Biblioteca Digital F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Desarrollo de una inmunoterapia contra el cáncer de mama mediante el bloqueo de stat3 (proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción 3)

Tkach, Mercedes

2013

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Tkach, Mercedes. (2013). Desarrollo de una inmunoterapia contra el cáncer de mama mediante el bloqueo de stat3 (proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción 3). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Tkach, Mercedes. "Desarrollo de una inmunoterapia contra el cáncer de mama mediante el bloqueo de stat3 (proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción 3)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013.

EXACTAS Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293 Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Química Biológica

Desarrollo de una inmunoterapia contra el cáncer de mama mediante el bloqueo de STAT3 (Proteína Transductora de la Señal y Activadora de la Transcripción 3)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica

Mercedes Tkach

Directora de Tesis: Dra. Roxana Schillaci Consejero de estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET

Buenos Aires, 2013

DESARROLLO DE UNA INMUNOTERAPIA CONTRA EL CÁNCER DE MAMA MEDIANTE EL BLOQUEO DE STAT3 (PROTEÍNA TRANSDUCTORA DE LA SEÑAL Y ACTIVADORA DE LA TRANSCRIPCIÓN 3)

La proteína transductora y activadora de la transcripción 3 (STAT3) es un nodo de señalización para múltiples vías oncogénicas y se encuentra frecuentemente activada en diversos tipos de cánceres, incluyendo el de mama. Las evidencias experimentales y clínicas vinculan a los progestágenos con la carcinogénesis mamaria. Por ello, estudiamos la participación de los progestágenos en la activación de STAT3.

En esta Tesis demostramos que los progestágenos inducen la fosforilación de STAT3 en el residuo serina 727 por medio de la activación de la vía c-Src/p42/p44 MAPK y que ésta fosforilación es necesaria para su completa activación transcripcional y para promover la proliferación tumoral mediada por progestágenos. Por otro lado, considerando que la inhibición de STAT3 en células tumorales induce la expresión de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, desarrollamos una inmunoterapia basada en la utilización de células de cáncer de mama que tienen inhibida la activación de STAT3 como inmunógeno. La administración de estas células nati-tumoral mediada por células T CD4⁺ y células NK citotóxicas que inhibió el crecimiento del tumor primario y la de sus metástasis. Además, la inhibición de la activación de probablemente con su fenotipo inmunogénico. Los resultados expuestos demuestran el papel crítico de STAT3 en la tumorigénesis mamaria inducida por progestágenos y proporcionan las primeras evidencias preclínicas que la inhibición de STAT3 en células de cáncer a de mama resulta en inmunoterapia eficaz contra el crecimiento tumoral.

Palabras clave: STAT3, receptor de progesterona, inmunoterapia, cáncer de mama, senescencia.

IMMUNOTHERAPY AGAINST BREAST CANCER TARGETING STAT3 (SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION 3)

Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) is a signaling node of multiple oncogenic pathways and is therefore frequently activated in breast cancer. As experimental and clinical evidence reveals that progestins are key players in controlling mammary gland tumorigenesis, we studied STAT3 participation in this event.

In this Thesis we demonstrate that progestins induce STAT3 phosphorylation at Ser727 residue which occurs via activation of c-Src/p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathways and that this phosphorylation is required for full transcriptional activation and for progestin-dependent tumor growth. Moreover, considering that STAT3 inhibition in tumor cells induces the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines, we proposed to apply Stat3-inhibited breast cancer cells as a source of immunogens to induce an antitumor immune response. Immunization with these cells inhibited wild-type tumor growth and metastasis *in vivo* in BALB/c mice through the activation of cellular immune responses involving CD4⁺ T cells and cytotoxic NK cells. Furthermore, inhibition of STAT3 activation induced a cellular senescence program, which probably contributes to the inmunogenic phenotype. The results presented here demonstrate the critical role of STAT3 in progestin-dependent mammary tumorigenesis and provide preclinical proof of concept that ablating STAT3 signaling in breast cancer cells results in an effective immunotherapy against breast cancer growth and metastasis.

