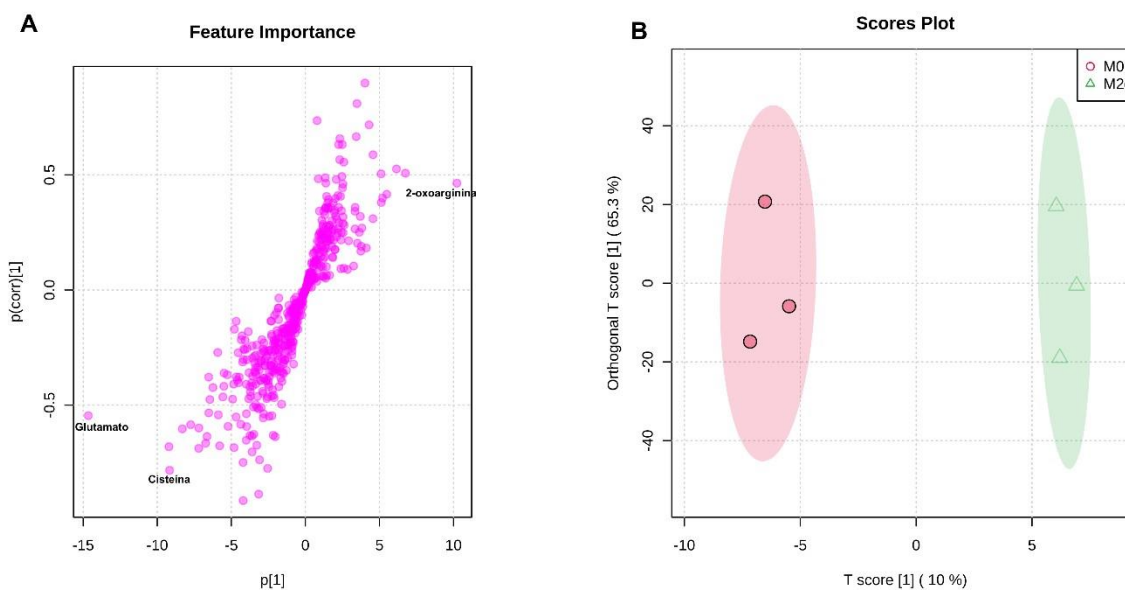


Figura S23. O-PLS-DA de la diferencia metabólica entre el monocito (M0) y el macrófago activado por IL-6 y LIF. (A) Gráfico de la importancia de los metabolitos mayormente diferenciados entre los monocitos y los macrófagos de tipo M2d, (B) Grafico S la diferencia entre las muestras obtenidas de cada fenotipo evaluado.

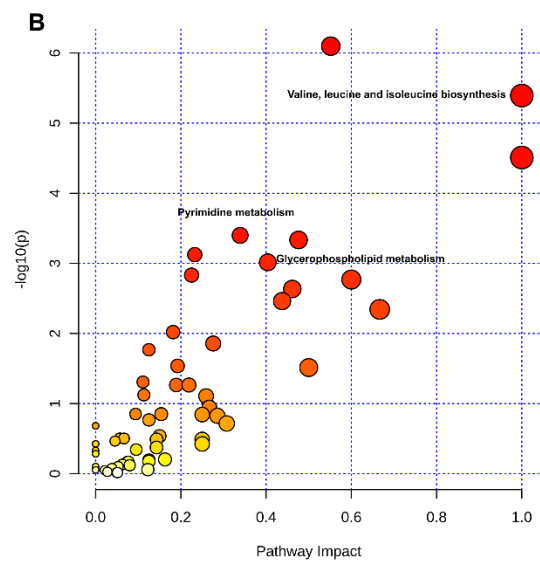
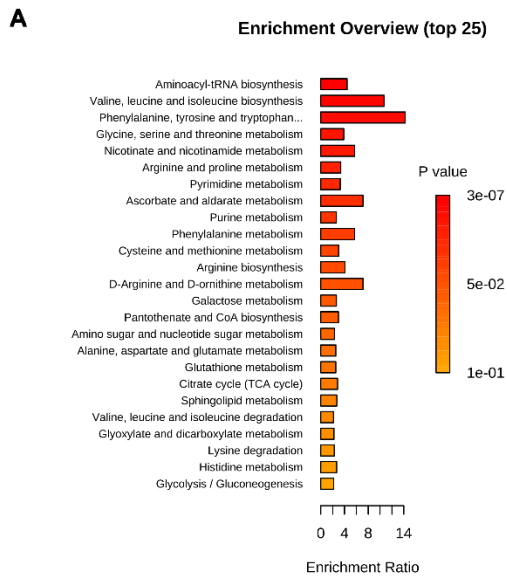


Figura S24. Comparación entre M1 y M2a activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2a

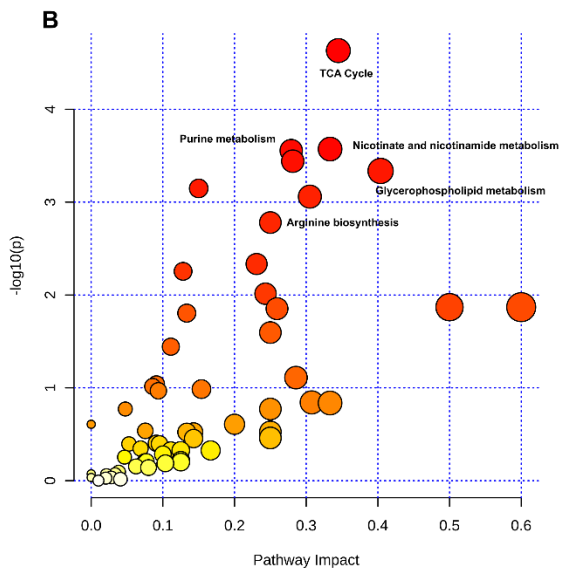
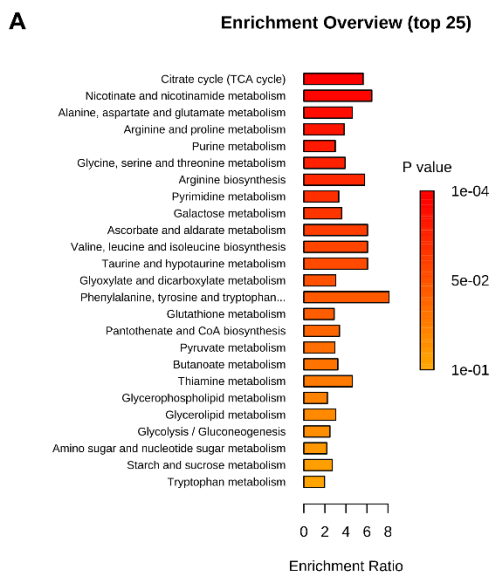


Figura S25. Comparación entre M1 y M2c activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2c.

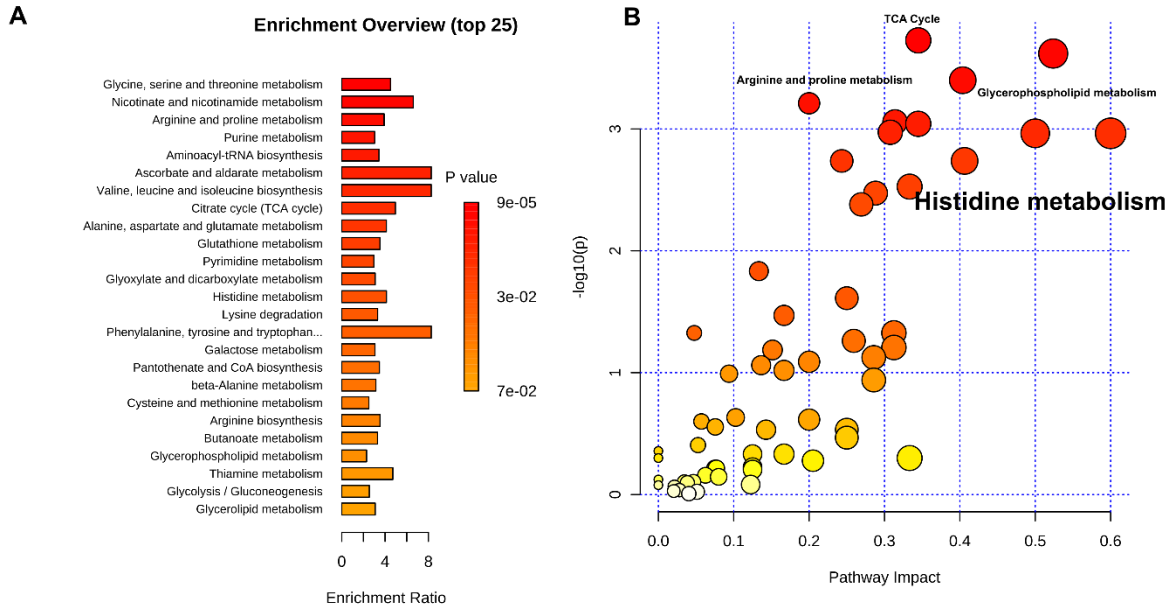


Figura S26. Comparación entre M1 y M2d activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2d.

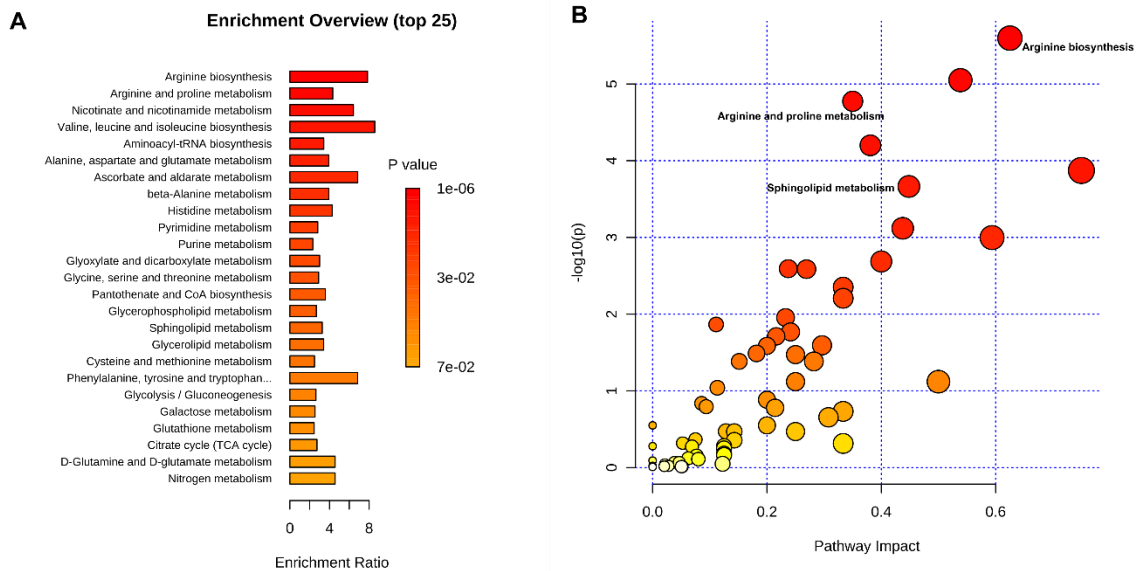


Figura S27. Comparación entre M2a y M2c activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2c.

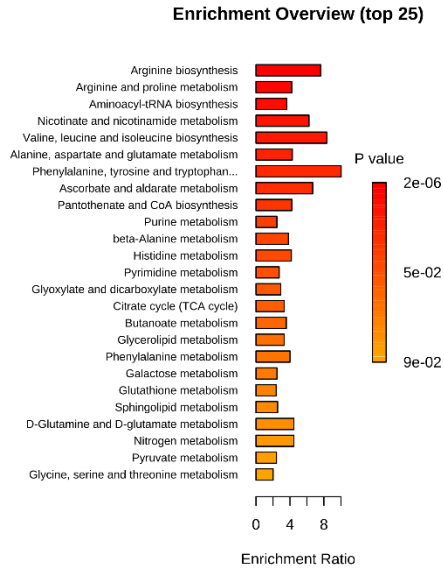
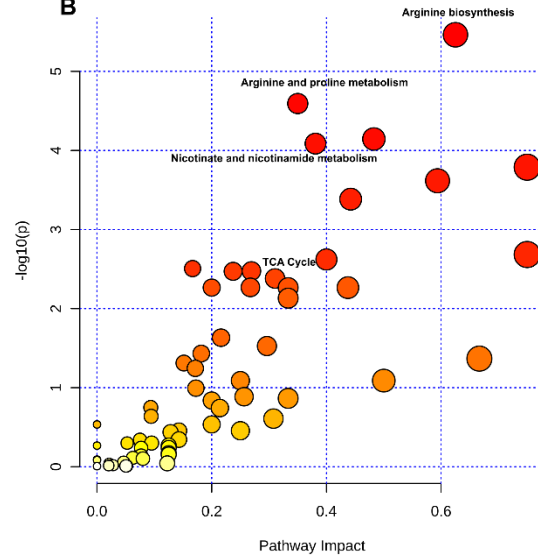
**A****B**

Figura S 28. Comparación entre M2a y M2d activan distintas vías metabólicas. Se utilizaron aquellos metabolitos cuyo fold change sea mayor a 2, (A) Análisis de enriquecimiento y (B) topología de la vía metabólica de M2d.





# Transcriptional and Microenvironmental Landscape of Macrophage Transition in Cancer: A Boolean Analysis

Ugo Avila-Ponce de León<sup>1,2</sup>, Aaron Vázquez-Jimeñez<sup>2</sup>, Meztli Matadamas-Guzman<sup>2,3</sup>, Rosana Pelayo<sup>4</sup> and Osbaldo Resendis-Antonio<sup>2,5\*</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Federica Eduati,  
Eindhoven University of Technology,  
Netherlands

### Reviewed by:

Keehoon Jung,  
Seoul National University,  
South Korea  
Sang-Jun Ha,  
Yonsei University, South Korea  
Tamas Helikar,  
University of Nebraska-Lincoln,  
United States

### \*Correspondence:

Osbaldo Resendis-Antonio  
oresendis@inmegen.gob.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular Innate Immunity,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

Received: 16 December 2020

Accepted: 17 May 2021

Published: 10 June 2021

### Citation:

Avila-Ponce de León U,  
Vázquez-Jimeñez A,  
Matadamas-Guzman M, Pelayo R  
and Resendis-Antonio O (2021)  
Transcriptional and  
Microenvironmental Landscape  
of Macrophage Transition in  
Cancer: A Boolean Analysis.  
*Front. Immunol.* 12:642842.  
doi: 10.3389/fimmu.2021.642842

<sup>1</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México,

<sup>2</sup> Human Systems Biology Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Ciudad de México, México,

<sup>3</sup> Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México,

<sup>4</sup> Oncoimmunology Laboratory, Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, México, <sup>5</sup> Coordinación de la Investigación Científica - Red de Apoyo a la Investigación, UNAM, Ciudad de México, México

The balance between pro- and anti-inflammatory immune system responses is crucial to face and counteract complex diseases such as cancer. Macrophages are an essential population that contributes to this balance in collusion with the local tumor microenvironment. Cancer cells evade the attack of macrophages by liberating cytokines and enhancing the transition to the M2 phenotype with pro-tumoral functions. Despite this pernicious effect on immune systems, the M1 phenotype still exists in the environment and can eliminate tumor cells by liberating cytokines that recruit and activate the cytotoxic actions of TH1 effector cells. Here, we used a Boolean modeling approach to understand how the tumor microenvironment shapes macrophage behavior to enhance pro-tumoral functions. Our network reconstruction integrates experimental data and public information that let us study the polarization from monocytes to M1, M2a, M2b, M2c, and M2d subphenotypes. To analyze the dynamics of our model, we modeled macrophage polarization in different conditions and perturbations. Notably, our study identified new hybrid cell populations, undescribed before. Based on the *in vivo* macrophage behavior, we explained the hybrid macrophages' role in the tumor microenvironment. The *in silico* model allowed us to postulate transcriptional factors that maintain the balance between macrophages with anti- and pro-tumoral functions. In our pursuit to maintain the balance of macrophage phenotypes to eliminate malignant tumor cells, we emulated a theoretical genetically modified macrophage by modifying the activation of NFκB and a loss of function in HIF1-α and discussed their phenotype implications. Overall, our theoretical approach is as a guide to design new experiments for unraveling the principles of the dual host-protective or -harmful antagonistic roles of transitional macrophages in tumor immunoeediting and cancer cell fate decisions.

Keywords: macrophage, phenotype, boolean models, systems immunology, gene regulatory network, cancer immunology

## INTRODUCTION

Macrophages are essential cells in inflammatory responses and immune regulation. However, these cells have heterogeneous functions depending on their polarization. Despite the importance of the process, only the M1 and M2 phenotypes have been experimentally characterized (1, 2). Nevertheless, there are macrophages with intermediate functional phenotypes or hybrid stages that have not been fully described yet. M1, M2, and some hybrid states have specific gene expression and secretion profiles, depending on the microenvironment signals (3). For instance, M1 macrophages express NF $\kappa$ B or STAT1 and secrete TNF- $\alpha$  and IL-12, correlated with a pro-inflammatory response. On the contrary, the M2 macrophages are correlated with an anti-inflammatory response, but their expression profiles are subject to the hybrid stages. As far as we know M2 macrophages have 4 hybrid stages, called M2a, M2b, M2c, and M2d (4). M2a macrophages express STAT6 and secrete IL-10, TGF- $\beta$ , and IL-1RA, associated with pro-fibrotic functions and inhibition of Th1, and a Th2 response (5). M2b macrophages express Erk and AP-1, and secrete IL-10, TNF- $\alpha$ , and IL-1, correlated with immune regulation (6). M2c macrophages express STAT3 and secrete IL-10 and TGF- $\beta$ , involved in tissue repair, matrix remodeling, and immunosuppressive behavior (7). Finally, M2d macrophages express HIF1- $\alpha$  or a defective NF $\kappa$ B, enhance STAT1, and induce the secretion of IL-10, TGF- $\beta$ , and VEGF. M2d is associated with tumors, enhancing the angiogenic process, metastasis, tumor growth, and regulating the immune system (8–10). In principle, hybrid stages in macrophage polarization depend on the microenvironment signals, such as cytokines, membrane receptors, and transcription factors, to determine their specific function and cell fate. However, macrophage hybrid states can transit from one to another depending on the stimuli. M1 macrophages can polarize reversibly into M2a, M2c, and M2d, while M2c can polarize reversibly into M2a (8–11). Moreover, the microenvironment signals can be secreted by other cells within the tissue or by the macrophages themselves (12). Despite the previous characterization, theoretically it has been proposed a continuum transition between the mentioned phenotypes (13). Therefore, integrating the signaling responses and molecular mechanisms involved in the macrophage polarization is required to untangle the complexity of the transitions between the different phenotypes.

As stated above, macrophages respond to tumor microenvironment stimuli in a coordinated and regulated manner. At the molecular level, transcription factors regulate the expression of other transcription factors or mRNA molecules inducing a change in the behavior based on the stimuli. These interactions can be summarized in a gene regulatory network where we can analyze their dynamic properties through mathematical models (14). Given that gene regulatory networks contemplate a large number of variables and the interactions among them, modeling their behavior using a continuous approach would be difficult due to the lack of kinetic parameters. However, gene regulatory networks represent variables as nodes and the interactions between them as edges, making a discrete approach suitable because it requires

few parameters. A common approach is the Boolean modeling. This mathematical approach is, where we numerically represent the state of the nodes as 0 (OFF) or 1 (ON). The OFF state means that a transcription factor or molecule is below a certain threshold, meaning it is inactive, while ON indicates an active molecule. The activation and inactivation rules for each node are called Boolean functions. These rules, indicate how each node is activated or inhibited are obtained from experimental evidence and mathematically represented through logical operators: AND (stated as: &), OR (stated as: |), and NOT (stated as:  $\neg$ ), obtained based on the experimental evidence on how each node is activated or inhibited. The system is solved *via* a synchronous or asynchronous update where we transform a static gene regulatory network into a dynamic one. By applying a synchronous all Boolean functions are updated simultaneously, and they will eventually arrive at a steady state, called an attractor. An attractor is a point where a group of states will converge to that point and they cannot leave this state until a perturbation occurs (15, 16). The biological interpretation of an attractor is a certain cell type or function defined by a gene pattern, it can be related to one or more subtypes of phenotypes and a phenotype can be associated with one or more attractors. This approach has been used to successfully model biological systems (17, 18), and study the cell fate decisions of the adaptive immune response by their specific signals (19, 20). Notably, this approach validated the continuum hypothesis of polarization states by integrating a network of external cytokine signals (21, 22). Although valuable endeavors have recovered and model some of the macrophage phenotypes (M1, M2a, M2b, and M2c) (21, 22). However, there is a lack of information about other phenotypes and their functionalities. We propose a new model capable of recreating the macrophage phenotype diversity considering relevant experimental evidence to fulfill this gap.