Key words: STAT3, progesterone receptor, immunotherapy, breast cancer, senescence.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis doctoral han sido publicados en:

Tkach M, Rosemblit C, Rivas MA, Proietti CJ, Díaz Flaqué MC, Mercogliano MF, Beguelin W, Maronna, E, Guzmán, P, Gercovich FG, Gil Deza E, Elizalde PV, Schillaci R. **p42/p44 MAPK-mediated Stat3 Ser727 Phosphorylation is Required for Progestin***induced Full Activation of Stat3 and Breast Cancer Growth* Endocrine-Related Cancer, 2013, 17 de enero. PMID:23329648

Tkach M, Coria L, Rosemblit C, Proietti CJ, Rivas MA, Díaz Flaqué MC, Beguelin W, Frahm I, Charreau EH, Cassataro J, Elizalde PV, Schillaci R. **Targeting Stat3 induces** senescence in tumor cells and elicits prophylactic and therapeutic immune responses against breast cancer growth mediated by NK cells and CD4⁺ T cells J Immunol. (2012) 189: 1162-72. PMID:22753933

AGRADECIMIENTOS

Me es muy difícil plasmar en unas pocas palabras todo lo que significaron las distintas personas que me acompañaron durante esta Tesis, pero voy a hacer mi mejor intento. En primer lugar quiero agradecer a mi directora de Tesis, la Dra. Roxana Schillaci. Gracias Rox por tanto apoyo y tanta dedicación. Gracias por estar siempre dispuesta a darme una mano con lo que sea necesario, sin toda tu ayuda no hubiese llegado a hacer ni la mitad de las cosas que hice. Gracias por enseñarme tantas cosas durante todos estos años, por ser una directora tan presente, por escucharme, por darme total libertad a la hora de pensar, de idear un experimento, por engancharte en mis ideas locas y por proponer otras tantas. Pero ante todo, muchas gracias por guiarme y por hacer del laboratorio un lugar placentero.

A la Dra. Patricia Elizalde, gracias por darme un lugar dentro de su grupo. Gracias por su compromiso y dedicación para llevar adelante nuestro grupo de trabajo.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por su constante formación, por su excelencia, por la maravillosa dedicación de sus docentes y por ser mi segundo hogar durante tantos años. Especialmente al Dr. Juan Carlos Calvo, por haber sido mi consejero de Tesis y por estar siempre dispuesto a atender mis inquietudes.

Al Dr. Alfredo A. Molinolo por su constante apoyo y ayuda, a la Dra. Claudia Lanari por proveernos del modelo tumoral C4HD y al Servicio de Patología y Biología Molecular del Sanatorio Mater Dei, especialmente a la Dra. Isabel Frahm y al Dr. Esteban Maronna por su constante ayuda con las patologías.

Al CONICET por el apoyo económico a lo largo de mi Tesis y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), a Roemmers, al Instituto Henry Moore y a *Susan Komen for the cure* por financiar la investigación que dio como resultado esta Tesis.

A Lorena Coria y Juliana Cassataro por compartir su conocimiento con nosotras, por la discusión del trabajo y por ayudarnos con las mediciones de citoquinas y citometrías de flujo.

Gracias al Instituto de Biología y Medicina Experimental, al Dr. Eduardo Charreau y a toda su gente por hacer del instituto un lugar cálido y agradable. Gracias al Dr. Gabriel

Rabinovich por su constante ayuda, a todo su grupo de trabajo, por los reactivos prestados y por hacer de los pasillos del instituto un lugar divertido. A los chicos del laboratorio de Claudia Lanari, por tantas horas compartidas en el cuarto de cultivo. Y al resto de las personas del IBYME que tanta buena onda le ponen al Instituto.

A mis compañeros de laboratorio, Ceci, Franco, Lean, Flor, Naty y Rosalia. Gracias por tanta buena predisposición y por hacer que el laboratorio sea un lindo lugar de trabajo. Gracias Ceci por los aportes contantes a mi trabajo y al laboratorio. Gracias Flor por la ayuda de estos últimos meses.

A Cele, gracias por estar siempre tan dispuesta a ayudarme con lo que sea, por escucharme, por ser una gran compañera de trabajo y amiga.

A mis "viejos" compañeros de laboratorio, Wendy, Cinthia, Rocío y Flor. Gracias por toda su ayuda día a día en el laboratorio. Gracias Wen por tanta discusión científica, y por tantas otras historias compartidas fuera del lab.

A Martin, persona que merece un agradecimiento aparte. Martín fue mucho más que mi compañero de mesada a lo largo de todo mi doctorado (salvo este último año, snif!). Gracias Martín, por no ser solo una "máquina de westerns perfectos", sino por compartir conmigo todos esos secretos. Por enseñarme gran parte de lo que se, por las discusiones científicas y aún más por las no científicas, por el compañerismo, por el apoyo, por transmitirme su pasión por lo que hace, por ser un modelo de persona a seguir. Una vez leí que yo le había transmitido mucho más a él de lo que él a mí, ipero qué lejos está eso de ser así! Martin me dejó una impronta que me va a acompañar siempre, así como espero que él también lo haga.