In this paper, we present a Boolean dynamical analysis over an updated signaling regulatory network of macrophages to assess the polarization of intermediate phenotypes immersed in the tumor microenvironment. Our Boolean model predicted known macrophage phenotypes, plus hybrid intermediate phenotypes with mixed physiological functions associated with tumor eradication, tissue repair, and progression of tumor cells. Then, we proceeded with an in-depth analysis of the functional properties of the hybrid states. Analyzing the stability of the new hybrid states. As a result, we acknowledge the importance of STAT1, NF $\kappa$ B for the M1 phenotype and HIF1- $\alpha$  for the M2 phenotype. We also proposed a theoretical approach of macrophage immunotherapy in an *in silico* breast cancer microenvironment, which showed promising results in a specific microenvironment towards a better prognosis for cancer eradication. Overall, this work represents a systems biology framework capable of characterizing known macrophage phenotypes and suggesting new hybrid cell populations. Also, it explores the typified macrophages functionality in a tumor microenvironment as well as their robustness and properties. Moreover, our model serves as a computational platform to explore how the tumor microenvironment can potentially modulate macrophages-cancer interaction.

## MATERIAL AND METHODS

### Mathematical Modeling of Network Phenotypes Through Discrete Variables

To explore the feasible space of phenotypes associated with our signaling network, we applied a Boolean approach. Briefly, Boolean approaches assume that each node in the network can be in one of two states (0 or 1), and their dynamic behavior is entirely governed by a Boolean function, which is defined by their regulation. Under this situation, the dynamic state of the  $i$ -esime node at time  $t$  is given by

$$x_i(t+1) = f_i(x_{i1}(t), x_{i2}(t), \dots, x_{iki}(t))$$

Where  $x_i$  can take the values 0 or 1, and  $f_i$  represents the Boolean function of the  $i$ -esime node in the network. Note that every node has a Boolean function which determine how that specific node respond to the change of the neighbor regulators (here indicated by the arguments of  $f_i$ ). Also,  $f_i$  maps a Boolean state including multiple Boolean variables at time  $t$  into a new Boolean state. After one unit of time, the dynamic behavior of the network is obtained when we simultaneously apply the transition function  $f_i$  over all the nodes. Starting from the  $2^N$  initial states, the Boolean transition functions will allow the network to reach a finite set of states that could cycle between them in a fixed state. These recurrent states are called attractors: if the dynamics reaches a state and stays there, they are called simple attractors, but if they move irregularly in a set of states, they are called complex or loose attractors. All the set of initial states whose transition function guide to the same attractors will form the basin of attraction. The attractors are of great importance because they represent the long-term behavior of the Boolean model and are potentially associated with phenotypes in the system of study (20, 23).

### Analysis and Simulation of the Attractors of Our Boolean Model

A gene regulatory network is a dynamic system. We obtained all of the attractors using the exhaustive search algorithm evaluating the space of  $2^n$  (where  $n$  is the number of nodes) initial conditions. So we evaluated 536,870,912 initial conditions using BoolNet Library from R software (24). The obtained attractors carried important biological implications and were associated with macrophage phenotypes. Each attractor was labeled based on experimental evidence. The labeling was done with a function of R package BoolNetPerturb, located at <https://github.com/mar-esther23/boolnet-perturb-0.1>. To compare the differences between the obtained attractors we reduced the dimension of our variables to plot them in a 2D-space using the t-SNE function in R. Once we had our plot, we clustered them to find similarities between the attractors. To determine the optimal number of clusters, we develop rules based on each possible group value's associated error, varying from 10 to 30. Finally, the clusters were named based on the functions carried out by the phenotypes of macrophages in each cluster. The model is available in a txt file and an SBML file for it could be easily reproduced. Our Code, data, and implemented analysis

can be accessed at: <https://github.com/resendislab/M1-M2-Macrophage-Polarization>.

### Mutation Analysis

Mutation analysis was divided into two sections: gene deletion and activation. The number of initial conditions for each perturbation is  $2^{n-1}$  where  $n-1$  is the number of nodes minus the perturbed, so for every perturbation we evaluated 268,435,456 initial conditions. We permanently set the state of the node as 0 for gene deletion and simulated the dynamics until it reached an attractor. Conversely, gene activation was accomplished by permanently fixing as 1 the state of one node in the network along with all units of time. These considerations were used to mimic the experimental condition of knock-outs or overexpression, respectively. By making this approach, we evaluated the robustness of a given macrophage subtype to resist a gene deletion or activation and how it affects its molecular activation pattern.

In the case of the cell fate map of macrophage polarization, we randomly changed the values of each attractor's nodes by a single bit flip. Then we evaluated which nodes changed a given macrophage phenotype into another given phenotype; this perturbation will determine the one-state neighbors.

### Robustness Analysis of Our Model

To validate the robustness of our model, we calculated the Derrida curve and developed the sensitivity analysis of the update rules. A Derrida curve allowed us to evaluate if a gene regulatory network is chaotic, ordered or critical. If the differences between the initial states diverge rapidly from the degrees diagonal, the network is chaotic. To obtain the Derrida curve we proceeded as follows. First, we sampled a random pair of initial states  $X1(t)$  and  $X2(t)$  at the same known time  $t$ . Once we have these states, we calculated the normalized Hamming distance  $h(t)$  which is the number of bits that differ from the two initial states divided by the number of nodes  $N$ . Then, we initialize in time the Boolean network and let both initial states evolve to their next states  $X1(t+1)$  and  $X2(t+1)$ , we calculated the normalized hamming distance denoted as  $h(t+1)$  run the dynamic. We repeated the previous steps for 10 000 random pairs and calculated the average behavior over the realizations. We plotted the value of  $h(t)$  in the x-axis and the y-axis the value of  $h(t+1)$ , as well we plotted the diagonal where  $h(t)=h(t+1)$  which means that the successor states and the initial states are the same. The Derrida curve was calculated with the R package BoolNetPerturb, located at <https://github.com/mar-esther23/boolnet-perturb-0.1>.

Complementary, the sensitivity analysis showed the differences on the results depending on alterations on each component, either turning on or off respectively. First, we created 50 000 randomly chosen states for each Boolean function define as  $f(ki)$  where  $ki$  is the different variables and  $i$  iterates from 1 to 29. Then, for each of these 50,000 initial states, we created a mutation randomly with only one-bit flip (Hamming distance of 1) labeled as  $f(ki')$ . Finally, we applied the update rule for  $ki$  and  $ki'$ , and we calculated the sensitivity of the update rule as the fraction of initial states where  $f(ki) \neq f(ki')$ .

The sensitivity analysis was carried out using the package of BoolNet in R.

## RESULTS

### Network Reconstruction and Boolean Analysis: The Molecular Basis of Macrophage Polarization in a Tumor Microenvironment

The tumor microenvironment contains several cell types, such as cancer cells, immune cells, and mesenchymal cells. These cells produce cytokines that attract other monocytes to the tumor as a natural immune response in the host. The interplay between tumor microenvironment interactions and macrophage functions must be taken into account to understand part of the inflammatory process involved in the interaction between macrophages and cancer. To this end, we reconstructed a signaling network that comprises a variety of regulatory elements associated with macrophage differentiation. We set up our interaction network of the macrophage polarization by a literature search of interactions between external components and how this affects the activation or inhibition of transcriptional factors associated with macrophage polarization. This approach is called a bottom-up methodology. The original reconstruction included 40 nodes. Then, we excluded all those nodes with less than two interactions (in and out) to analyze the dynamic behavior of the network. We did it because these nodes do not contribute information to the dynamic analysis. Therefore, we did the dynamic Boolean analysis onto a network of 29 nodes and 60 interactions. Overall, our transcriptional regulatory network (TRN), integrates extracellular-intracellular components, signal transduction cascades, and transcriptional regulatory mechanisms. This regulatory network of macrophage polarization had two parts,

the extracellular components (green nodes) and the master transcriptional factors (blue nodes) that regulate macrophage polarization (Figure 1 and Table S1).

Among the signaling cascades included in our reconstruction, we included the following interactions: Cancer dying cells produce HMGB1 activating Toll-like receptor 4 (TLR4), consequently activating NFκB (25). Briefly, these signals initiate the anti-tumor response in macrophages. However, the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) also triggers NFκB through JAK2 and STAT5. Besides, interferon triggers STAT1, so the cell releases cytokines to inhibit tumor growth (26). On the other side, we also described different activation processes for the M2 sub phenotypes (M2a, M2b, M2c, and M2d). First, M2a activation depends on IL-4 and IL-13 and triggers STAT6 (27). At the same time, STAT6 inhibits STAT1 and NFκB through SOCS1 and KLF4, avoiding the M1 phenotype. M2b activation depends on the signals of AP1 or ERK. AP1 is activated by the presence of IL-1b, while ERK needs the binding to Fc receptors (6). Next, M2c activation relies on the presence of STAT3. IL-10, glucocorticoids, TGF-b, and adenosines trigger STAT3 (28). This cascade induces the secretion of IL-10 and the inactivation of NFκB. Finally, M2d activation hinges on IL-6 or HIF1-α, related to a hypoxic environment (29). This phenotype is present in solid tumors. This cascade induces the secretion of IL-10, VEGF, and other cytokines. Conversely, the activation of any M2 sub phenotypes culminates in the liberation of cytokines, such as IL-10, that enhance tumor growth. We also included interactions that described M2d phenotype, a tumor-associated-macrophage, and relevant inflammatory cytokines, such as TGF-b and TNF-a. We used this network to dynamically analyze the master regulators that drive the transition between several types of macrophage phenotypes. Hence, to unveil the effect of the tumor microenvironment in macrophage polarization, we performed a Boolean analysis over a reconstructed transcriptional regulatory

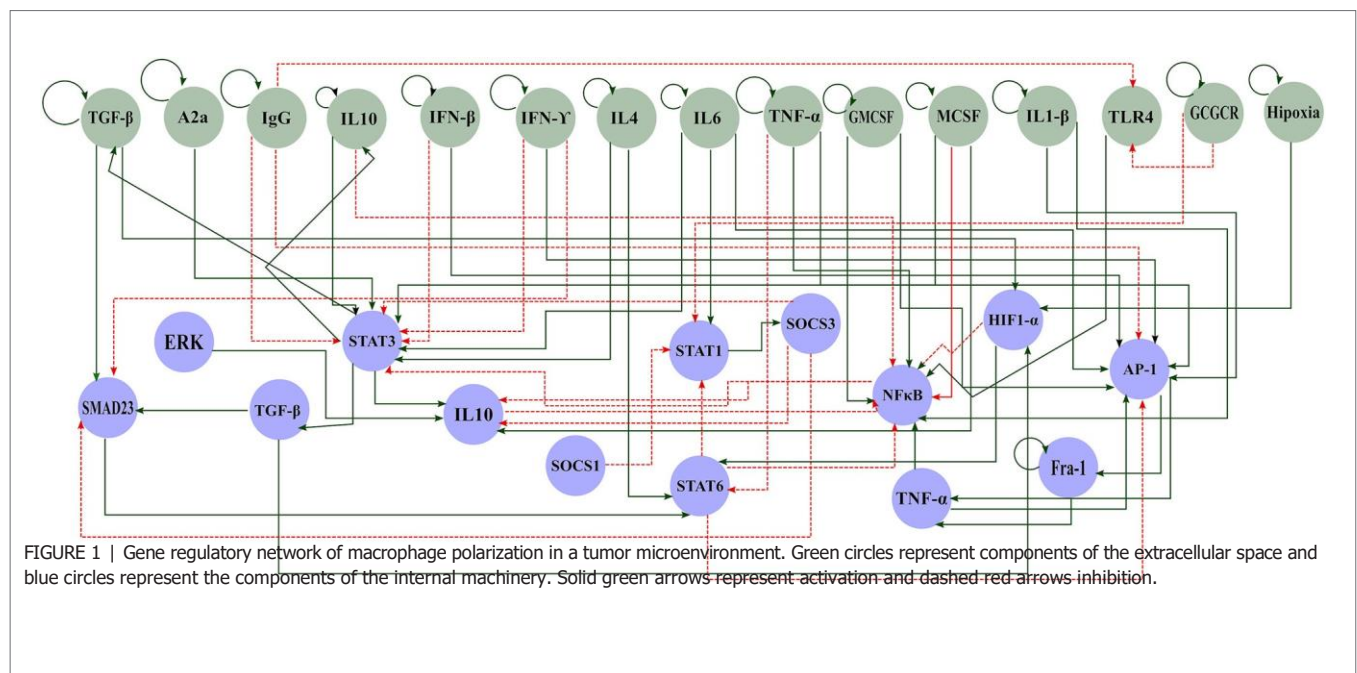


FIGURE 1 | Gene regulatory network of macrophage polarization in a tumor microenvironment. Green circles represent components of the extracellular space and blue circles represent the components of the internal machinery. Solid green arrows represent activation and dashed red arrows inhibition.

network for macrophages (Table S1). Our network contains a monocyte-derived macrophage regulatory mechanism, as depicted (Figure 1). We assumed that all the receptors for the external stimuli were constitutive. This assumption allowed us to eliminate linear interactions and to reduce the size of our network without affecting the dynamic and topology.

### Boolean Modeling of the TRN and Its Spectrum of Macrophage Phenotypes

Based on our reconstructed signaling network, we determined the possible macrophage phenotypes existing in a tumoral

microenvironment. Our Boolean model had interconnected signaling pathways, and their dynamics with the external inputs eventually converged to stable states, called single attractors. An attractor is a set of activated or inactivated genes that are time-invariant and potentially represent a macrophage phenotype. We named each attractor based on *in vitro* experimental evidence; we considered six possible steady states associated with a specific macrophage phenotype (Table 1). Using a synchronous update, our TRN converged to an entire landscape of 10,430 attractors, where 56 were cyclic, and the remaining were simple attractors. The simple attractors represented 13 phenotypes. Among them, four are already experimentally described (M0, M1, M2b, and M2d). The nine remaining were hybrid phenotypes with two or three

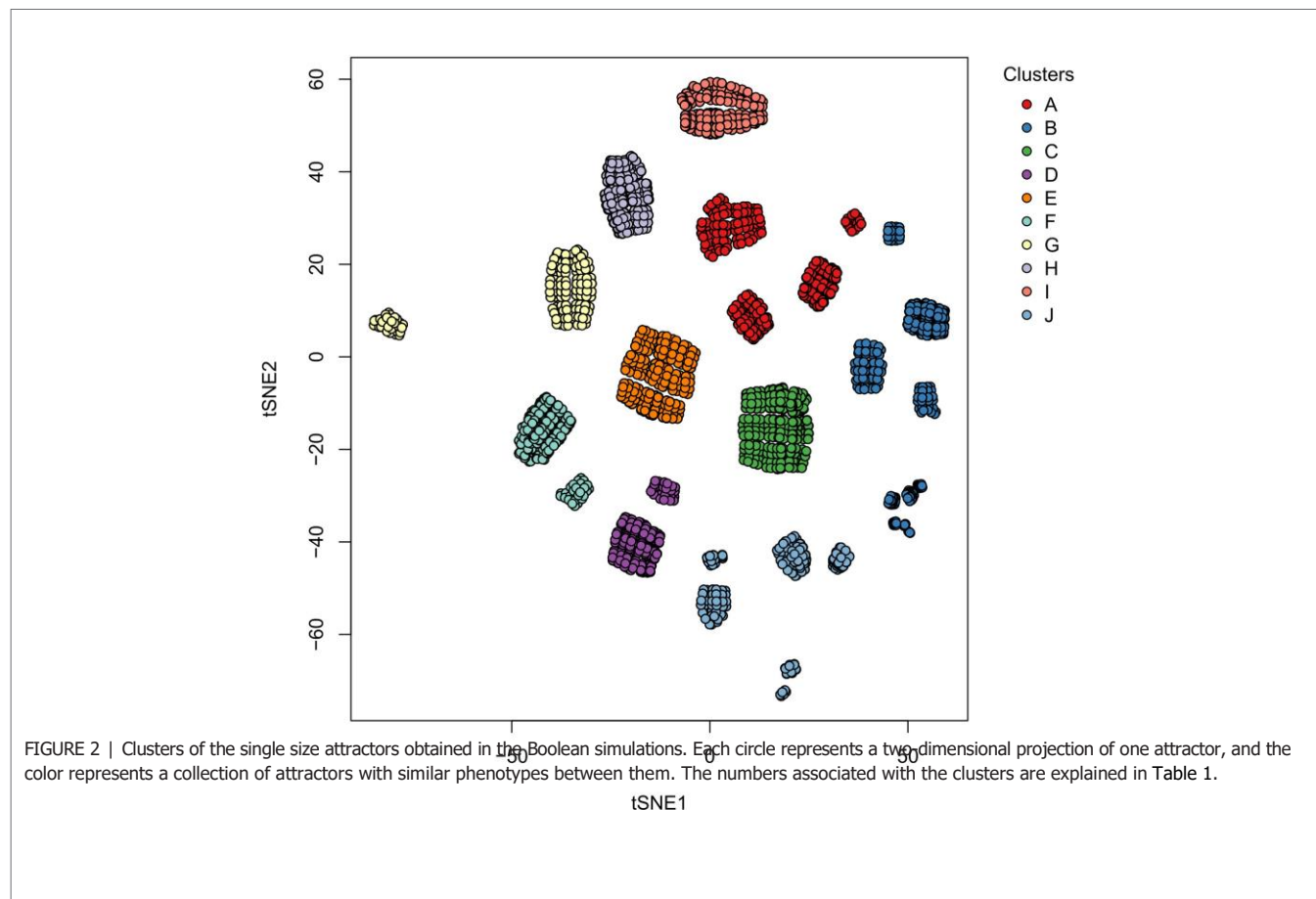
TABLE 1 | Macrophage phenotypes used to name each attractor.

Phenotype	Transcriptional Factors Activated/External components	Literature Revised
M0	None	
M1	Activation of NFkB, or STAT1, or TNFa and AP1	(26, 30)
M2a	Activation of STAT6	(28, 31)
M2b	Activation of AP1 or ERK	(12)
M2c	Activation of STAT3	(29)
M2d	Activation of TLR4 and A2a or HIF1A	(32)

The attractors obtained after the simulation were labeled based on the macrophage phenotypes reported in the literature.

macrophage phenotypes. To identify similarities among attractors, we made a bidimensional map using a distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) and a clustering analysis (Figure S1). Employing a 30 metrics consensus, we determined that the optimal cluster value was 10 (Figure S2). We obtained 10 clusters for 13 phenotypes (Figure 2), each one embedding more than one phenotype (Figure S3).

Among all the phenotypes, seven correlated with a pro-tumoral response and five with an anti-tumoral response. The tumor microenvironment enhances macrophages polarization to



pro-tumoral phenotypes with the liberation of interleukins and chemokines. In return, macrophages release growth and immune regulatory factors allowing proliferation and progression of cancer cells. Notwithstanding, in a tumor microenvironment, there are macrophage phenotypes with anti-tumor activity, balancing the elimination of tumor cells without affecting the surrounding tissues.

Due to the massive amounts of stimuli in a tumor microenvironment, we hypothesized that many hybrid activation states exist. We handled macrophage hybrid phenotypes as a single cell identity rather than a heterogeneous population, as in previous works (32). We suggested that a hybrid will be phenotypically distinguished by a combination of expression markers associated with pure M1 and M2 phenotypes. For instance, cluster A contained two-hybrid (mixed macrophage behavior) phenotypes M2bM2d and M2aM2d, macrophages associated with wound healing and regulatory behavior. Based on their composition, we concluded that this cluster was beneficial for tumor growth due to the liberation of growth factors maintaining tumor proliferation and regulatory cytokines to maintain the immune system. On the other hand, clusters B and I consisted of macrophages that would eliminate tumor cells due to the presence of M1, which liberate cytotoxic cytokines to the microenvironment (30). Clusters C and D behavior was complex due to the heterogeneous phenotype composition. Cluster F was a wound-healing and regulatory macrophage due to a hybrid phenotype labeled as M2aM2b (Table 2). According to our results, a good scenario against cancer is given by a macrophage state the increases tumor clearance role, by releasing tumor cytotoxic factors, and diminishing the levels of components associated with pro-tumoral behavior.