A mis amigos de la facultad, a todas aquellas personas con las cuales compartimos horas y horas de cursada, de estudio y por sobre todo, de compañía, diversión, charlas, salidas e incluso viajes. A pesar de que los años pasan, seguimos continuamente forjando esta gran amistad. Gracias por estar, por hacerme reir tanto, por permitirme disfrutar junto a ustedes tantas cosas. Gracias Rafa y Guille, por ser mis amigos y compañeros de aventuras, por las horas de charlas filosóficas, discusiones científicas, por enseñarme un poquito más de la vida, por ser personas a las que admiro. ¡Gracias por tantas idas a Carmen! Gracias Nico, por tu dedicación y preocupación siempre con todo, por tu responsabilidad, por tu compañerismo y amistad infinitos. A Charly, otro gran compañero de aventuras con quien viví cosas hermosas, gracias por tantas charlas compartidas. Gracias Chechu por tanto "pasillo del Ibyme" conmigo, por compartir nuestras historias, nuestros problemas del día a día y nuestras buenas nuevas. Gracias Manu, Cris, Cami, Agos, Ali, Ceci, Marcos, Toti, Yas, Rasco y Belu. Gracias a las otras tantas personas más que me acompañaron de algún u otro modo a lo largo de estos años. Gracias a ustedes por tantas salidas juntos, por tantas comilonas, por tantas alegrías. Todas estas historias que esbozo sin duda me permiten ser quien soy hoy y haber logrado las cosas que hice, gracias a su apoyo constante y compañía. Por último, gracias por bancar a esta porteña, la menos porteña de todas como dicen algunos...

A mis amigas del alma, Manu, Juli, Fer, Malala, Caro, Vachu, Tucu y Tini. Gracias por seguir estando día a día en mi vida, por acompañarme, por alegrarse conmigo, por preocuparse por mí, por ser tan buenas amigas. Gracias por los viajes, por las pequeñas escapadas, por los tés, las salidas, las charlas, chusmerios y demás. Gracias por estar constantemente apoyándome en mis decisiones y en mis locas (y no tan locas) aventuras. Gracias por bancarme tanto en este último raid, momento de mayores cambios en mi vida, tesis, casamiento, otra vez tesis, fiesta, viaje y para finalizar ida a vivir a otra parte del planeta, que sin dudas sin su apoyo incondicional me sería mucho más difícil. Gracias Ceci, por estar siempre presente, por escucharme, por mantener viva nuestra amistad a lo largo de los años.

A mi mamá y mi papá, por dejar libremente que tome mis decisiones, por guiarme, por aprender conmigo y acompañarme constantemente en este recorrido. Gracias por apoyarme y ayudarme. A mi hermana Lucía, gracias Lu por estar presente en todo lo que hago, por acompañarme, por compartir mis alegrías y mis tristezas. Gracias por estar a mi lado siempre y por toda tu ayuda. Gracias a los tres por tan lindos momentos juntos. Gracias a mis abuelos, algunos todavía presentes y otros no. Gracias a todos ellos por la hermosa infancia que tuve a su lado y por seguirme acompañando. Gracias Goyo por ser un ejemplo de vida y la historia misma en persona.

A Lean, mi amor que dejó de ser platónico hace muchos años. Gracias por estar siempre a mi lado, por ayudarme a crecer desde todos los puntos de vista posibles. Gracias por ser el compañero de aventuras que elijo día a día y por elegirme vos también. Gracias por ser tan maravilloso conmigo, por cuidarme tanto, por ayudarme inmensamente con todo, inclusive durante el desarrollo experimental y la escritura de

esta Tesis. Gracias por enseñarme a cuestionar las cosas, a preguntar más, a no dar las cosas por sentado. Gracias por este profundo amor.

iiiiiMUCHAS GRACIAS!!!!!!



ABREVIATURAS	5
INTRODUCCION GENERAL	7
1. CÁNCER DE MAMA	7
2. CANCER DE MAMA Y PROGESTÁGENOS	8
3. PROTEINAS TRANSDUCTORAS DE SEÑALES Y ACTIVADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN (STATS)	10
3.1. Miembros de la familia	. 11
3.2. Mecanismos de acción de las proteínas STATs	. 12
3.3. STAT3 como regulador de la transformación celular	14
4. STAT3 y CANCER DE MAMA	15
MATERIALES Y MÉTODOS	18
1. METODOLOGÍA GENERAL	18
Animales	. 18
Tumor C4HD	18
Cultivos primarios de células eniteliales C4HD	. 19
Progestágeno	20
Líneas celulares	. 20
Inhibidores farmacolóaicos	. 21
Ensavo de Western blot	. 21
Plásmidos	. 23
Transfecciones transientes	. 24
Transfecciones con ARN de interferencia (siRNA)	. 25
Inmunofluorescencia y microscopía confocal	. 25
Ensayos de proliferación por incorporación de timidina-[³ H] en células C4HD, T-47D y Ml	DA-
MB-231	. 26
2. METODOLOGIA ESPECIFICA CAPITULO I	27
Ensayo de fosforilación in vitro con ATP no radioactivo	. 27
Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	. 28
Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	. 30
Crecimiento in vivo del tumor C4HD transfectado con STAT3S727A-GFP	. 30
Pacientes y micro arreglos de tejido (TMA)	. 30
Immunofluorescencia de tejidos	. 31
3. METODOLOGÍAS ESPECIFICAS DEL CAPÍTULO II	32
3.1. Experimentos <i>in vivo</i> capítulo II	. 32
4. METODOLOGÍAS ESPECÍFICAS DEL CAPÍTULO III	43
Evaluación de la enzima β-galactosidasa (β-gal) a pH 6,0	. 43
Extracción de ARN, transcripción reversa y PCR en tiempo real	. 44
INTRODUCCION (CAPITULO I)	46
1. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA	46

2	. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA	47
3	2.1. Efectos genómicos 2.2. Efectos no genómicos 8. RECEPTOR DE PROGESTERONA Y CÁNCER DE MAMA	47 49 51
4	. STAT3 Y PROGESTERONA	52
5	. FOFORILACION DE STAT3 EN SERINA	55
6	5.1. Los sitios de fosforilación en serina de STATs están en su dominio de activación transcripcional 5.2. Quinasas que participan en la fosforilación en serina de STAT3 5. CICLINA D1 Y CÁNCER DE MAMA	55 56 .57
C	DBJETIVOS ESPECIFICOS	59
RES	SULTADOS (CAPÍTULO I)	60
1	 El acetato de medroxiprogesterona (MPA) induce la fosforilación STAT3 en el residuo serina 723 60 	7
2 1	e. El MPA induce la fosforilación de STAT3Ser727 a través de la vía de señalización de c-Src/p42/p NAPK	44 62
3 S	8. MPA requiere la fosforilación de STAT3Ser727 para lograr máxima activación transcripcional de TAT3	2 66
4 p	. La fosforilación de STAT3Ser727 participa en el mecanismo de expresión de ciclina D1 inducida por MPA	67
5	. La fosforilación de STAT3Ser727 es requerida para la unión de STAT3 al promotor de ciclina D1.	70
6 n	5. La fosforilación de STAT3 en Ser727 es esencial para la proliferación de células de cáncer de nama progestágeno-dependiente	.71
7 n	7. El bloqueo de la fosforilación de STAT3 en Ser727 inhibe el crecimiento in vivo de tumores namarios	73
8	. La fosforilación de STAT3 en Ser727 se asocia con la expresión de RP en carcinomas invasivos	75
INT	RODUCCIÓN (CAPITULO II)	82
1	BREVE INTRODUCCIÓN AL SISTEMA INMUNE	82
2	. INMUNIDAD TUMORAL	84
3	 2.1. Efectores de la inmunidad anti-tumoral 2.2. Acción de los linfocitos T CD4⁺ en la inmunidad anti-tumoral 2.3. Estrategias inmunosupresoras mediadas por células tumorales 3. STAT3 E INMUNOSUPRESIÓN TUMORAL 	85 87 88 89
4	. INMUNOTERAPIAS DIRIGIDAS CONTRA EL CÁNCER	92
4	.1. Terapia con anticuerpos monoclonales	93