### Loss and Gain Function Alteration Dictates the Macrophages Subtypes

In this section, we computationally assessed the importance of each node in the stability of the phenotypes obtained. For this purpose, we performed a permanent deletion (set the value of the node to zero) or activation (set the value of the node to one) of each node in the dynamic analysis of the TRN. To quantify the

effect produced by these perturbations, we applied the following equation:

$$\log \frac{M \pm i}{WT_i}$$

where  $WT_i$  denotes the size of the basin of attraction for the “i” attractor without alterations, and  $M \pm i$  denotes the basin of attraction for the “i” attractor for the deletion(-) and activating (+) of the node. As expected, the previous equation is constrained to those cases where  $WT_i \neq 0$  and both variables are positively defined. The size of the basin of attraction for WT is depicted in Figure S4. Figure 3 shows the log-fold of the size of the basin of attraction when we compared perturbed and unperturbed (WT) genes stated by columns. Gray areas indicate attractors that were in the wild-type but not in the perturbed state. Attractors with an M1 macrophage will be an anti-tumoral phenotype, and with the M2 macrophage, a pro-tumoral phenotype (rows). Each column is an activation or inactivation of a transcription factor.

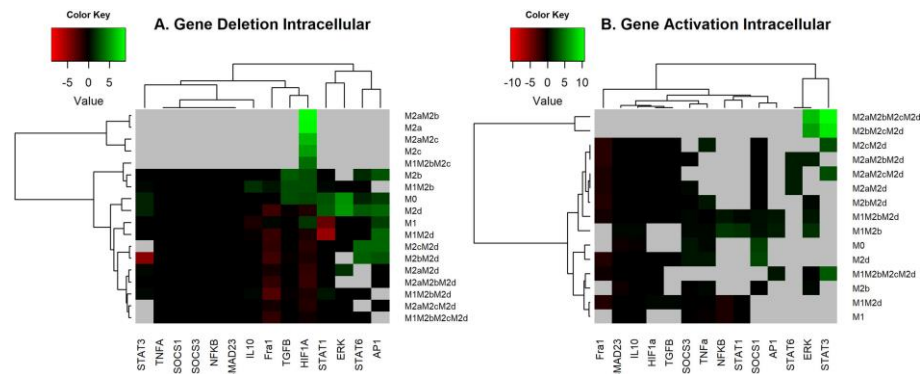
In terms of the results, we observed that permanent activation

of AP-1, STAT1, or NFkB was very similar because they induce hybrids with tumoricidal capacity (M1). AP-1 and STAT1 activation decreased at 100% pro-tumoral phenotypes and 20% anti-tumoral phenotypes. These transcriptional factors may recover the balance towards a tumor eliminating scenario in the tumor microenvironment (gray areas Figures 3A and S5, S6 respectively). NFkB permanent activation maintained the same behavior as previous transcription factors because it diminished at a 100% pro-tumoral phenotype and 20% anti-tumoral phenotypes, creating a perfect balance of tumor elimination and recovery of the tissue due to the secretion of cytotoxic interleukins and interferons (gray areas in Figures 3A and S5, S6 respectively). On the other hand, constitutive expressions of HIF1-a or TGF-b eliminated pure M1 macrophages (Figure 3A) and decreased the available profiles that converged to hybrids with M1 as a component. HIF1-a and TGF-b promoted the development of malignant behavior in macrophages. Once activated, HIF1-a decreased 22% anti-tumoral phenotypes (Figure S6) and 40% pro-tumoral phenotypes (Figure S5). We concluded cells should avoid the

TABLE 2 | Macrophage phenotypes associated with each cluster.

Cluster	Phenotypes	Behavior
A	M2bM2d and M2aM2d	Regulatory/wound healing macrophage
B	M1 and M1M2d	Classical activated macrophages/Pro-tumoral macrophages
C	M1M2bM2d, M1M2bM2cM2d, M1M2b, M2d and M2M2d	Complex behavior. Mixed phenotypes associated with different functions
D	M0, M1M2bM2d, M2b, M2d and M2bM2d	Complex behavior. Mixed phenotypes associated with different functions
E	M1M2bM2d and M2aM2d	Classical activated macrophage/Pro-tumor
F	M2aM2b	Wound-healing macrophages
G	M2aM2cM2d and M2aM2bM2d	Regulatory/wound-healing macrophages
H	M2bM2d and M1M2bM2d	Regulatory/Pro-tumoral macrophages
I	M1 and M1M2d	Classical activated macrophages/Pro-tumoral macrophages
J	M2aM2d and M2aM2bM2d	Regulatory/Pro-tumoral macrophages

The phenotype behavior of each cluster was approximated by the criteria of classification used by (33). Description of the results obtained from the k-means clustering over the t-SNE 2D space.



**FIGURE 3 |** Heat Map of the overexpression and knock-out of transcriptional factors. (A) Heat Map of the overexpression of transcriptional factors of macrophage polarization. We maintained the expression of the node as 1, simulated, and reviewed the attractors obtained. All overexpression was compared with the wild-type (original network) with log2 fold change. (B) Heat Map of Knock-outs of transcriptional factors of macrophage polarization. The nodes were permanently fixed with a value of 0; the perturbations were realized one by one until the attractors were reached. We compared the phenotypes of the wild-type with the perturbations by a log-fold change. Green and red regions indicate those attractors whose size of the basin of attraction increased or decreased after the perturbation. In black, we denote those attractors with few effects in the basin attraction size versus WT and after perturbation. Gray areas indicate those attractors that exist in the wild-type but do not remain perturbed.

presence of HIF1-a in a tumor microenvironment. Also, TGF-b had the same behavior as HIF1-a (Figures S5, S6, respectively), so cells should avert its secretion to revert cancer proliferation. Nevertheless, we hypothesize that the modulation of the balance to anti-tumoral phenotypes could be sufficient to diminish TGF-b.

Conversely, constitutive expressions of Nfkb or STAT1 kept M1M2b and M1M2d phenotypes, respectively. Both hybrid phenotypes with well-known tumoricidal capacity. Interestingly, the overexpression of Nfkb and STAT1 could be a potential therapeutic strategy because they promote phenotypes that could balance the behavior of macrophages in a tumor microenvironment, favoring tumoricidal capacity (Figure 3A).

On the other hand, we found an imbalance in the size of the basin attractors when we knocked out some transcriptional factor expressions separately (Figure 3B). Our *in silico* analysis allowed us to conclude that if we knocked out the expression of Fra-1, the M1 and the hybrid M1M2b produced a slight augment in their size of the basin of attraction, implementing a tumoral eradication capacity. Also, we observed that the lack of Fra-1 did not influence the development of the M2d phenotype. Turning off HIF1-a increased phenotypes associated with tumoricidal capacity (M1 and M1M2b), denoting the importance of not expressing these transcriptional factors for eliminating tumor cells (Figure S7). However, only affecting HIF1-a activity is insufficient because it enhances pro-tumoral phenotypes at 36% for the wild type macrophage (Figures 3B and S8). Thus, we had a typical host defense by activating the gamma receptors and liberating IFN-g to the microenvironment. Notably, unlike gene activation analysis, we observed the emergence of some pure phenotypes, M2a, and M2c, tending to favor tumor progression when we knocked out HIF1-a.

Furthermore, we noted that knock-out of STAT3 decrease the proportion of phenotypes specific for tumor eradication and

hybrid with anti-tumoral behavior at 33% (Figure S7). Inactivating STAT3 diminished 63% of pro-tumoral phenotypes involved in the regulation of the immune system (M2c) by activating Nfkb (Figure S8). STAT6 knock-out does not affect anti-tumoral phenotypes (Figure S7), but it decreases the attraction basin of phenotypes. M2c phenotype releases IL-10 into the microenvironment creating a scenario for tumor evasion and enhancing tumor metastasis. In agreement with these findings, biological evidence suggests that the inactivation of STAT3 and STAT6 transcriptional factors are associated with reducing tumor growth and metastasis in a model of breast and lung cancer (31, 34).

## Macrophage Polarization Develops Feedback With Microenvironments

Tumor microenvironments shape the polarization of macrophages. To evaluate how the microenvironmental signals alter this process, we analyzed six different signaling environments associated with macrophage phenotypes: M0, M1, M2a, M2b, M2c, and M2d states. We simulated signaling microenvironments activating permanently known profiles of cytokines and signaling metabolites associated with each macrophage phenotype (see Table 3) (33, 35).

Figure 4 depicts the logarithm of the basin of attraction of the attractors obtained in said microenvironments. Gray areas indicate that the phenotype was not present in the specific microenvironment. Notwithstanding that the Boolean model is a simplified analysis, we highlight a global behavior over how the macrophage phenotype is shaped. For instance, the monocyte microenvironment (Pro-M0) tends to induce three phenotypes at a low rate: M0, M1, and M2d. Fra1 may give a possible explanation underlying the increment in the size of the basin of attraction for M2d. The upregulation of Fra1 ultimately activates Nfkb, which in turn will induce the M1 macrophage phenotype.

TABLE 3 | Microenvironments associated with specific macrophage subtypes.

Macrophage Phenotype	Signals
M0	No external stimuli
M1	IFN-g and IFN-b
M2a	IL4 and TGF-b
M2b	IgG and glucocorticoids
M2c	IL10 and IL6 and MCSF
M2d	Adenosines and hypoxia and glucocorticoids

On the right side of the table, we have the phenotypes and the nodes that were kept on during the simulation until an attractor was reached.

Simulation of microenvironmental cues for the six macrophage phenotypes modeled in our gene regulatory network.

Furthermore, our computational analysis suggests that the Pro-M1 microenvironment diminishes regulatory and wound-healing phenotypes and enhances tumoricidal capacity (Figure 4). In counterpart, Pro-M2b microenvironment decreases tumoricidal capacity, favoring macrophages phenotype to tumor progression and immune regulation. This microenvironment only induces phenotypes either hybrid or simple associated with M2b. On the other hand, M2c microenvironments maintain hybrid phenotypes associated with tumor proliferation and wound-healing components, like angiogenesis. Besides, we noted that the regulatory cytokines like IL-10 and IL-6 in the microenvironment Pro-M2c diminished all possible cytotoxic hybrid activity in macrophages. This finding can explain cytotoxic activity in a pro-tumor microenvironment (36). However, the M2 population was preferred over M1 because they had specific microenvironment components (Pro-M2c) to maintain this imbalance (Figure 4). Furthermore, the M2d microenvironment does not generate any macrophage associated with tumoricidal capacity; it only activates

macrophages implicated in wound-healing (angiogenesis and tissue recovery) and phenotypes regulating the actions of the immune system in eliminating tumors.

Lastly, macrophage phenotypes were susceptible to local microenvironments inside a tumor. These microenvironments can induce heterogeneity over the composition enhancing specific subtypes of macrophages. We believe that these phenotypes will increase their stability due to the continuum expression of their external signal. However, anti-tumoral behavior occurs even in the activation of pro-tumoral behavior by external signals but with lower stability. This type of modeling scheme may help develop therapeutic strategies to ensure stability despite the microenvironment acting against the treatment of a specific cancer type (37, 38).

### The Importance of Molecular Components in Determining Cell Fate Macrophages

We analyzed each attractor's stability previously obtained through a gene perturbation analysis to evaluate the plasticity, closeness, and possible transition between the macrophage subtypes. As shown previously, these sets of analyses are beneficial to describe and uncover the network's global properties. We obtained a global landscape of the possible transitions among them (Figure 5). To accomplish this, we altered each node's state in the network. If the value of the node was 1, we changed to 0 and vice versa. Then we evaluated if this modification affected the stability of the phenotype in the network. Notably, we observed that only some transitions were allowed among attractors; besides, these transitions depended on different genetic alterations. As expected, phenotypes with the

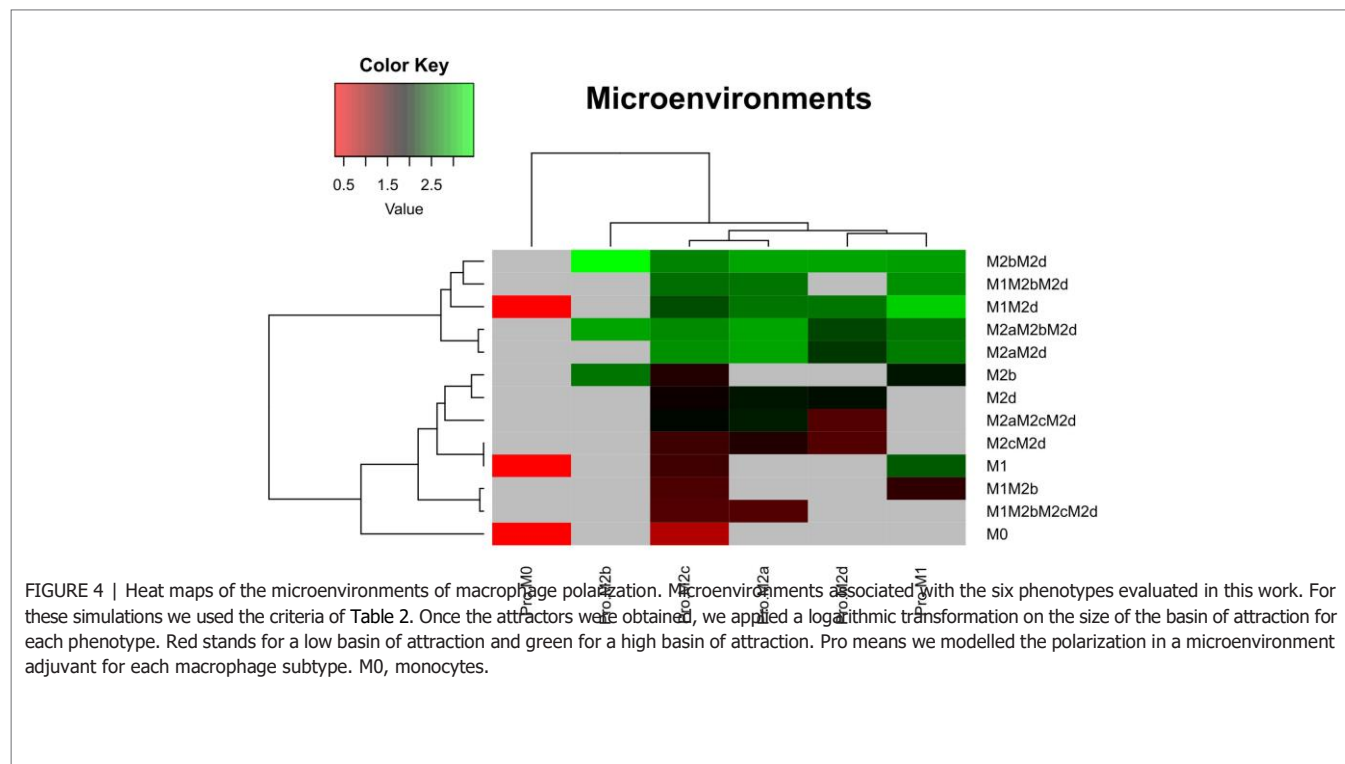


FIGURE 4 | Heat maps of the microenvironments of macrophage polarization. Microenvironments associated with the six phenotypes evaluated in this work. For these simulations we used the criteria of Table 2. Once the attractors were obtained, we applied a logarithmic transformation on the size of the basin of attraction for each phenotype. Red stands for a low basin of attraction and green for a high basin of attraction. Pro means we modelled the polarization in a microenvironment adjuvant for each macrophage subtype. M0, monocytes.



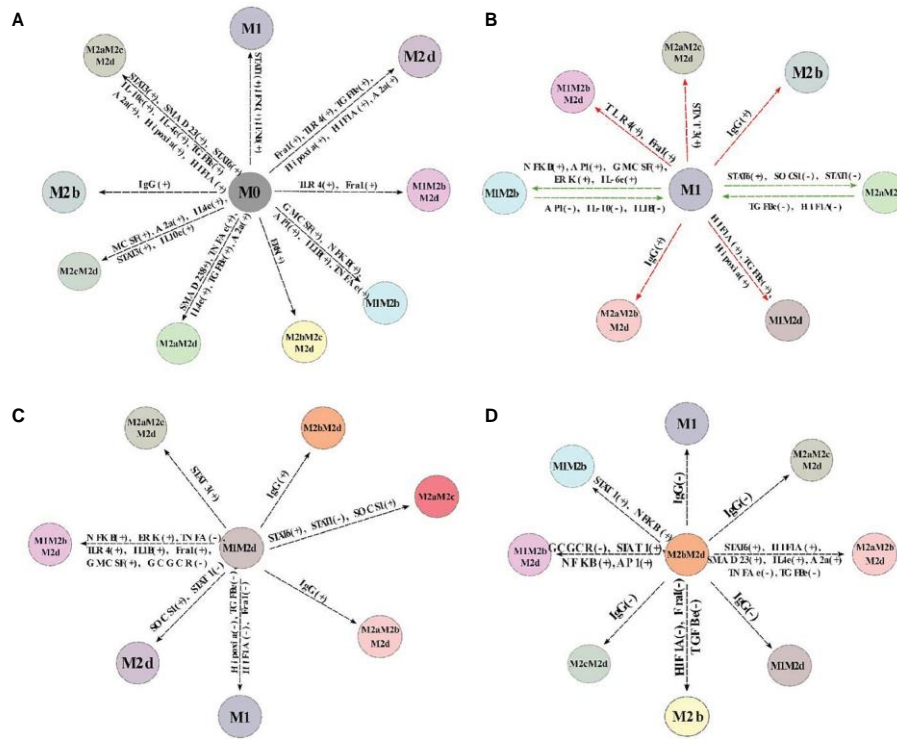


FIGURE 5 | Cell fate map of the macrophage polarization. Of all the attractors obtained, we changed the node's value and maintained this perturbation until an attractor was reached. If the attractor's transition to another phenotype, we represent it with a line and the new phenotype obtained by the perturbation. Plus sign (+) means the node was turned off, and we turn it on, while minus sign (-) means the perturbation was on, and we turned off. (A) Cell fate map of monocyte (M0). (B) Cell fate map of M1 macrophage. (C) Cell fate map of M1M2d macrophage. (D) Cell fate map of M2bM2d macrophage. Colors represent different states of macrophage polarization.

largest basin of attraction were more stable to perturbations (Figure S4). This study allowed us to conclude that M0 (monocyte) had a low stability, and it was prone to become other macrophage phenotypes under perturbations (Figure 5A). For example, M1 can differentiate from M0 through the activation of STAT1, IFN-g, or IFN-b, but M1 can re-polarize to M0 (monocyte) activating the inhibitory function of SOCS1. These polarizations were irreversible, which means once they shift to the new phenotype, they cannot shift back to monocytes (Figure S9).

On the other hand, M2b transitioned from M0 by activating immunoglobulin G (IgG). B cells liberate IgG and can be cancer- derived (39, 40), so the M2b phenotype can be induced directly from monocytes and not necessarily has to pass first from a TLR4 activated macrophage and then shift to M2b (7). The transition from M0 to M2d was obtained by activating HIF1a or TGF-b or adenosines leading to the inactivation of any transcriptional factor of cytotoxic behavior; this transition was reversible (Figure S9). Notably, our simulations allowed us to postulate that the more complex phenotypes, the hybrids, can be obtained from M0. For instance, the tumoricidal/regulatory macrophage given by M1M2b obtained by activating AP1, NFkB, and IL1-b, had an, irreversible transition.

Another interesting observation is that the cytotoxic macrophage named M1 was stable for most perturbations (Figure 5B). For example, when we turn on AP1, the M1 phenotype becomes a hybrid phenotype (M1M2b) that maintains its cytotoxic capacity combined with a regulatory behavior. This shift is reversible macrophages can return to an M1 phenotype by inactivating AP1 (Figure S9). Furthermore, M2b attained from M1 by activating IgG, stating the importance of the immune complexes for selecting this trajectory. It does not need to be first a TLR4 activated macrophage to promote the transition to the M2b phenotype (7). Hybrid phenotype M1M2d (Figure 5C) can favor tumor clearance and recuperation of tissue. Based on our model, we observed this phenotype constrain the macrophage into a hypoxic condition, permanently activating TGF-b. The M1 phenotype can be obtained from M1M2d, turning off hypoxia or TGF-b, but both extracellular conditions are present most of the time in a tumor microenvironment. In this context, pursuing a hybrid phenotype with theoretical benefits such as M1M2d seems to be a better strategy than the induction of the M1 phenotype in a tumor microenvironment. We also observed that M1M2d, a tumoricidal/regulatory state, can shift to the M2d macrophage stage. This polarization is reached by turning on SOCS1

(inhibiting STAT1) or turning off STAT1 (M1 transcriptional factor). Notably, perturbation analysis suggests the emergence of a new phenotype from M1M2d; a hybrid labeled M2aM2c with an irreversible phenotype (Figure S9). M2aM2c has a regulatory/ pro-tumoral behavior favoring tumor growth and tumor evasion, and it is promoted by turning on STAT6 from M1M2d. M2bM2d has more stability compared with other phenotypes (Figure 5D). IgG is a crucial factor that dictates this phenotype's behavior, so turning off this node, the hybrid phenotype can shift irreversibly to various tumoricidal macrophage stages, like M1 (Figure S9). M2b phenotype derived from M2bM2d by turning off HIF1a and the expression of ERK, which permits the secretion of IL-6, a pleiotropic cytokine and immune regulator of IL-10. Finally, turning on STAT1 or NFkB was sufficient to transit to a tumoricidal/regulatory phenotype from M2bM2d, labeled as M1M2b.

Lastly, there is growing evidence that plasticity is a property in the immune system's response altogether, here we supplied evidence that the response of macrophages is not the exception. Even though macrophages polarize depending on external factors, they can be manipulated to influence the outcome of their external signals. This analysis allowed us to identify potential genetic control points like NFkB and HIF1a, which could serve as potential molecular targets against cancer by modifying the macrophage phenotypes.

## HIF1-a and NFkB as Potential Transcriptional Factors for a Theoretical Treatment Based Approach

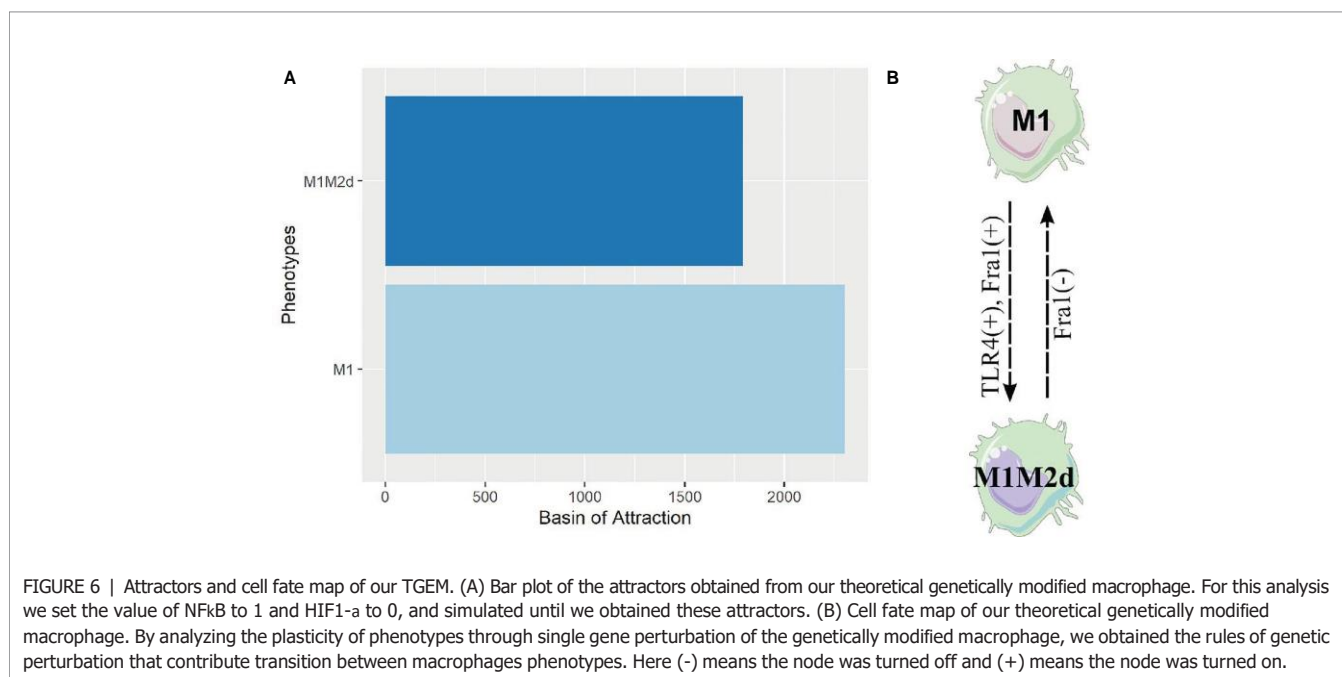
Despite tumor microenvironment complexity and variability, their modulation is an appealing strategy to reduce the cancer cell phenotype (41). For instance, in our model, the most relevant

activated transcription factors for the polarization to M1 phenotype and M1 hybrid are STAT1 and NFkB; these findings agree with a previous report (42). On the contrary, activation of HIF1-a is associated with the reduction of anti-tumoral macrophages by enhancing pro-tumoral macrophages. We concluded that the inactivation of HIF1-a and activation of NFkB or STAT1 might be critical to shift the balance to an anti-tumoral microenvironment rather than a pro-tumoral.

To verify these hypotheses, we designed two theoretical genetically modified macrophages (TGEM): HIF1-a =0 & NFkB =1 and HIF1-a =0 & STAT1 = 1. Dynamic analysis constrained by the inactivation of HIF1-a and activation of NFkB showed a significant reduction in the number of attractors, 4096, compared to the 10430 obtained initially. The HIF1-a =0 & STAT1 = 1 (STGEM) diminished the number of attractors (3840) distributed in four phenotypes (Figure S10). On the contrary, HIF1-a =0 & NFkB =1 had only two phenotypes (Figure 6A).

Interestingly, all the attractors belonged to two phenotypes, M1 and M1M2d hybrid. The M1M2d hybrid has a cytotoxic action, but the M2d counterpart diminishes the damage caused its cytotoxic function. M1 was the more stable due to its basin of attraction, while M1M2d was the least stable. We developed a cell fate map for our TGEM to acknowledge which genes can transit from one phenotype to another. Remarkably, we identified a reversible transition between M1 and M1M2d, mainly driven by Fra-1 and toll-like receptor 4 (TLR4) (Figure 6B). This means that our TGEM will cycle between these two phenotypes without developing new phenotypes; both are resistant to perturbations.

Our genetically modified macrophage with STAT1 activated (STGEM) developed four phenotypes. All of them had a hybrid state where the cytotoxic action was always present



(Figure S10A). M1M2b was the most stable phenotype, while M1M2d as well as the least stable. The cell fate map of STGEM is more complicated than TGEM. The transition from M1 to M1M2b marked by STAT3 and ERK activation. STAT3 and ERK are activated by common interleukins in a tumor microenvironment like IL-10, TNF- $\alpha$ , and IL1b. The rest of the map is depicted in Figure S10B, it showed that the four phenotypes cycle between them without any new phenotype. Based on this information, STGEM may be used as a strategy for eliminating tumor cells. Due to the nature and simplicity of the phenotypes obtained in TGEM, it can be an optimal option for an immunotherapeutic strategy to modulate the tumor microenvironment to eliminate tumor cells.

Finally, we concluded that our *in silico* TGEM (conceptually defined by the permanent activation and inactivation of NF $\kappa$ B and HIF1- $\alpha$ , respectively) induced phenotypes against cancer cells in the tumor microenvironment. We predicted balanced M1 characteristics that liberate all the components involved in the elimination phase of cancer immunosurveillance and the substances to resolve inflammation and tissue damage caused by cancer. Therefore, generating an M1/M2 ratio with a good prognosis. Furthermore, the phenotypes coming from our TGEM were robust, only certain transcription factors could redirect the polarization to another phenotype (Figure 6B).

## Theoretical Genetically Modified Macrophage Resisted Perturbations in a Breast Cancer Microenvironment

Given the experimental evidence and previous results of the intricate and determining relationship of the microenvironments in macrophage polarization, we developed an *in-silico* microenvironment based on experimental evidence. We decided to simulate the alterations in the microenvironment of our previous TGEM. Microenvironment alterations are associated with adverse prognosis in other studies (43). We defined the state (active or inactive) of all the extracellular nodes present at the cancer microenvironment using cancer multi-omics data (44). We calculated the differential expressed genes between breast cancer cells and healthy tissue to estimate which extracellular nodes are highly present and then fixed the state of all extracellular nodes in our network. In the particular case of components such as immunoglobulin G (39), adenosines (45), glucocorticoids (46), and under hypoxia (47). All these are activated (node state:one) due to previous reports supporting their activity in samples of patients with breast cancer. Overall, we simulated our theoretical genetically modified macrophage (TGEM) in four different simplified breast cancer microenvironments to evaluate its behavior and determine if this pharmaceutical approach could be suitable. Under this microenvironment, we analyzed the effect of IgG and A2a; IL10 and TGF- $\beta$ ; IL-1b and IL 6; Hypoxia and glucocorticoids.

First, we evaluated the behavior modification of our TGEM in specific breast cancer microenvironments according to previous conditions. The phenotypes obtained changed globally, we found two new phenotypes: M1M2b and M1M2bM2d. Both

phenotypes have the M1 function creating a cytotoxic/regulatory microenvironment (Figure 7A). The most complicated microenvironment (this microenvironment is implicated with metastasis) was the one with the presence of A2a and Ig G. We observed only two phenotypes: M1M2b and M1M2bM2d, while M1 and M1M2d were absent. This analysis suggested that IgG & A2a could inhibit functions of the M1 macrophage through the inactivation of TLR4 and consequently the activation of NF $\kappa$ B. A2a can inhibit NF $\kappa$ B as well; both components created a complicated microenvironment for the development of more M1 type macrophages.

Nevertheless, the phenotypes generated in this microenvironment can help eliminate tumor cells and balance the microenvironment to a more suitable one to create anti-tumoral macrophages. The remaining microenvironments develop four macrophage phenotypes (M1, M1M2b, M1M2bM2d, and M1M2d) with different proportions each. Therefore, we found a high proportion of pure M1 and M1 hybrid to shift the balance towards a tumor eliminating microenvironment, and having the regulatory components not cause more damage from the cytotoxic activity (Figure 7A).

In Figures 7B–E, we depict the cell fate map of our TGEM under the four breast cancer microenvironments evaluated. Overall, once STAT6, is activated, induce an irresistible into the phenotypes by adding the M2a components. Even though in the IgG & A2a environment, we did not have the M1 phenotypes, they can be irreversibly obtained by inhibiting the function of Erk in the M1M2b phenotypes. The M1M2b and M1M2bM2d phenotypes create feedback between them by activating Fra1 or TLR4 to transit from M1M2b to M1M2bM2d; this transition can be reversible by inhibiting the expression of Fra1. This complicated microenvironment in our TGEM may be an obstacle. However, from the phenotypes obtained and the one (M1) obtained, our TGEM may still eliminate tumor cells beside the microenvironment (Figure 7B).

In IL1b & IL6 microenvironment, M1 and M12b developed feedback between them where the transitions are reversible. This feedback may create a balance in the environment where the immune system can eliminate tumor cells and recuperate the damaged tissue caused by the cytotoxic functions (Figure 7C). Under hypoxic conditions (Figure 7D), our TGEM still develops macrophages with the capacity to eliminate tumor cells. The lack of oxygen does not affect the feedback between M1-M1M2b and M1M2d-M1M2bM2d. In this hypoxic microenvironment, the activation of STAT6 may serve as an adaptation agent. STAT6 is associated with the regulation of the lipid metabolism, our macrophages can obtain energy from lipids to liberate cytotoxic interleukins and eliminate tumor cells. From a theoretical perspective, STAT6 activation in our TGEM in a hypoxic scenario is not one we want to avoid (48, 49). Finally, in Figure 7E, a microenvironment with regulatory activity in macrophage cytotoxic functions does not affect creating phenotypes to eliminate tumor cells. M1 and M1M2b develop the same feedback as the previous microenvironment. M1M2bM2d and M1M2d create feedback between them; therefore, the transitions are reversible.

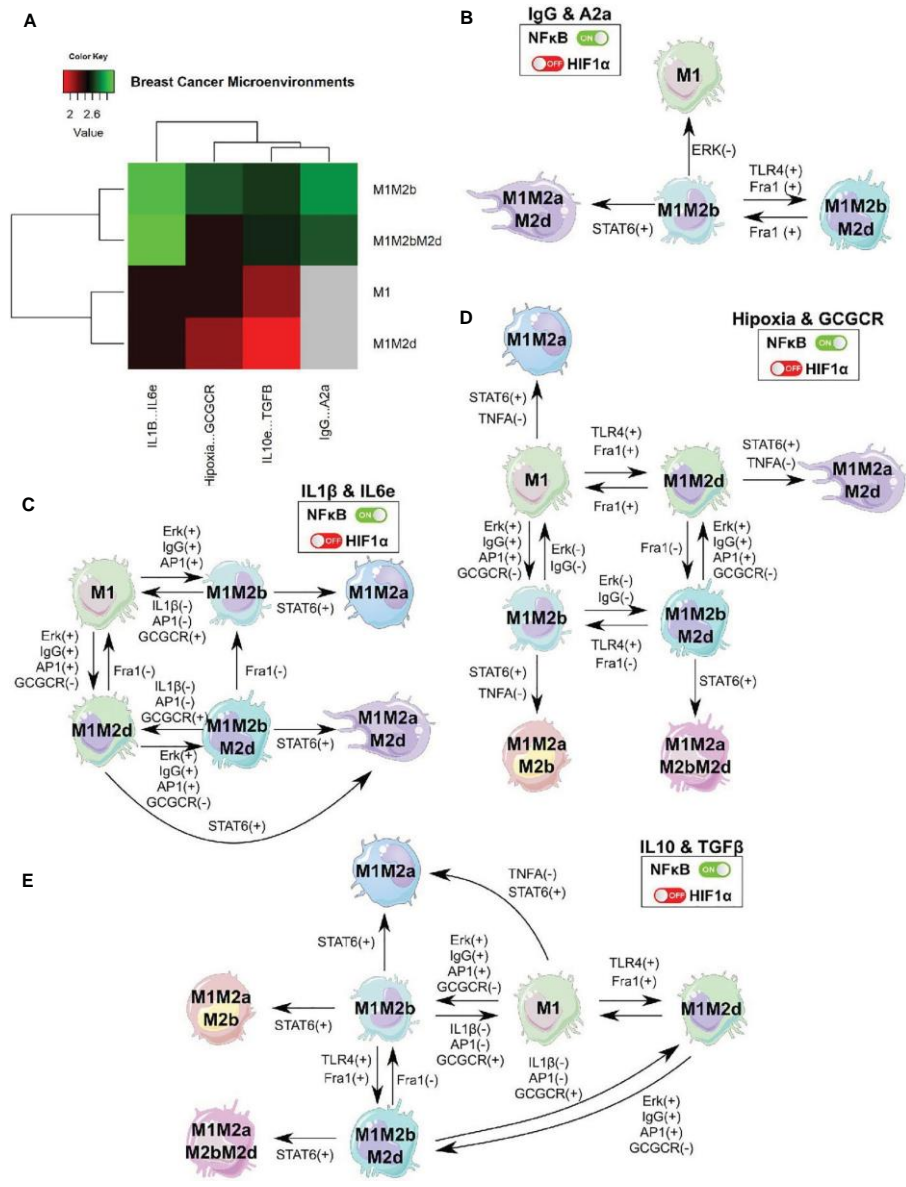


FIGURE 7 | TGM in a breast cancer microenvironment. (A) We engineered different microenvironments associated with breast cancer and evaluate how our TGM behaved. (B) Cell fate map of the theoretical genetically modified macrophage in breast cancer microenvironment for the expression of IgG and adenosines. (C) Cell fate map of the theoretical genetically modified macrophage in breast cancer microenvironment for the expression of IL1- $\beta$  and IL-6. (D) Cell fate map of the theoretical genetically modified macrophage in breast cancer microenvironment for the expression of Hypoxia and glucocorticoids (GCGCR). (E) Cell fate map of the theoretical genetically modified macrophage in breast cancer microenvironment for the expression of IL-10 and TGF- $\beta$ . This analysis was to evaluate the stability of our pharmaceutical approach in a breast cancer scenario.

In summary, the Boolean modeling of the TRN mimicking the feasible space of macrophage phenotypes serves as a platform to create hypotheses of the control mechanism that promotes cancer phenotype. We postulate that TGM associated with pro-inflammatory is a promising pharmaceutical approach because it is robust to permanent perturbation in a breast cancer microenvironment. This hypothesis has to be experimentally proven, an aim that constitutes a perspective of this paper.

### Robustness and Sensitivity Analysis of Our Transcriptional Regulatory Network of Macrophage Polarization in a Tumor Microenvironment

A robust gene regulatory network is resistant to perturbations in the network. We defined robustness as a characteristic of behavior invariance, according to changes in their inner variables. Nevertheless, gene regulatory networks or any

biological network representing the phenotypic behavior of cells have to gain an ability to respond appropriately to external stimuli and filter molecular perturbations.

A mathematical representation of a gene regulatory network can be dynamically classified as ordered, critical, or chaotic regime. Ordered networks are not affected by filter external stimuli. Critical networks are intermediate from an ordered and chaotic behaviors, they are resilient to a specific subset of perturbations. Finally, chaotic networks are severely affected by perturbations, inducing a plethora of responses (50). To evaluate the dynamical behavior of macrophage polarization in our TRN we obtained the Derrida curve, see Figure 8A. To determine in what extent the slope of the curve around  $x=0$  differ from identity line and thus classify the dynamic behavior of our network, we applied a chi-squared Goodness of fit test with the coordinates of the average Hamming values before the intersection point between both curves. We consider the observed values as those average Hamming distances depicted in the y-axis of the plot. Simultaneously, we considered the expected values as the average Hamming distances outlined in the identity line ( $y=x$ ). Despite our models seeming to draw a curve slightly above the identity line around  $x=0$ , our statistical test allowed us to conclude that there is no significant difference in the Hamming distance between the observed and the expected Hamming distances (exact multinomial test of goodness-of-fit,  $p$ -value=0.5804, statistical significance= 0.05). Given that there was not a statistical difference between expected and observed values, we supplied evidence that the dynamic behavior of our network falls into the critical region. There is evidence that criticality is a trademark for living systems for simultaneously co- exist in robustness and evolvability capacities (51, 52). This finding suggests that TRN for macrophage polarization in the tumor microenvironment seems to be robust to perturbations and permits evolve according to the environmental cues.

To evaluate the sensitivity in our TRN of macrophage polarization, we modeled multiple perturbations of each update rule. The sensitivity analysis of a gene or node evaluates the influence of the other genes of our network. Figure 8B outlines the average sensitivity of every node and the entire network (golden line). TGF- $\beta$  and IFN- $\gamma$  are the nodes with higher sensitivity, followed by glucocorticoid receptor (GCGCR), interleukin 4 (IL-4), and suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). Consequently, the extracellular cytokines more susceptible to stimuli or molecular noise. For example, IFN- $\gamma$  is associated with an anti-tumoral microenvironment and a cytotoxic M1 macrophage function. Contrary, TGF- $\beta$  is associated with pro-tumoral microenvironment and a regulatory wound healing M2 phenotypes. TGF- $\beta$  is associated with inhibiting M1 functions and enhance tumor proliferation. GCGCR and IL-4 are associated with regulatory and wound healing behavior as well. SOCS1 can inhibit STAT1 and diminish the expression of IFN- $\gamma$  in the microenvironment. NF $\kappa$ B, STAT1, and STAT3 have lower average sensitivity, thus, they are robust to transient changes. Therefore, we acknowledged NF $\kappa$ B and STAT1 as a therapeutic strategy for immunotherapy in tumor eradication. The network's average sensitivity is lower than one, hence our network behaves orderly (Figure 8A).

## DISCUSSION

The interaction between the immune system, microenvironment, and cancer is one appealing topic to design effective treatments. Moreover, the development of computational approaches that contribute to clarify their mechanisms is a needed task. By an extensive Boolean analysis, we presented a high quality curated signaling regulatory network between cancer-derived factors and macrophages. Unlike previous reports, we present a model with

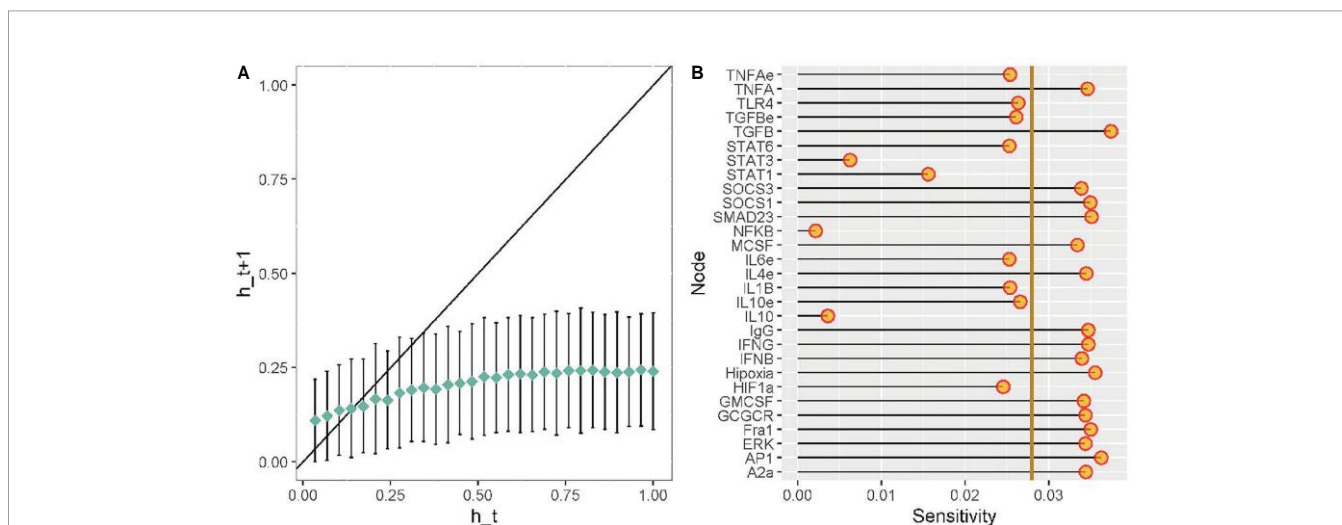


FIGURE 8 | Robustness analysis of our transcriptional regulatory network of macrophage polarization. Sensitivity analysis of each node from our transcriptional regulatory network of macrophage polarization. (A) Derrida curves of our transcriptional regulatory network of macrophage polarization in a tumor microenvironment. (B) Sensitivity analysis of the variables in our transcriptional regulatory network of macrophage polarization in a tumor microenvironment. Golden line is the mean of the value of the sensitivity analysis.

additional interactions experimentally validated and an in-depth analysis of the macrophages' hybrid phenotypes. As Palma et al. previously concluded, these intermediary steady-states support the hypothesis that macrophage polarization is a continuum process and not binary, as usually suggested. Furthermore, our extended analysis allowed us to identify phenotypes that suggested new physiological interpretations associated with hybrid macrophage phenotypes. Based on our results, we concluded that the hybrid phenotypes evolve constrained by a permanent interaction with the environment. We postulate that some of them have therapeutic implications by enhancing tumoricidal capacity (M1M2d and M1M2b) or promoting regulatory mechanisms (M2bM2d, M2aM2d, and M2cM2d) against cancer.

Notably, our analysis allowed us to build hypotheses towards the hybrid states that favor or contrast cancer phenotype. We concluded that M1M2d, a tumoricidal-regulatory macrophage, could potentially eliminate tumor cells due to the secretion of cytotoxic cytokines and IL-12, the latest helps to differentiate CD4+ T cells. As we know, M1 is an essential player in host defense, but if it is not regulated, it could cause tissue damage. Nonetheless, the M2d part of the hybrid phenotype will secrete IL-10 and TGF- $\beta$ . These regulatory cytokines would eventually maintain at bay the action caused by the cytotoxic cytokines. The M1M2d phenotype would induce a cytotoxic/regulatory cytokine ratio that could eradicate tumor cells and avoid tissue damage. Furthermore, M1M2b has a similar function as the M1M2d. It would regulate with IL-10 the damage caused by the cytotoxic actions. However, it would eventually eliminate tumor cells through the action of M1 and heal the damage caused by the elimination of tumor cells aside from the action of M2b.

Contrastingly, M2bM2d, M2aM2d, and M2cM2d are hybrid states with a malignant phenotype that express HIF1 $\alpha$ . When a tumor grows and increases its diameter, the oxygen supply becomes insufficient in inner regions, creating hypoxic or necrotic areas (47). Hypoxia response *via* HIF1 $\alpha$  not only affects macrophage polarization (53) also recruits macrophages and mesenchymal stromal cells to these regions (54, 55). All three macrophages phenotypes have different actions on tumor progression. For example, M2bM2d would favor the angiogenic process with the contribution of vascular endothelial growth factor (VEGF-A).

Meanwhile, the M2aM2d hybrid would be the most dangerous phenotype because it could heal the "wound" caused by tumor growth. Moreover, M2aM2d would favor tumor angiogenesis by secreting PDGF, TGF- $\beta$ , IL-8, CXCL12, and VEGF-A, thus contributing to tumor angiogenesis metastasis. A shred of additional experimental evidence describes this hypoxia adaptation is given by M2a, which inhibits T cell expansion, reducing tumor clearance (56). Finally, M2cM2d and other malignant hybrids would be spatially constrained into a hypoxic area, behaving as regulators secreting IL-10 and TGF- $\beta$ , creating a tumor proliferation scenario progression. Hypothetically, the inhibition of IL-10 or the coactivation of CD40, IL-12, IL-8, and TNF- $\alpha$ , could repolarize these macrophages to the M1 phenotype, where reverse tumor development has been

demonstrated (57). Overall, we postulate that the behavior of these macrophages hybrids is malignant, given their characteristics they could promote carcinogenesis and regulate the immune system in favor of tumor phenotype (58, 59).

Recent advances have shed the different cells that constitute specialized niches and the mechanisms that promote cell-to-cell interaction. The knowledge of the cellular content and diversity of the tumor microenvironment in malignant transformation and other metastatic diseases is relevant. Most human tissues, including the breast, sustain their continuous replenishment from primary stem cells. The microenvironment that maintains homeostasis promotes cell differentiation according to functional demands and suppresses aberrant cells' potential emergence. The interaction can be direct or bystander between malignant and non-malignant macrophages presumably powerfully influence the disease outcome, and cytokines secretion by macrophages is a fundamental factor for epithelial to mesenchymal transition (EMT) in breast cancer. Whether they promote retention of primitive cells within their niches to avoid mobilization into bloodstream or external tissues, as occurs in bone marrow, stills a matter in question (57, 60). Even though it is beyond this paper's scope, it is becoming clearer the critical role of the M1/M2 macrophage polarization in the malignant progression of TNBC. These malignant macrophage hybrids are mostly going to express type II cytokines, promoting cancer stems cells (CSC) growth. M2 macrophages protect CSC from the immune surveillance mechanisms and induce anti-inflammatory microenvironments that plays as onco-promoters. Additionally, M2 macrophage contribute to drug resistance, particularly at the late stages of tumorigenesis (57).

In our TGEM approach, we mutated NF $\kappa$ B and HIF1 $\alpha$ . NF $\kappa$ B is a master regulator with high activation and translocation efficiency. Based on our results, it is a promising key player to eliminate tumor cells. Having vital roles in the macrophage function. The nanoparticle approach develops a shift from an M2 macrophage type to M1 (61), very similar to our TGEM approach; nevertheless, only targeting NF $\kappa$ B is not sufficient. Hence, we knocked out HIF1 $\alpha$ , because this factor is affected by hypoxia, a constitutive condition in a tumor microenvironment, that triggers the M2 polarizing effect (62). In our TGEM, we obtained three hybrid phenotypes all with M1 combined with a regulatory behavior macrophage. Contrastingly under the knockout of HIF1 $\alpha$ , the macrophages still going to migrate to hypoxic regions but not for the same reason described earlier. This time, the spatial accumulation of macrophages in the hypoxic areas is due to their ability to scavenge apoptotic cells. Additionally, the macrophages activate the secretion of IL-12 and IFN- $\gamma$  generating positive feedback with CD4+ T cells that will terminate theoretically in tumor clearance. By this matter, hypoxia can no longer influence our TGEM. It will not be immobilized in hypoxia regions, contributing to an adverse prognosis in breast cancer.

Even though this approach shows good macrophage behavior

in a tumor microenvironment, we must take care of the Boolean model's limitations. There is no grading scale in the associated factors, because Boolean models only consider 0 or 1 values. So, we cannot evaluate the amount of a transcription factor is

sufficient to obtain a specific macrophage subtype. As we had proven, this reconstruction includes the necessary information to explore and supply evidence of the macrophage polarization transformation. However, we should update the components and their Boolean rules (Figure 1), as more experimental evidence will be appearing, and draw a more accurate description of this phenomenon. Finally, we considered the M0 phenotype as a monocyte, which is a precursor of macrophage activation. However, this type of cell has heterogeneity that could be manipulated differently in cancer cells (63). We believe that the monocyte continuum or reprogramming by cancer cells can be an essential variable in determining the macrophage continuum's behavior. This behavior should be studied for understanding completely macrophage polarization and the complexity in between. Alternatively considering the heterogeneity of the myeloid (monocytes and neutrophils) population set an appealing future perspective.

Here, we aimed to understand the molecular and external mechanisms that orchestrate macrophage polarization and develop potential therapeutic strategies. Several strategies focus on diminishing the recruitment of macrophages to the tumor site, showing the limitation of tumor vascularization and metastasis in mouse models (64). However, these treatments only reduce tumor growth by reducing the M2 cells (65), losing the beneficial properties of M1 type macrophages. We showed that our designed macrophage diminished malignant hybrid phenotypes and adapted to the perturbations caused by the tumor microenvironment. Our theoretical approach follows a combined strategy, which we believe will be the key to design potential therapies with macrophages. Our theoretical model also suggested that the best approach to defeat cancer is not shifting M2 to M1, as most pharmaceutical methods do. This shift is easily lost because it is affected by the tumor microenvironment (66). Instead, an optimal therapeutic strategy could be highlighting the best characteristics in the pro and anti-inflammatory scenarios. We concluded that the simultaneous action of HIF1 $\alpha$  and NF $\kappa$ B allows us achieving "control" over the influence of hypoxia and the cytotoxic behavior of macrophages. Finally, our computational approaches may contribute to set the foundations of the macrophage population dynamics under the phases of the cancer immunoediting (elimination, equilibrium and escape), in the hallmarks of breast cancer. Future directions and remaining challenges in investigating transitional biology from immunosurveillance to suppressor macrophages will include high throughput genomic or cytometric analyses of M1 and M2 populations in breast cancer-associated tumor microenvironment. The understanding of the dynamic process from immunosurveillance to malignant progression may unravel the principles of the dual host-protective or -harmful roles of M1 and M2 macrophages in tumors

## REFERENCES

1. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol* (2000) 164:6166–73. doi: 10.4049/jimmunol.164.12.6166
2. Mills CD. Anatomy of a Discovery: M1 and M2 Macrophages. *Front Immunol* (2015) 6:212. doi: 10.3389/fimmu.2015.00212

immunoediting. In recap, computational modeling has become a crucial tool for paving novel avenues in immunotherapies capable to implement optimal strategies for fighting against highly invasive breast cancer.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. All code used for analysis is available at <https://github.com/resendislab/M1-M2-Macrophage-Polarization>.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

UA-P and OR-A conceived and designed the mathematical model. UA-P performed all computational analysis and analyzed the data. MM-G and AV-J helped with the analyses of the data. RP with OR-A supervised the mathematical model and the *in-silico* analysis. All authors contributed to the article and approved the submitted version

## FUNDING

The authors thank the financial support from PAPIIT-UNAM (IA202720). UA-P received a doctoral fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología(CONACYT) (CVU: 774988).

## ACKNOWLEDGMENTS

UA-P is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This paper is part of the requirements to obtain the degree of doctor in said program. UA-P also received a fellowship (CVU: 774988) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología(CONACYT). UA-P wants to thank Dr. Eduardo GarcíaZepeda for the valuable contributions to this research work. Without him, this original research could not be possible; rest in peace.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.642842/full#supplementary-material>

3. Rhee I. Diverse Macrophages Polarization in Tumor Microenvironment. *Arch Pharm Res* (2016) 39:1588–96. doi: 10.1007/s12272-016-0820-y
4. Biswas SK, Sica A, Lewis CE. Plasticity of Macrophage Function During Tumor Progression: Regulation by Distinct Molecular Mechanisms. *J Immunol* (2008) 180:2011–7. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2011
5. Van Dyken SJ, Locksley RM. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated Alternatively Activated Macrophages: Roles in Homeostasis and Disease.





47. Michiels C, Tellier C, Feron O. Cycling Hypoxia: A Key Feature of the Tumor Microenvironment. *Biochim Biophys Acta* (2016) 1866:76–86. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.06.004
48. Szanto A, Balint BL, Nagy ZS, Barta E, Dezso B, Pap A, et al. STAT6 Transcription Factor Is a Facilitator of the Nuclear Receptor Pparg-Regulated Gene Expression in Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* (2010) 33:699–712. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.009
49. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. Ppars are a Unique Set of Fatty Acid Regulated Transcription Factors Controlling Both Lipid Metabolism and Inflammation. *Biochim Biophys Acta* (2011) 1812:1007–22. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.02.014
50. Lloyd-Price J, Gupta A, Ribeiro AS. Robustness and Information Propagation in Attractors of Random Boolean Networks. *PLoS One* (2012) 7:e42018. doi: 10.1371/journal.pone.0042018
51. Balleza E, Alvarez-Buylla ER, Chaos A, Kauffman S, Shmulevich I, Aldana M. Critical Dynamics in Genetic Regulatory Networks: Examples From Four Kingdoms. *PLoS One* (2008) 3:e2456. doi: 10.1371/journal.pone.0002456
52. Aldana M, Balleza E, Kauffman S, Resendiz O. Robustness and Evolvability in Genetic Regulatory Networks. *J Theor Biol* (2007) 245:433–48. doi: 10.1016/j.jtbi.2006.10.027
53. Henze A-T, Mazzone M. The Impact of Hypoxia on Tumor-Associated Macrophages. *J Clin Invest* (2016) 126:3672–9. doi: 10.1172/JCI84427
54. Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis Correlates With High Vascular Density and Focal Macrophage Infiltration in Invasive Carcinoma of the Breast. *Br J Cancer* (1999) 79:991–5. doi: 10.1038/sj.bjc.6690158
55. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms Regulating the Recruitment of Macrophages Into Hypoxic Areas of Tumors and Other Ischemic Tissues. *Blood* (2004) 104:2224–34. doi: 10.1182/blood-2004-03-1109
56. Cordeiro-da-Silva A, Tavares J, Araújo N, Cerqueira F, Tomás A, Kong Thoo Lin P, et al. Immunological Alterations Induced by Polyamine Derivatives on Murine Splenocytes and Human Mononuclear Cells. *Int Immunopharmacol* (2004) 4:547–56. doi: 10.1016/j.intimp.2004.02.009
57. Vahidian F, Duijf PHG, Safarzadeh E, Derakhshani A, Baghbanzadeh A, Baradaran B. Interactions Between Cancer Stem Cells, Immune System and Some Environmental Components: Friends or Foes? *Immunol Lett* (2019) 208:19–29. doi: 10.1016/j.imlet.2019.03.004
58. Cacho-Díaz B, García-Botello DR, Wegman-Ostrosky T, Reyes-Soto G, Ortiz-Sánchez E, Herrera-Montalvo LA. Tumor Microenvironment Differences Between Primary Tumor and Brain Metastases. *J Transl Med* (2020) 18:1. doi: 10.1186/s12967-019-02189-8
59. Rubio C, Munera-Maravilla E, Lodewijk I, Suarez-Cabrera C, Karaivanova V, Ruiz-Palomares R, et al. Macrophage Polarization as a Novel Weapon in Conditioning Tumor Microenvironment for Bladder Cancer: can We Turn Demons Into Gods? *Clin Transl Oncol* (2019) 21:391–403. doi: 10.1007/s12094-018-1952-y
60. Szade K, Gulati GS, Chan CKF, Kao KS, Miyaniishi M, Marjon KD, et al. Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. *Antioxid Redox Signal* (2018) 29:191–204. doi: 10.1089/ars.2017.7419
61. Li K, Lu L, Xue C, Liu J, He Y, Zhou J, et al. Polarization of Tumor-Associated Macrophage Phenotype Via Porous Hollow Iron Nanoparticles for Tumor Immunotherapy In Vivo. *Nanoscale* (2020) 12:130–44. doi: 10.1039/C9NR06505A
62. Raggi F, Pelassa S, Pierobon D, Penco F, Gattorno M, Novelli F, et al. Regulation of Human Macrophage M1-M2 Polarization Balance by Hypoxia and the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1. *Front Immunol* (2017) 8:1097. doi: 10.3389/fimmu.2017.01097
63. Jeong J, Suh Y, Jung K. Context Drives Diversification of Monocytes and Neutrophils in Orchestrating the Tumor Microenvironment. *Front Immunol* (2019) 10:1817. doi: 10.3389/fimmu.2019.01817
64. Qian B, Deng Y, Im JH, Muschel RJ, Zou Y, Li J, et al. A Distinct Macrophage Population Mediates Metastatic Breast Cancer Cell Extravasation, Establishment and Growth. *PLoS One* (2009) 4:e6562. doi: 10.1371/journal.pone.0006562
65. Fritz JM, Tennis MA, Orlicky DJ, Lin H, Ju C, Redente EF, et al. Depletion of Tumor-Associated Macrophages Slows the Growth of Chemically Induced Mouse Lung Adenocarcinomas. *Front Immunol* (2014) 5:587. doi: 10.3389/fimmu.2014.00587
66. Andón FT, Digifico E, Maeda A, Erreni M, Mantovani A, Alonso MJ, et al. Targeting Tumor Associated Macrophages: The New Challenge for Nanomedicine. *Semin Immunol* (2017) 34:103–13. doi: 10.1016/j.smim.2017.09.004

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Avila-Ponce de Le' on, Vázquez-Jime' nez, Matadamas-Guzman, Pelayo and Resendis-Antonio. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Myong-Hee Sung,  
National Institutes of Health (NIH),  
United States

## REVIEWED BY

Susanta Pahari,  
Texas Biomedical Research Institute,  
United States  
Yang Liu,  
Zhejiang Normal University, China

## \*CORRESPONDENCE

Osbaldo Resendis-Antonio  
oresendis@inmegen.gob.mx

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Systems Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

RECEIVED 05 August 2022

ACCEPTED 14 November 2022

PUBLISHED 05 December 2022

## CITATION

de León UA-P, Vázquez-Jiménez A,  
Matadamas-Guzmán M and  
Resendis-Antonio O (2022) Boolean  
modeling reveals that cyclic attractors  
in macrophage polarization serve as  
reservoirs of states to balance  
external perturbations from  
the tumor microenvironment.  
*Front. Immunol.* 13:1012730.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.1012730

## COPYRIGHT

© 2022 de León, Vázquez-Jiménez,  
Matadamas-Guzmán and Resendis-  
Antonio. This is an open-access article  
distributed under the terms of the  
[Creative Commons Attribution License  
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or  
reproduction in other forums is  
permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s)  
are credited and that the original  
publication in this journal is cited, in  
accordance with accepted academic  
practice. No use, distribution or  
reproduction is permitted which does  
not comply with these terms.

# Boolean modeling reveals that cyclic attractors in macrophage polarization serve as reservoirs of states to balance external perturbations from the tumor microenvironment

Ugo Avila-Ponce de León<sup>1,2</sup>, Aarón Vázquez-Jiménez<sup>2</sup>,  
Meztli Matadamas-Guzmán<sup>2</sup>  
and Osbaldo Resendis-Antonio<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico, <sup>2</sup>Human Systems Biology Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Ciudad de México, Mexico, <sup>3</sup>Coordinación de la Investigación Científica – Red de Apoyo a la Investigación – Centro de Ciencias de la Complejidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

Cyclic attractors generated from Boolean models may explain the adaptability of a cell in response to a dynamical complex tumor microenvironment. In contrast to this idea, we postulate that cyclic attractors in certain cases could be a systemic mechanism to face the perturbations coming from the environment. To justify our conjecture, we present a dynamic analysis of a highly curated transcriptional regulatory network of macrophages constrained into a cancer microenvironment. We observed that when M1-associated transcription factors (STAT1 or NF- $\kappa$ B) are perturbed and the microenvironment balances to a hyper-inflammation condition, cycle attractors activate genes whose signals counteract this effect implicated in tissue damage. The same behavior happens when the M2-associated transcription factors are disturbed (STAT3 or STAT6); cycle attractors will prevent a hyper-regulation scenario implicated in providing a suitable environment for tumor growth. Therefore, here we propose that cyclic macrophage phenotypes can serve as a reservoir for balancing the phenotypes when a specific phenotype-based transcription factor is perturbed in the regulatory network of macrophages. We consider that cyclic attractors should not be simply ignored, but it is necessary to carefully evaluate their biological importance. In this work, we suggest one conjecture: the cyclic attractors can serve as a reservoir to balance the inflammatory/regulatory response of the network under external perturbations.

## KEYWORDS

macrophage, cycle attractors, Boolean models, systems immunology, gene regulatory network, cancer immunology

## Introduction

Understanding how transcription factors (TFs) regulate and orchestrate gene expression in a cell has been an area of interest since the early stages of genomics research. In recent years, a variety of next-generation sequencing technologies have emerged, which have opened a new window to characterize the genetic regulatory mechanism, even at the single-cell level (1). Data generated from these technologies have been fundamental to discover the mechanical regulation of transcriptional factors creating databases and building high-quality gene regulatory networks at a genome scale (2–5). The gene regulatory interactions in an organism can be visually summarized in a network, whose topological and dynamical analysis elucidates their organization and feasible phenotypes (6–8). One approach to analyzing the dynamic portrayal of a regulatory network is the so-called Boolean model, which allows for an exploration of how the transcriptional regulatory network (TRN) responds to changes in the microenvironment. Boolean modeling assumes that the expression of genes, transcriptional factors, or signal components can take binary states: on (1) or off (0). The dynamical behavior of each node is determined through logical rules that describe the regulatory mechanisms over the gene (9). It is important to set the logic such that it does not depend on kinetics parameters or chemical concentration. Having selected an initial state and applied the Boolean rules synchronously or asynchronously for each node, the dynamic of the network is obtained until it reaches a steady-state behavior. Notably, despite its simplicity, this approach has proven to reproduce phenotype states in a variety of complex systems (8, 10). Although Boolean models cannot show the continuum behavior of variables over time and concentration having a dichotomous response, they give meaningful insights into the system steady states. In a TRN, they represent the time-invariant phenotype states. The steady states may be a single node (fixed-point attractors) or states that cycle among a set of specific nodes (cyclic attractors). The attractors are of great importance because they represent the long-term behavior of the Boolean model and are potentially associated with cellular phenotypes (11, 12). Most dynamical analyses of Boolean models explore the steady state of fixed-point attractors using synchronic simulation as a mathematical approach, most of the time neglecting their cyclic attractors. The period of cyclic attractors is one fundamental variable to distinguish and classify them, which is an integer indicating the number of states visited before recovering the initial state. Even though these analyses have significantly contributed to a variety of TRN, the question of whether the cyclic attractors have or do not have biological interpretation remains.

To evaluate the importance of cycle attractors, we will focus on an essential immune cell with a plethora of phenotypes based on what is present in the microenvironment, macrophages.

These cells can balance between an anti-inflammatory and a pro-inflammatory response because they can transform from M1 to M2 phenotypes through intermediate phenotypes (13–15). Understanding the dynamics of polarization of the macrophages, especially those associated with oscillatory behavior, is crucial to understand the inflammatory response in cancer and COVID-19. Notably, some experimental studies stress the remarkable role that cyclic activation of key cytokines plays in regulating the cellular microenvironment through the anti/pro-inflammatory function of the macrophages (16). In addition, recent single-cell experiments and theoretical studies make evidence of the functional relevance of the heterogeneity and cyclic activation in macrophage polarization (17, 18). These and other facts suggest that the cyclic behavior of macrophage polarization seems to be an essential feature influencing biological function. In this perspective article, we theoretically studied the behavior of cyclic attractors and sketch their possible biological implications. To explore the properties of cyclic attractors, we used a high-quality gene regulatory network of macrophage polarization in a tumor microenvironment (TME) used in (8) and evaluated their dynamics under the synchronous updating scheme. In addition, we obtained the cell fate map for the synchronous updating scheme, which modifies the node of the attractor with the opposite value. For instance, if the value is 0, we perturbed it with 1 and evaluated the dynamics of the said perturbation. Our analysis supplies evidence that cycle attractors retrieved from Boolean dynamics behave as reservoirs to restore the population that was lost when the perturbation occurred when a steady-state attractor is subject to a perturbation in a TF associated with a specific phenotype. Despite this conjecture requiring experimental validation, we highlight that these cyclic states in macrophages can have a remarkable role to sustain cancer phenotype, a hypothesis that calls to not neglect their presence and rethink their role in a biological context.

## Current perspective of macrophage polarization Boolean models

### Boolean model of the GRN associated with the polarization of a macrophage

We focused our discussion on explaining the biological consequences of the cycle attractors because in most Boolean models they are ignored. To this end, we focus our attention to a recent GRN built to explore the relationship between macrophages and cancer cells (8). Previous studies have shown that the TME is a decisive factor to trigger the specific phenotype of the macrophage (19–22). At the network level, TFs regulate the expression of other TFs that eventually induce a change in the macrophage behavior based on the stimuli (23, 24). Depending on the stimuli, monocytes will differentiate into

two types of macrophages: classically activated macrophages (M1) and alternatively activated macrophages (M2) (25). M1 macrophages are implicated in a pro-inflammatory response by secreting factors [such as IL-1b, IL-6, IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$ , and some chemokine ligands like CCL2 and CCL3, among others (26, 27)] that will eliminate tumor cells. Meanwhile, M2 macrophages are associated with the proliferation and repair of tumor cells by secreting anti-inflammatory mediators like IL-10, TGF- $\beta$ , and vascular endothelial growth factor (VEGF), among others (27, 28). M2 macrophages also have the ability to secrete chemokine ligands like CCL17 and CCL22, which have the ability to affect the immune infiltration in a TME (29, 30). A variety of papers have modeled macrophage polarization using a Boolean discrete approach (8, 31–33); however, most of them have ignored the dynamics of cycle attractors (8, 33). To our knowledge, the work from Ordaz-Arias and colleagues is the first paper that has evaluated the importance of cycle attractors for macrophage plasticity in response to the microenvironment (17). They concluded that cyclic attractors are necessary to regulate the production of cytokines by macrophages based on a response in a changing microenvironment. To enhance the importance of the cyclic attractors, here we suggest that cyclic attractors serve as a reservoir to respond with phenotypes that counteract hyper-inflammatory or hyper-regulated states. Interestingly, the M1/M2 paradigm is very similar to the Th1/Th2 mice response. M1 or Th1 involves the activations of phenotypes associated with cytotoxic capacities. Meanwhile, M2 or Th2 is implicated with phenotype towards a regulatory behavior (34, 35). Evaluating the M1/M2 axis as an integrated process reveals the relevance of the balance between cytotoxic and regulatory behavior. Thus, a distress in the equilibrium might bend the response, leading to a systemic malfunction like chronic inflammation.

## Cycle attractors are essential for explaining macrophage adaptation in a tumor microenvironment

The reconstructed macrophage polarization network in a TME was meticulously simulated as a dynamical Boolean model using the synchronous updating scheme until the systems reach their equilibrium states (attractors) (Figure 1). To identify similarities among attractors, we have made a bi-dimensional map using the distributed stochastic neighbor embedding algorithm (36). As a result, we obtained 27 attractors, of which 19 were simple attractors and the remaining were cycle attractors. To associate the attractors with biological functionality, we labeled them based on six possible phenotypes previously described in reference (8). In this research, we defined a macrophage based on the possible functional behavior in a TME, i.e., tumor-eliminating or tumor-promoting macrophages (37). In our simulations, we obtained three types of attractors: pure fixed point, hybrid fixed point, and cycle attractors. Pure fixed-point attractors are the ones that only present one phenotype based on the experimental evidence of macrophage phenotypes (38, 39). Meanwhile, hybrid fixed-point attractors are phenotypes with at least one macrophage phenotype as in (8). Of the 19 pure fixed-point attractors, 10 are associated with tumor-promoting behavior and the rest are implicated with hybrid functions (labeled as hybrid fixed-point attractors) integrating tumor-eliminating and -promoting properties. From here, we conclude that, in a TME, the balance between pro- and anti-inflammatory processes is tilted toward the anti-inflammatory tumor-promoting properties (20, 40). On the other hand, all the cycle attractors have a hybrid phenotype having more than two macrophage phenotypes expressed simultaneously in each state.

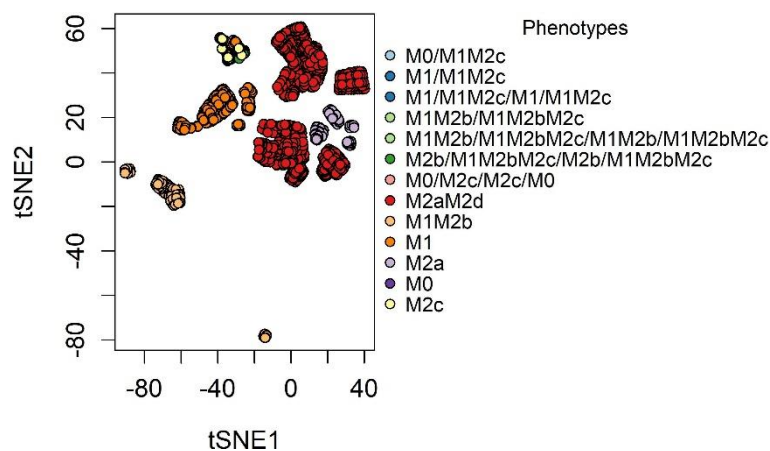


FIGURE 1

The t-SNE plot of the phenotypes was obtained from our network of macrophage polarization. The attractors were handed a point in an x-y plane based on the expression of 0's and 1's, and attractors with the same combination of 0's and 1's were placed nearby.

Only two cycle attractors have a period of two and the rest have a period of four. From a practical point of view, we can suggest the functionality of each attractor and the regulators that they involve in the network. The two-period cycle attractor M0/M1M2c is associated with the activation of AP-1, STAT3, and NF- $\kappa$ B. Because the latter TFs are activated, the associated cytokines that may be secreted in the TME are IL-6, IL-1 $\beta$ , and IL-10. The four-period cycle attractor M1/M1M2c/M1/M1M2c is associated with the expression of a pleiotropic IL-6, which is implicated in acute inflammation and tumor proliferation. IL-6 can activate AP-1 and STAT3 TFs (16); both factors are implicated with dual behaviors in cancer. IL-6 is associated with a back-and-forth cycle between tumor elimination and tumor promotion. Experimental evidence has shown that it is capable of promoting positive feedback between breast cancer and tumor-associated macrophages for metastasis and proliferation (41, 42). The two- and four-degree cycle attractors M1M2b/M1M2bM2c and M1M2b/M1M2bM2c/M1M2b/M1M2bM2c are dictated by the expression of STAT1, AP-1, NF- $\kappa$ B, and STAT3. M2b/M1M2bM2c/M2b/M1M2bM2c is maintained in a cycle due to the action of a pro-inflammatory IL-1 $\beta$ . Like IL-6, IL-1 $\beta$  has two sides to a story: tumor promotion and tumor inhibition. These cytokines are connected because they are associated with secreting cytokines and tumor-promoting factors to enhance breast cancer cells' capacity to thrive and metastasize (43). However, they have a tumor-inhibiting capacity because they promote an M1 tumor cytotoxic behavior and recruit Th1 and Th17 as anti-tumorigenic effects (44). Another cycle attractor is M0/M2c/M0/M2c, which is associated with the expression of STAT3 caused by IL-10 or IL-6. Interestingly, when any of these cytokines are not present, the M2c phenotype goes back to a monocyte with M2c secretion capacities.

## Perturbing key molecular components is associated with transitions to cycle attractors that may act as reservoirs

With the purpose of sketching the phenotype landscape, we evaluated the feasible transitions between attractors when a bit-flip perturbation on the state of a node occurs. This perturbation was computationally accomplished by permanently changing the state of a node from 0 to 1, or *vice versa*, of every single attractor. This type of perturbation will determine the one-state neighbors. As Figure 2 depicts, we have characterized the space of feasible transitions for six single attractors obtained for the TRN of macrophages. We will start by describing the dynamics of the monocyte in response to an inner perturbation (see Figure 2A). Our first observation was that the activation of STAT1 or NF- $\kappa$ B in monocytes favors the transition to the M1 phenotype (Figure 2A). Furthermore, when we introduce a monocyte into an IL-10 microenvironment (simulated by the

activation of IL-10), it transits to a cycle attractor with regulatory capacity. Monocytes can secrete IL-10 and TGF- $\beta$ , both of which independently activate STAT3 (45, 46). In addition, autocrine secretion of the effector of immune secretion TGF- $\beta$  is an essential factor for the maintenance and survival of monocytes; TGF- $\beta$  is also secreted by M2c macrophages (27, 47).

On the other hand, the TFs associated with the pro-inflammatory of the M1 phenotype are NF- $\kappa$ B or STAT1. If we inactivate NF- $\kappa$ B, the M1 macrophage will transit to a cycle attractor M1/M1M2c/M1/M1M2c, where AP-1 is associated with M1 and STAT3 is associated with M2c (Figure 2B). AP-1 activation in M1 macrophages is implicated with the production of nitrogen intermediates, IL-6, and TNF- $\alpha$  (48), thus developing tumoricidal capacities (49, 50). Instead, the M2c counterpart is associated with the secretion of IL-10, TGF- $\beta$ , and IL-6 (27). The only cytokine in common in the cycle attractor M1/M1M2c/M1/M1M2c is IL-6, which will dictate the oscillations between states, a pleiotropic cytokine with a mechanism of regulating the secretion of cytokines by macrophages. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) is an important factor because of its pro-apoptotic and anti-proliferative behavior in TME. If we inactivate IFN- $\gamma$ , the M1 macrophage will transit to a cycle attractor M0/M2c/M2c/M0 losing the anti-tumor properties because of the inactivation of STAT1 (Figure 2B) (51). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) is implicated with pro-inflammatory components, and if inactivated, it will transit to the M0/M2c/M2c/M0 attractor (Figure 2B) (52). Moreover, losing this TF is associated with a naive monocyte, because non-native monocytes are differentiated in the presence of GM-CSF, and naive macrophages are more susceptible to the environmental stimulus (53).

In terms of the M2a macrophage, we noted that as STAT6 is deleted, the macrophage shifts to the cycle attractor M0/M2c/M2c/M0 (Figure 2C). Instead, the unfavorable regulatory and pro-tumoral macrophage M2c is activated by STAT3 and the inhibition of SOCS3 (Figure 2D). Once we perturb STAT3 in M2C, the macrophage polarizes to a cycle attractor, M0/M2c/M0/M2c. If we activate SOCS3 through STAT1 or NF- $\kappa$ B, it will change the phenotype and enter the same cycle attractor (Figure 2C).

From a biological sense, M2aM2d is an unfavorable macrophage because it is associated with tumor-promoting properties by stimulating the production of cytokines and growth factors with pro-proliferative capacity. Our computational analysis postulates that the key TFs that shape M2aM2d are STAT6 and HIF1 $\alpha$  for the M2a and M2d macrophages, respectively (Figure 2E). The M2aM2d macrophage hybrid phenotype is implicated in a regulatory behavior, secreting cytokines and growth factors to enhance tumor growth; this is one of the phenotypes we want to avoid in a hyper-regulatory environment (8). When STAT6 is perturbed, the state of the network transits to the cycle attractor M1M2b/M1M2bM2c/M1M2b/M1M2bM2c. STAT6 can repress the expression of the TF associated with the

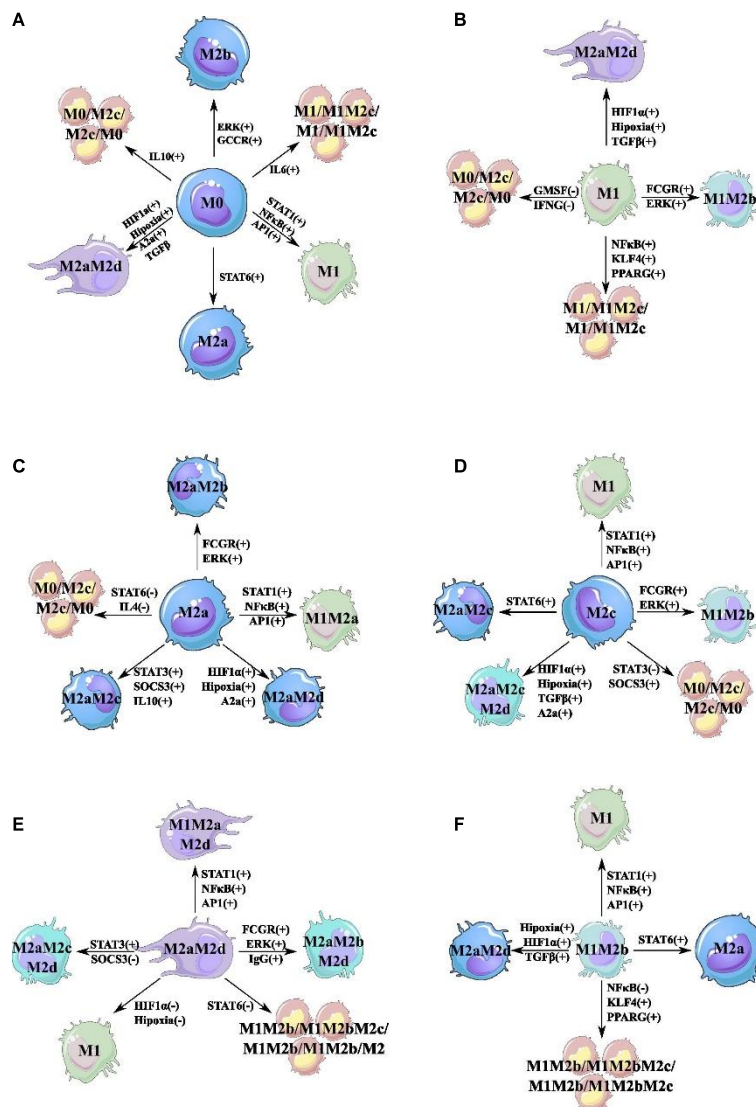


FIGURE 2

Cell fate map of the macrophage polarization. For each attractor obtained, we changed the node's value and maintained this perturbation until an attractor was reached. If the attractor transit to another phenotype, we represent this transition with a line linking the original phenotype with the new phenotype obtained by the perturbation. A single perturbation plus sign (+) means that the node was turned off (0), and we turn it on (1). Meanwhile, a minus sign (-) means that the perturbation was on (1), and we turned it off (0). (A) Cell fate map for monocyte (M0). (B) Cell fate map for M1 macrophage. (C) Cell fate map for M2a macrophage. (D) Cell fate map for M2c macrophage. (E) Cell fate map for M2aM2d macrophage. (F) Cell fate map for M1M2b macrophage. Colors represent different states (attractors) of macrophage polarization.

M1 phenotype (STAT1 and NF-κB) and the M2b (AP-1) macrophage phenotype (27). The M2b macrophage can secrete pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF-α) and anti-inflammatory cytokines (IL-10) (27, 54). Once we inactivate the expression of STAT6, it allows the expression of the M1M2b (STAT1 or NF-κB mixed with AP-1) hybrid phenotype. Meanwhile, this perturbation tilts the balance to a more pro-inflammatory state and the macrophage generates a cycle attractor that goes back and forth with the regulatory component of the M2c macrophage phenotype, which counteracts the

proinflammatory state by secreting IL-10. Finally, another important attractor is the hybrid M1M2b (Figure 2F), which has a mixture of favorable and unfavorable properties in a TME. For this hybrid, the important TFs are NFκB and AP-1 activated by IL-1β. If we inactivate IL-1β, it will polarize to a favorable macrophage M1 because AP-1 is no longer activated, and we lose the M2b counterpart. However, if we inactivate NF-κB by inhibiting TNF-α in the microenvironment, the hybrid will shift to a cycle attractor, M1M2b/M1M2bM2c/M1M2b/M1M2bM2c, which acts as a reservoir so as not to lose the whole M1M2b hybrid phenotype.

If we activate peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PAR- $\gamma$ ) or Kruppel-like factor (KLF4), M1M2b will transit to the same cycle attractors because PPAR- $\gamma$  or KLF4 will eventually activate STAT6, which, in turn, can inactivate NF- $\kappa$ B developing in the first perturbation previously described. KLF4 and PPAR- $\gamma$  are normally activated in low-oxygen microenvironments as a metabolic response in a hypoxic scenario. Also, these factors are implicated in releasing growth factors and cytokine associated with an M2a macrophage trying to feed cancer cells in an adverse scenario that allows them to thrive.

## Discussion and future directions

In recent years, cancer has been studied as a complex system by taking into account the interacting TFs, cytokines emitted at different states, and other intracellular signals coming from the TME (55–57). Nevertheless, to our knowledge, there are very few studies that explore the role that immune cells have in cancer progression, specifically the macrophage. Macrophages are the most abundant cells in tumors and are associated with poor clinical outcomes (58); therefore, understanding their mechanisms of adaptation to constant signaling in a TME can have important therapeutic implications. Moreover, some studies have used this cell as a driver of tumor cell growth promoter (59) and favoring the metastatic process (60). All these studies on cancer make it evident that the microenvironment is a factor that can promote or repress cancer growth depending on the specific signaling profile. Based on this idea, the control of the activity of the macrophage has been considered an appealing strategy to diminish its lethal effects (37, 61, 62).

Boolean modeling is an excellent approach to understanding the mechanisms that drive macrophage polarization in a TME. Despite its mathematical simplicity, Boolean modeling of macrophage polarization may highlight certain patterns of expression that may help us understand the macrophage phenotypes whose function in a TME remains unknown. Notably, the single and hybrid attractors obtained from the macrophage TRN have been useful to associate the different phenotypes with those experimentally validated, especially M1 and M2 states. However, cycle attractors in the Boolean modeling approach have been mostly disregarded in a variety of studies because they have been considered mathematical artifacts without any biological relevance. Recently, one article has focused on these types of attractors and pointed out the biological implications of cycle attractors in a model of macrophage polarization (17). Here, we postulate another idea that supports their biological relevance. By accomplishing a genetic perturbation using a previous TRN in macrophages (8), we observe that the cyclic attractors can be seen as a reservoir of states for balancing the pro- and anti-inflammatory response in a TME. Our study contributes additional evidence that oscillatory phenotypes could have a relevant role in maintaining the pro- and anti-inflammatory

balance in any type of immune response, including cancer (63). For example, M1 and M1M2b are macrophages with favorable tumor-eliminating outcomes; however, to avoid a hyper-inflammatory state, a perturbation in the TME will help to reduce entering this state associated with complications in patients (55). The same pattern occurs for the macrophage phenotypes with unfavorable tumor-promoting outcomes; the TME induces a cyclic attractor in the macrophage to delay the hyper-regulation in the environment. A hyper-regulation state is associated with the proliferation of tumors and immune evasion due to the action of secreted cytokines (25, 56), which is why sustained regulation of macrophages should be inhibited by oscillations.

From our analysis, we hypothesize that the cycle attractors could have therapeutic implications by circumventing hyper-inflammatory and regulatory states. In particular, three cycle attractors were obtained in our analysis; one of them involves the monocyte (M0) and the M2c state: M0/M2c/M0/M2c. The second attractor is defined by the states M1 and the hybrid state M1M2c: M1/M1M2c/M1/M1M2c. Finally, the last attractor comprises the hybrid states M1M2b and M1M2bM2c: M1M2b/M1M2bM2c/M1M2b/M1M2bM2c. One important aspect to take into account is the nature of the phenotype of where it is before reaching the cyclic attractor in response to the disturbance. The most abundant cycle attractors that are present in four of the six major attractors are depicted in Figure 2. This attractor transits from the monocyte (M0), the pro-inflammatory with cytotoxic activity M1 macrophage, and the regulatory and tissue recovery macrophages M2a and M2c. The M0/M2c/M0/M2c cyclic attractor emerges by modifying the IL-10 from a monocyte and is associated with the secretion of IL-10 and TGF- $\beta$  cytokines and with the survival and continuity of monocytes in the TME. In addition, this cycle attractor may be associated with higher infiltration of macrophages in the microenvironment, which is implicated in a lower survival rate (27, 47, 64). Monocytes that are continuously recruited because of the cycle attractor are implicated in resistance to treatment and enhance immunosuppression (65–67). Moreover, this cycle attractor is implicated with a higher abundance of monocytes in the blood, a bad prognosis for cancer patients (68, 69). The same attractor emerges from the pro-inflammatory and cytotoxic M1 phenotype. The difference between both sources radicates on the cytokines or the growth factor that triggers the final state. Regardless of the necessity of the M1 phenotype, it has been demonstrated that an uncontrolled pro-inflammatory state may be associated with the enhancement of cell death due to the induction of the cytokine storm (70). Accordingly, with our *in silico* study, the M0/M2c/M0/M2c attractor appears when GM-CSF and IFN- $\gamma$  are absent in the microenvironment. GM-CSF is a double-edged sword towards tumor progression. It is implicated in tumor cell elimination; however, in a high dose, it is associated with tumor resistance by modifying the TME (71). A continuous expression of this stimulator has been

associated with a hyper-inflammatory scenario due to the imbalance in the secretion of inflammatory cytokines and chemokines (72, 73). Through inhibition of GM-CSF expression, we can avoid a hyper-inflammatory state leading the system to enter into a cycle attractor with anti-inflammatory cytokines to try to maintain homeostasis and circumvent therapeutic resistance (74, 75). Given that IFN- $\gamma$  has an anti-proliferative cytotoxic response against tumor cells, it is an excellent candidate for immunotherapy (51, 76). Nevertheless, the TFs in macrophages that secrete IFN need to be continuously activated; otherwise, NF- $\kappa$ B or AP-1 may maintain the secretion of pro-inflammatory cytokines and propitiate the cytokine storm. To avoid the cytokine storm induced by immunotherapy (74, 75), the network enters a cycle attractor. We suggest that this dynamic state is a response to the loss of IFN- $\gamma$  and the secretion of anti-inflammatory cytokines. In summary, by entering this cycle attractor, the macrophage tries to prevent a hyper-inflammatory state by cycling between anti-inflammatory and pro-inflammatory (AP-1 activated) phenotypes. A microenvironment where the balance is tilted to an anti-inflammatory state is a scenery that is not desirable in cancer. It has been demonstrated that this state is detrimental to the patients because it enhances the survival and growth rate of tumor cells (8, 68). Forthwith, we will focus on the importance of the cycle attractor M0/M2c/M0/M2c when the nature of the attractor has anti-inflammatory properties. The M0/M2c/M2c/M0 that emerges from the M2a derives from a macrophage associated with the secretion of growth factors implicated in recuperating tissue by remodeling with fibrogenic inflammatory cells around a tumor. The latter transition is due to the fact that IL-4 is absent in the microenvironment and consequently inactivates STAT6 (which is inhibited in the macrophage). Thus, the Th2 response does not exist in the environment. Hence, the emergence of this cycle attractor is of great importance because it prevents the hyper-regulatory state of the macrophage (77). Because IL-4 activates the macrophage, it generates positive feedback with a Th2 response allowing the secretion of cytokines implicated in inhibiting the cytotoxic function and presence in the microenvironment of IFN- $\gamma$  (78–80). Finally, the last transition for this cycle attractor is from an M2c hyper-regulatory macrophage; when it loses the expression of STAT3, it transits to a cycle attractor with the survival of monocytes. We can observe that these macrophage phenotypes enter a cycle attractor that will not avoid a hyper-regulatory state, instead with continuous recruitment of monocytes and their survival. This cycle attractor may be implicated with the capacity of macrophages to induce immune suppression by the secretion of cytokines and chemokines that enhance a Th2 response (81, 82) and enhancement of metastasis (83).

M1/M1M2c/M1/M1M2c derives from two important macrophages: the monocyte and the M1 macrophage. The

cycle attractor emerges when IL-6 is present in the microenvironment, a pleiotropic cytokine with the capacity to activate not only TF associated with a pro-inflammatory phenotype but also TF associated with an anti-inflammatory behavior. The activation of this cytokine generates the cycle attractor M1/M1M2c/M1M2c, where AP-1 and STAT3 are the TFs activated in this cycle. The cycle goes back in forth with the secretion of proinflammatory cytokines (like IL-6, TNF-, IL1- $\beta$ , and the tumor-eliminating cytokine IL-12) balanced with the secretion of IL-10 to try to diminish the inflammatory counterpart, preventing a hyper-inflammatory state. When M1/M1M2c/M1M2c shifts from the M1 macrophage, it has the same behavior to prevent a hyper-inflammatory state; the only difference is the TF involved. KLF4 and PPAR- $\gamma$  are TFs associated with the secretion of anti-inflammatory cytokines (84–86); PPAR- $\gamma$  develops negative feedback with AP-1 inhibiting the secretion of pro-inflammatory cytokines (49), allowing instead the secretion of IL-10 and Arg1, which is associated with an immunosuppressive function (87). Meanwhile, KLF4 is implicated with an anti-inflammatory but STAT6-dependent response, favoring an IL-4-type macrophage (M2a) and a Th2 response in a TME (88, 89).

M1M2b/M1M2bM2c/M1M2b/M1M2bM2c only comes out from an unfavorable hybrid macrophage M2aM2d due to its pro-tumor behavior and the ability to function in a hypoxic condition (90) and the M1M2b with the capacity to eliminate tumors. The cycle attractors that emerge from M2a are correlated with a hyper-regulatory state, leading to angiogenesis and tumor fibrosis. The TF associated with this behavior is STAT6; when inhibited, it polarizes a cycle attractor that limits pro-inflammatory secretion at certain periods in the cycle. The periods where pro-inflammatory cytokines are secreted will avoid the hyper-regulatory state, and it may tilt the balance to a more tumor-eliminating phase but without surpassing the hyper-inflammatory state (this may be achieved with the presence of M2c in the cycle). Meanwhile, the cycle attractor that emerges from M1M2b can be regulated by inhibiting NF- $\kappa$ B and cycle back and forth with pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. This transition between the hybrid and the cycle attractor is of great importance to prevent a hyper-inflammatory state associated with tissue damage and tumor growth.

We concluded that cycle attractors act as reservoirs for refueling a balance in the population when the TME reaches a hyper-inflammation or a regulatory state. They can also behave as bystanders in the TME, waiting for the perturbation to cease and prevent hyper-inflammation or hyper-regulation. Interestingly, we can take advantage of this cycle attractor to incline the balance to a more tumor-eliminating phenotype by mechanisms of immunotherapy. Altogether, we conclude that cycle attractors of macrophage polarization are biologically relevant because they



describe the adaptability of macrophages in transducing the TME signals and function based on that response. Based on this perspective article, we recommend to not ignore these attractors and to carefully evaluate and start designing experiments to classify their possible biological relevance. Finally, we highlight some drawbacks that should be addressed in future works to improve the results discussed here. In terms of limitations, although we have simplified the spatial distribution of macrophages and their effects on transcriptional regulation, this assumption is inappropriate in real systems. For instance, a specific population of macrophages is located adjacent to endothelial cells, which help the secretion of factors implicated with the regulation of angiogenesis (91, 92). Thus, Boolean modeling with the spatial components and the heterogeneous composition of cells is a challenge that needs to be addressed in future studies. To contribute to these last aims, single-cell and spatial RNA seq technologies are fundamental technologies that can help understand the heterogeneity and try to generate a nomenclature of macrophage diversity in a TME (93–95). Furthermore, by applying these technologies in macrophage polarization, we expect to have valuable information about the repertoire of phenotypes to confirm our main hypothesis: cycle attractors are a means to respond to a specific perturbation or to avoid a hyper-inflammatory or regulated state.

Lastly, we highlight two strategies to induce a transition from a phenotype within a cycle state to a state that favors tumor elimination: reprogramming the environment or engineering the transcriptional regulation of the macrophages. The first tactic is achieved by modifying the environment and creating the secretion of the opposing cytokines to favor tumor elimination for some time without entering the hyper-inflammation or regulation phase. The second strategy is focused on transcriptional activity, for example, the inactivation of STAT6 or STAT3 to recover phenotypes in a tumor-eliminating state. The validation of the conjectures obtained from the Boolean approach is subject to experimental assessment in the near future.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the supplementary material. All code used in this paper are freely available at [https://github.com/resendislab/Cyclic\\_Attractors](https://github.com/resendislab/Cyclic_Attractors).

## References

- Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol* (2021) 82:801–11. doi: 10.1016/j.humimm.2021.02.012
- Xiao Y. A tutorial on analysis and simulation of boolean gene regulatory network models. *Curr Genomics* (2009) 10:511–25. doi: 10.2174/138920209789208237
- Lambert SA, Jolma A, Campitelli LF, Das PK, Yin Y, Albu M, et al. The human transcription factors. *Cell* (2018) 172:650–65. doi: 10.1016/j.cell.2018.01.029
- Han H, Cho J-W, Lee S, Yun A, Kim H, Bae D, et al. TRRUST v2: an expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions. *Nucleic Acids Res* (2018) 46:D380–6. doi: 10.1093/nar/gkx1013

## Author contributions

UA-P and OR-A conceived and designed the mathematical model. UA-P and AV-J performed all computational analyses and analyzed the data. MM-G and AV-J helped with the analyses of the data. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

ORA thanks the financial support from CONACYT (Grant Ciencia de Frontera 2019, FORDECYT-PRONACES/425859/2020), PAPIIT-UNAM (425859), and an internal grant from the National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN, México). UA-P would like to thank the financial support from CONACYT (CVU: 774988).

## Acknowledgments

UA-P is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This paper is part of the requirements to obtain the degree of doctor in the said program. UA-P also received a fellowship (CVU: 774988) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.







## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Miguel Vicente-Manzanares,  
Spanish National Research Council  
(CSIC), Spain

## REVIEWED BY

Anett Hudák,  
Pharmacoidea Ltd., Hungary  
Wenhan Guo,  
The University of Texas at El Paso,  
United States  
Susanta Pahari,  
Texas Biomedical Research Institute,  
United States

## \*CORRESPONDENCE

Osbaldo Resendis-Antonio  
oresendis@inmegen.gob.mx

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Systems Immunology,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

RECEIVED 18 July 2022

ACCEPTED 04 October 2022

PUBLISHED 17 October 2022

## CITATION

de León UA-P and  
Resendis-Antonio O (2022)  
Macrophage Boolean networks  
in the time of SARS-CoV-2.  
*Front. Immunol.* 13:997434.  
doi: 10.3389/fimmu.2022.997434

## COPYRIGHT

© 2022 de León and Resendis-Antonio.  
This is an open-access article  
distributed under the terms of the  
[Creative Commons Attribution License  
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or  
reproduction in other forums is  
permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s)  
are credited and that the original  
publication in this journal is cited, in  
accordance with accepted academic  
practice. No use, distribution or  
reproduction is permitted which does  
not comply with these terms.

# Macrophage Boolean networks in the time of SARS-CoV-2

Ugo Avila-Ponce de León<sup>1,2</sup> and Osbaldo Resendis-Antonio<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico, <sup>2</sup>Human Systems Biology Laboratory, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Ciudad de México, Mexico, <sup>3</sup>Coordinación de la Investigación Científica – Red de Apoyo a la Investigación, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, Mexico

## KEYWORDS

macrophage, COVID-19, Boolean models, systems immunology, gene regulatory network, SARS-CoV-2

## Introduction

The post-pandemic period of the current coronavirus disease (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has lasted longer than expected despite the huge impact of the world-wide vaccination campaign in the past years (1). Since the pandemic began, endless mathematical models have been published to describe the viral outbreak at a population level. However, the molecular mechanism that drives the pathogenesis of the virus in the human microenvironment has been scarce (2–6). The existing mechanistic models deal to answer how SARS-CoV-2 invades the lung microenvironment and shapes the composition of the immune system in favor of virus duplication. From the clinical point of view, almost all patients that develop severe COVID-19 lead from a life-threatening acute respiratory distress syndrome (ARDS), which is associated with a hyper-inflammatory microenvironment and injury in the alveolar and lung epithelium (7). One of the cells associated with this syndrome is an uncontrolled hyper-activated macrophage-associated syndrome (MAS), which promotes a systemic inflammatory response that exacerbates the progress of the cytokine storm in the host (8, 9). Furthermore, single-cell high-throughput technologies applied in COVID-19 infections have shown that macrophages and monocytes are more abundant over other immune cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (10–13). In addition, the cytokines produced by monocytes and macrophages modulate the response of the immune system in patients with COVID-19 (14–16). For instance, there is evidence supporting that monocytes in severe patients have a lower expression of the human leukocyte antigen HLA-DRB1, which represses the activation of the immune response through the low production of foreign peptides (17–19). Besides, monocytes have a lower expression of interferon-stimulated genes in severe COVID-19 patients, resulting in the delay of the

interferon response against SARS-CoV-2 (19). Furthermore, macrophages in severe COVID-19 patients are associated with overexpression of pro-inflammatory genes when compared with moderate COVID-19 patients (20). Altogether, these and other findings highlight the remarkable role that monocytes and macrophage polarization have in the progression of the disease.

Given the overwhelming complexity underlying the macrophage polarization during the SARS-CoV-2 infection, there is a need to develop computational/mathematical models to understand their regulatory principles and built testable hypotheses to lessen their lethal effect on human health. To this end, it is desirable that these mathematical models integrate transcriptional regulatory information and include the lung microenvironment for moving towards a global outlook of how SARS-CoV-2 and macrophages interact to favor the progression of the disease.

## A glance at COVID-19 mathematical models

While most of the mathematical models have been focused on the direction of epidemiology studies, some of them have been suggested to understand how the immune system responds to the lung when infected by SARS-CoV-2. Sadria et al. developed a system of ordinary differential equations (ODEs) that includes the two types of immune response: innate and adaptive. In this paper, the authors highlighted the relevance of the adaptive response through the mechanistic action of effector T and plasma cells, both considered the main factor to trigger the infection in the lung. Through their mathematical model, they explore the effect of three potential therapies and found that these have effective outcomes in the patient when applied in the early stages of the disease (21). In order to analyze more realistic models, Vaidya et al. (22) developed a mathematical model including parameters of infection in infected ferrets. To simplify the analysis, they incorporated one variable for the whole immune response as a soluble mediator of interferon type I, which has the ability to activate an antiviral response in macrophages (23). Given that the dynamics of infection of a ferret are shorter than humans and develop the same dynamics as the virus, this has been an interesting experimental model to explore how the virus infects host cells. Moreover, Li et al. developed a detailed multicompartamental mathematical model that integrated cytokine and immune cells in the peripheral blood and the trafficking to the lung. They focused on the activation of naive T/B cells by the antigen-presenting cells (APC) systems. The model predicted that a delay and an ineffective activation of T/B cells is associated with an increase in the viral load and that the constant absence of T/B cells is driven by myeloid-derived suppressor cells in severe patients of COVID-19 (24). Another compartmental model, calibrated with the viral charge of rhesus macaque infected with SARS-CoV-2,

simulated the anti-inflammatory and pro-inflammatory immune response and concluded that the spread of the SARS-CoV-2 virus can be controlled by enhancing an innate response with an antiviral drug (25). Chowdhury et al. constructed a model that incorporated the interaction between the naturalkiller (NK) and T cells and explored how these cells had the ability to eliminate the virus by the influx of NK cells. Despite NK cells are not the most abundant cell in the lung, this study points out the importance of a fast and precise response of the NK cells of the innate immune system given their ability to secrete mediators that neutralize virus division (26). From a systemic perspective, a multiscale model was pursued by Wanget al, who incorporated the action of the cytokine storm and effector T cells (6). This data-driven study demonstrated that interferon can prolong the incubation period of the virus in the absence of T cells when patients transit from mild to severe symptoms. Voutouri et al. assimilated the importance of neutrophils and the secretion of their extracellular traps (NET) and evaluated how they shape the dynamics of the adaptive immune response. Currently, most of these mathematical models suggest that a delay in T cell function is associated with severe symptoms in the patients (27). For instance, Voutouri et al. supplied evidence of the relevant role that T cells have in the hyper-activation of the immune response and the cytokine storm (27). Other mathematical models have focused on the action of an antiviral response over the immune system, establishing the bases for theoretical therapies (28). Overall, these papers highlight directly or indirectly that two variables are important in the development of COVID-19: the microenvironment (cytokine storm, fibrosis mediators) and the cells conforming the immune system. In agreement with this fact, some mathematical models have evaluated the dynamics of cytokines and antigens in severe COVID-19 patients with fine levels of regulatory details. For instance, Reis et al. (29) developed a mathematical model of a set of fifteen ODEs comprising T and B cells, antibodies, and cytokines. Besides, the action of APC cells was included to mimic the innate immune response. With this model, they demonstrated that an environment with high cytokine secretion favors the virus and can infect immune cells. Other mathematical models have focused on analyzing the dynamical origin of the cytokine storm in severe COVID-19 patients. Sasidharakurup et al. developed a system of ODEs that incorporated cytokines and explored how their dysregulation affects the insulin production, thrombosis and nitric oxide pathways (30). In their simulation, they found that the most abundant cytokines, like IL-1 $\beta$ , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), can imbalance the homeostasis of the body. As well, they concluded that cytokines had the ability to maintain a positive feedback with other immune cells, much of it deriving in an uncontrolled cytokine storm (30). On the other hand, most of these models confirm that the nuclear-factor B(NF $\kappa$ B) is a crucial component that modulates not only the immune cells but also the

inflammatory mediators. Notably, this transcription factor (TF) is activated in macrophages which is associated with an pro-inflammatory phenotype (31, 32). In reference (33) the authors developed a compartmentalized system of ODEs by which they assessed how detrimental is cytokine storm for healthy cells. In this last work, they simplified a single equation of all the possible cytokines that can be found in a COVID-19 inflamed lung. As a result, they concluded that the cytokine storm was the variable to focus with the therapies because it caused a decrease of healthy cells which made the recovery in severe patients harder (33). Furthermore, in reference (34) the authors developed a two-step system of ODEs whose variables represented the immune-cytokine and the standard SIV (susceptible-infected-virus) systems. Interestingly, they called attention to the fact that the cytokine storm may or may not be subject to a challenge of the immune system. In other words, they suggest some rare cases of individuals who develop a chronic infection without a storm-like immune-cytokine dynamics. This mathematical result suggests that the cytokine storm could be an individual-specific response to SARS-CoV-2, probably associated to factors such as the personalized genetic, sex, age and comorbidities in the patient. Undoubtedly, this last point requires more studies to be verified in clinical stages, a field that should be addressed in the next future (34). Altogether, this strongly suggest that fails in the immune system are responsible, directly or indirectly, for fomenting an augmentation in the cytokine storm. Despite monocytes and macrophages are the most abundant cell in an infected lung cell, to our knowledge there is no mathematical model that incorporates the transcriptional regulatory mechanism of macrophages for elucidating the dynamics in the progression of the disease.

## SARS-CoV-2 pathogenesis and its association with macrophage polarization

At present, the linkage between SARS-CoV-2 and the macrophage polarization can be summarized as follows. Macrophages sense the E protein of SARS-CoV-2 viral particles by using Toll-like receptor 2 (TLR2). Consequently, the activation of this receptor trigger downstream the mobilization of pro-inflammatory transcriptional factors that induce the secretion of IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  among others signals involved in the cytokine storm (35). In addition, other toll-like receptors (1,4,5,8 and 9) are highly expressed in severe COVID-19 patients which activate pro-inflammatory cytokines (36). Interestingly, toll-like receptor 7 (TLR7), essential to trigger an antiviral response through the secretion of type I IFN- $\alpha/\beta$ , increases in moderate COVID-19 patients. Meanwhile, in severe COVID-19 patients, TLR7 decreases its expression because SARS-CoV-2 has the ability to inhibit pathways associated with the secretion of IFN- $\alpha/\beta$  (37).

Macrophages not only produce pro-inflammatory cytokines, but they also can be a target for the virus. Once invaded by the virus, macrophages secretes IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-10, and cytokines that regulate the continuous activation of macrophages. The virus itself has developed structural and non-structural proteins to strictly inhibit the signaling towards the secretion of interferons. For example, open reading frame 3a (ORF3a) has the capacity to prevent the phosphorylation of STAT1, a TF associated with an interferon-based macrophage (38, 39). In addition, the M protein is associated with inhibiting the pathway of IFN- $\alpha/\beta$  and NFB, both pathways associated with the secretion of antiviral cytokines (40).

SARS-CoV-2 is not only the one factor that can trigger a hyper-inflammatory phenotype in macrophages, but also neutrophils and CD4+ T cells can stimulate the same response. Pro-inflammatory macrophage secretes IL-8, a potent chemoattractant for neutrophils (41, 42). Once in the lungs, they secrete extracellular traps (NET) to prevent pathogens from escaping the immune response, and the presence of an excess of NET is implicated in a poor outcome in COVID-19 (43). These NETs generate positive feedback between the cross-talk signals coming from macrophages and neutrophils, specifically NETs enhance the secretion of TGF- $\beta$  (11, 44) and IL-1 $\beta$ , which further recruits more neutrophils in the lungs. Due SARS-CoV-2 infection is associated with the secretion of reactive oxygen species, neutrophils tend to die and be consumed by inflammatory macrophages, secreting TGF- $\beta$  and IL-1 $\beta$  and creating a vicious cycle in favor of a pro-inflammatory environment (7). The secretion of TGF- $\beta$  polarizes macrophages to an M2 state associated with the secretion of pro-fibrotic mediators which is implicated with fibrosis in the lungs (11, 13, 44). On the other hand, CD4+ T cells secrete the granulocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) an activator of a pro-inflammatory macrophage (45), and the hyper-activation of macrophages is associated with the depletion of CD8+ T lymphocytes, which is correlated with disease severity (46, 47). Altogether, these mechanisms conform to a complex environment by which the virus modulates the phenotype of the macrophage toward a pro-inflammatory stage, a situation with lethal consequences in the human host.

## Future directions for macrophages targeting agents for reducing the severity of COVID-19

In our opinion, two factors will contribute to unveil the genetic mechanism that guides the response of macrophages facing the SARS-CoV-2 infection: the high-throughput technologies and the computational/mathematical model of regulatory networks. On one hand, the importance of

macrophages in COVID-19 has been evidenced thanks to the transcriptional profiles of thousands of single cells obtained from bronchoalveolar samples in COVID-19-infected patients (7, 20). Currently, these massive amounts of data can integrate the gene expression of thousands of genes in thousands of cells from a sample in time and space simultaneously (48). At this stage, the analysis of these data through machine learning (ML) algorithms can identify how the abundance of macrophages and other immunological cells could be associated with the progression and outcome of the disease. For example, by combining ML algorithms and single-cell RNASeq data from bronchoalveolar samples, we classified COVID-19 patients with different degrees of severity and found that genes associated with a pro-inflammatory response are implicated in severe COVID-19 patients (20). Besides, it has been reported that unsupervised hierarchical clustering is a proper method to stratify and classify patients through their severity progression determined by the pro-inflammatory, anti-inflammatory, and antiviral cytokines abundance data (49). By using this approach, the authors moved toward pragmatism and categorized an individual on its hospital admittance into high or low-risk categories (49). Simultaneously, other studies have been able to track immune cell subsets using an unsupervised algorithm (50). Another contribution of machine learning method in COVID-19 is that it enables us to track possible trajectories of differentiation from macrophages to T cells as the disease evolves. Specifically, these studies have concluded that the macrophage phenotypes changed with respect to disease severity, while T cells-related phenotypes did not. Macrophage phenotypes tilted to a more pro-inflammatory phenotype as severity increased (51). Finally, but not less important, some ML approaches have been used to differentiate flow cytometry profiles of blood samples from positive COVID-19 patients with respect to other diseases (like pneumonia) (52). On the other hand, the second factor that completes the global outlook is given by advanced techniques to gather biological data, and use them to build high-curated gene regulatory networks (GRN) in macrophages (32, 53). Finally, the computational modeling of these GRN constitutes an appealing framework to delimit the structure of the epigenetic landscape, this last a concept defined by Waddington in the mid-twentieth century (54). Notably, this last avenue was started some years ago with remarkable contributions in cancer to quantify the possible phenotype space for macrophages and its functional characterization in cancerous environments (32, 55). With the purpose to estimate the different phenotypes obtained from a GRN, a common approach is Boolean modeling. To simplify the complexity of the possible phenotypes emerging from the number of genes and their interactions in a GRN, this mathematical approach simplifies the description by considering two assumptions. First, one assumes that each gene can be in one of two feasible states: 0 (OFF) or 1 (ON). While the OFF state

means that a transcription factor or gene is inactive, ON indicates that the gene is active. Second, we determine the state of each gene in the network through a Boolean function, which mathematically is represented by the combination of the logical operators AND, OR, and NOT. As far as possible, these logical functions are constructed from the experimental in order to improve the phenotypic landscape obtained from the GRN in a study (56, 57). Despite the simplicity, the Boolean network approach can allow us to tackle a set of relevant questions in immunological cells ranging from how *in silico* perturbation influences specific phenotypes, to the identification of those variables with the highest relevance in the secretion of cytokines, and those that could trigger the cytokine storm. In a pragmatical sense, the Boolean network approach generates testable hypotheses to evaluate the role that macrophages have in the hyper-inflammatory process during a SARS-CoV-2 infection. Thus, this formalism establishes the bases to tackle a set of questions that comprise the macrophage ability to transit among distinct phenotypes to the design of optimized strategies for preventing the committed activation of macrophages during COVID-19. For example, if we understand how the cytokines, chemokines, and viral products in patients with COVID-19 affect the transcriptional polarization of macrophages, we can try to tilt the balance of the hyper-inflammatory scenario to a more hyper/regulatory inflammatory by perturbing specific TF. The implementation of this formalism can drive strategies to limit a hyper-inflammatory stage in macrophages and avoid cytokine storm, lymphopenia, thrombosis, or other complications related to COVID-19 (58). Finally, more than ever the development of mathematical and computational strategies that help us understand the molecular mechanism of COVID-19 at a systemic level is a required activity with invaluable benefits at a long time scale to move from associations to mechanistic explanations, both areas needed to overcome the pandemic situation that we face around the world.

## Discussion and conclusion

Understanding the physiological response that emerged from the complex interaction between macrophages and SARS-CoV-2, is a valuable aim to potentially design effective treatments against COVID-19. Given the complexity of this pandemic disease, Boolean network modeling is one of the feasible strategies for a better understanding of how the disease starts and progresses. In this article opinion, we have focused on the role that macrophages play in COVID-19 given predominant relative abundance onto other cells of the immune system. To this end, we need to construct a highly curated signaling network between SARS-CoV-2-derived factors and macrophages. Interestingly, previous GRN of

macrophages can help toward this purpose (32, 53, 55). Such a regulatory network should be able to condense well-known physiological knowledge of the macrophages and the information accumulated in the last years of the pandemic outbreak. We know that macrophages can be into two phenotypes: M1 and M2. M1 is associated with a pro-inflammatory phenotype while M2 is implicated with an anti-inflammatory phenotype. In an inflamed lung with SARS-CoV-2, there is an excessive amount of pro-inflammatory cytokines because of the cytokine storm. Pro-inflammatory macrophages (M1) are activated by TLR2 (which is activated by SARS-CoV-2) or by inflammatory cytokines like IL-6, IL1, TNF- $\alpha$  and IL-8 creating a positive feedback loop between the IL-6, IL1, TNF- $\alpha$  and IL-8 coming from the environment and those signals coming from the M1 macrophages. The TF responsible of the secretion of pro-inflammatory cytokines in macrophages is NF $\kappa$ B. Another TF associated with M1 macrophage is STAT1 implicated in secreting IFN- $\gamma$  and IFN- $\beta$ , both molecules associated with viral clearance of SARS-CoV-2 (59–61). STAT1 decreases its expression (if not stimulated with IFN- $\gamma$ ), thus NF $\kappa$ B, in the absence of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) seems to maintain the M1-polarized system with liberation of cytokines to enhance the cytokine storm. M2a macrophage is activated by IL-4 or IL-13, nevertheless IL-4 was higher in severity than mild COVID-19 (62, 63). Despite having a greater amount of IL-4 the number of M2 macrophages were lower in COVID19 than H1N1 patients, which means that most of the IL-4 is tilted to a TH2 response associated with lymphopenia (64). This being said, we need more macrophage polarization to an M2a type because it is associated with fibrogenic inflammatory remodeling, promoting the secretion of TGF- $\beta$  (which did not present any statistical difference between the comparisons (64)) allowing the formation of a temporary matrix and the proliferation of type II pneumocytes. M2c is a macrophage activated by IL-10, which is associated with the secretion of IL-10 and TGF- $\beta$ . However, recent evidence shows that if IL-10 is secreted at the early process of inflammation it may have the ability to induce a pro-inflammatory action instead of an anti-inflammatory behavior. Because it is in a hyperinflammatory state due to the cytokine storm, IL-10 tries to temper and prevent tissue damage, but fails to do so which has been reported in arthritis (65, 66). Another possibility of the fail of IL-10 is the presence of high glucose in the blood (associated with diabetes), studies have shown that macrophages cultivated in high glucose uptake are implicated in an IL-10 resistance implicating in the inability to inhibit the secretion of pro-inflammatory cytokines (67). This means that IL-10 has to be perfectly secreted in the precise time to avoid in the inability to inhibit a pro-inflammatory response, so we can diminish the concentration of IL-10 by inhibiting the

activation of M2c macrophages, and more macrophages associated with tissue repair. In conclusion, understanding how macrophages are regulated in a COVID-19 microenvironment could lead us to improve strategies to face this and future outbreaks. At present, the mathematical and computational models are invaluable schemes not only for understanding the molecular mechanism by which the SARS-CoV-2 evolves and transmit along the population, but also suggest strategies that in combination with health authorities help to decide the best actions for the benefit at local and global scales in the human population.

## Author contributions

All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

## Funding

The authors thank the financial support from PAPIIT-UNAM(IA202720). UA-P received a doctoral fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (CVU: 774988).

## Acknowledgments

UA-P is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This paper was written during his PhD studies.

## Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.





45. Kumar V. Macrophages: the potent immunoregulatory innate immune cells. *Macrophage Act Biol Dis* (2019). doi: 10.5772/intechopen.88013
46. Dhar, Vishnupriyan, Damodar, Gujar, Das. IL-6 and IL-10 as predictors of disease severity in COVID-19 patients: results from meta-analysis and regression. *Heliyon* (2021) 7:1–9. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06155.
47. Luo M, Liu J, Jiang W, Yue S, Liu H, Wei S. IL-6 and CD8+ T cell counts combined are an early predictor of in-hospital mortality of patients with COVID-19. *JCI Insight* (2020) 5:1–11. doi: 10.1172/jci.insight.139024
48. Dries R, Chen J, Del Rossi N, Khan MM, Sistig A, Yuan G-C. Advances in spatial transcriptomic data analysis. *Genome Res* (2021) 31:1706–18. doi: 10.1101/gr.275224.121
49. Mueller YM, Schrama TJ, Ruijten R, Schreurs MWJ, Grashof DGB, van de Werken HJG, et al. Stratification of hospitalized COVID-19 patients into clinical severity progression groups by immuno-phenotyping and machine learning. *Nat Commun* (2022) 13:915. doi: 10.1038/s41467-022-28621-0
50. Barone SM, Paul AGA, Muehling LM, Lannigan JA, Kwok WW, Turner RB, et al. Unsupervised machine learning reveals key immune cell subsets in COVID-19, rhinovirus infection, and cancer therapy. *bioRxiv* (2020). doi: 10.1101/2020.07.31.190454
51. Jeong H-H, Jia J, Dai Y, Simon LM, Zhao Z. Investigating cellular trajectories in the severity of COVID-19 and their transcriptional programs using machine learning approaches. *Genes* (2021) 12:635. doi: 10.3390/genes12050635
52. Gladding PA, Ayar Z, Smith K, Patel P, Pearce J, Puwakdandawa S, et al. A machine learning PROGRAM to identify COVID-19 and other diseases from hematology data. *Future Sci OA* (2021) 7:FSO733. doi: 10.2144/fsoa-2020-0207
53. Ordaz-Arias MA, Diaz-Alvarez L, Zúñiga J, Martínez-Sánchez ME, Balderas-Martínez YI. Cyclic attractors are critical for macrophage differentiation, heterogeneity, and plasticity. *Front Mol Biosci* (2022) 9:807228. doi: 10.3389/fmolb.2022.807228
54. Wang J, Zhang K, Xu L, Wang E. Quantifying the waddington landscape and biological paths for development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci* (2011) 108:8257–62. doi: 10.1073/pnas.1017017108
55. Palma A, Jarrah AS, Tieri P, Cesareni G, Castiglione F. Gene regulatory network modeling of macrophage differentiation corroborates the continuum hypothesis of polarization states. *Front Physiol* (2018) 9:1659. doi: 10.3389/fphys.2018.01659
56. Wang R-S, Saadatpour A, Albert R. Boolean modeling in systems biology: an overview of methodology and applications. *Phys Biol* (2012) 9:55001. doi: 10.1088/1478-3975/9/5/055001
57. Xiao Y. A tutorial on analysis and simulation of boolean gene regulatory network models. *Curr Genomics* (2009) 10:511–25. doi: 10.2174/138920209789208237
58. Pittet MJ, Michielin O, Migliorini D. Clinical relevance of tumour-associated macrophages. *Nat Rev Clin Oncol* (2022) 19:402–21. doi: 10.1038/s41571-022-00620-6
59. Kim Y-M, Shin E-C. Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection. *Exp Mol Med* (2021) 53:750–60. doi: 10.1038/s12276-021-00592-0
60. Guo K, Barrett BS, Morrison JH, Mickens KL, Vladar EK, Hasenkrug KJ, et al. Interferon resistance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* (2022) 119:1–32. doi: 10.1073/pnas.2203760119
61. Znaidia M, Demeret C, van der Werf S, Komarova AV. Characterization of SARS-CoV-2 evasion: Interferon pathway and therapeutic options. *Viruses* (2022) 14:1247. doi: 10.3390/v14061247
62. Hu H, Pan H, Li R, He K, Zhang H, Liu L. Increased circulating cytokines have a role in COVID-19 severity and death with a more pronounced effect in males: A systematic review and meta-analysis. *Front Pharmacol* (2022) 13:802228. doi: 10.3389/fphar.2022.802228
63. Merza MY, Hwaiz RA, Hamad BK, Mohammad KA, Hama HA, Karim AY. Analysis of cytokines in SARS-CoV-2 or COVID-19 patients in erbil city, Kurdistan region of Iraq. *PLoS One* (2021) 16:e0250330. doi: 10.1371/journal.pone.0250330
64. Vaz Paula, Azevedo, Nagashima. IL-4/IL-13 remodeling pathway of COVID-19 lung injury. *Sci Rep* (2020) 10(1):18689. doi: 10.1038/s41598-020-75659-5.
65. Ji J-D, Tassiulas I, Park-Min K-H, Aydin A, Mecklenbrauker I, Tarakhovskiy A, et al. Inhibition of interleukin 10 signaling after fc receptor ligation and during rheumatoid arthritis. *J Exp Med* (2003) 197:1573–83. doi: 10.1084/jem.20021820
66. Antoniv TT, Ivashkiv LB. Dysregulation of interleukin-10-dependent gene expression in rheumatoid arthritis synovial macrophages. *Arthritis Rheum* (2006) 54:2711–21. doi: 10.1002/art.22055
67. Barry JC, Shakibakho S, Durrer C, Simtchouk S, Jawanda KK, Cheung ST, et al. Hyporesponsiveness to the anti-inflammatory action of interleukin-10 in type 2 diabetes. *Sci Rep* (2016) 6:21244. doi: 10.1038/srep21244