4.2. Inmunoterapias no específicas	
4.3. Vacunas anti-tumorales	
4.3.1. Vacunas basadas en células enteras	
OBJETIVO GENERAL (CAPITULO II)	98
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	98
RESULTADOS (CAPÍTULO II)	99
1. Estudio de la secreción de mediadores inflamatorios en células tumorales que tienen blo activación de STAT3	oqueada la 99
2. Efecto anti-tumoral de la inmunización con células tumorales que tienen bloqueada la a STAT3	ctivación de 101
3. La inmunización con células C4HD transfectadas con STAT3Y705F no involucra inmunida humoral	d de tipo 106
4. La inmunización con células C4HD-STAT3Y705F induce inmunidad de tipo celular	108
5. La inmunización con células C4HD-STAT3Y705F gatilla una respuesta inmune T-dependie	ente 109
6. Las células T CD4 ⁺ y las células NK están involucradas en la respuesta inmune anti-tumo por la inmunización con células que expresan STAT3Y705F	ral inducida 110
7. La inmunización con células tumorales que expresan una variante dominante negativa d inespecífica	e STAT3 es 116
8. Los esplenocitos de ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F proliferan y pro citoquinas en respuesta al antígeno	ducen 117
9. Rol de las células NK como efectoras de la citotoxicidad anti-tumoral	
10. Efecto terapéutico de la inmunización con células tumorales que expresan STAT3Y705F	[:] 126
INTRODUCCIÓN (CAPITULO III)	133
1. SENESCENCIA CELULAR	133
 Senescencia replicativa	
3. SENESCENCIA Y STAT3	140
OBJETIVOS (CAPÍTULO III)	142
Objetivos específicos:	142
RESULTADOS (Capítulo III)	143
1. La inhibición de STAT3 está asociada a un aumento de marcadores de senescencia celula	ar143
2. La inactivación de STAT3 produce cambios en la estructura de la cromatina	146

3. La inhibición de la proliferación de cáncer de mama por inactivación de STAT3 depende de la	
inducción de senescencia celular	. 147
4. La inhibición de STAT3 induce senescencia en células de cáncer de mama humano	. 149
DISCUSION (CAPITULO I)	. 153
DISCUSIÓN (CAPITULO II)	. 159
DISCUSIÓN (CAPÍTULO III)	. 169
ANEXO	. 175

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico maduro, mensajero

ChIP: inmunoprecipitación de la cromatina

DBD: dominio de unión al DNA

DE: Desviación estándar

ES: Error estándar

Ig: inmunoglobulina

IP: inmunoprecipitación

Jaks: Janus activated kinases

LT: linfocitos

MAPKs: proteínas quinasas activadas por mitógenos

MPA: acetato de medroxiprogesterona

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RT: retrotranscripción

qPCR: PCR en tiempo real

PBS: buffer fosfato salino

PR: receptor de progesterona

PR-A: isoforma A del receptor de progesterona

PR-B: isoforma B del receptor de progesterona

PRE: elemento respondedor a progesterona

SA-β-Gal: β-galactosidasa asociada a senescencia

SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

SFB: suero fetal bovino

SFBch: Suero fetal bovino libre de esteroides por adsorción con carbón activado o charcolizado"

SH2: dominio SRC homology 2

SH3: dominio SRC homology3

siRNA: RNA corto de interferencia

STAT: proteína transductora de señales y activadora de la transcripción

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

WB: Western Blot

Nensio A INTRODUCCIÓN

FACULTAD

105

GENERAL

INTRODUCCION GENERAL

1. CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es una enfermedad con una altísima incidencia, siendo el tipo de cáncer más frecuente en la mujer en el mundo entero y la segunda causa de muerte por cáncer, luego del cáncer de pulmón. De acuerdo con los datos oficiales, en Argentina se estima que 18.712 mujeres son diagnosticadas con cáncer de mama por año. El Ministerio de Salud de la Nación, reportó que la mortalidad anual por cáncer de mama en Argentina asciende a 18,31 casos por cada 100.000 mujeres, significando esto alrededor de 5.417 muertes por año por esta enfermedad (Instituto Nacional del Cáncer http://www.msal.gov.ar/inc/equipos analisis.asp). Por su parte, el National Cancer Institute (NCI) estima que a una de cada ocho mujeres que viva hasta los 85 años se le diagnosticará cáncer de mama durante su vida. La mortalidad por cáncer de mama ha disminuido en los últimos años en los países desarrollados gracias al diagnóstico precoz, a los mejores esquemas de tratamiento disponibles y la reciente reducción de la incidencia. Sin embargo, en los países subdesarrollados o en vías de desarrollo esta tendencia se ha revertido: el escaso acceso a planes de cobertura médica, a tratamientos personalizados de avanzada y mejores herramientas de diagnóstico, así como también la co-existencia de infecciones en situaciones de pobreza, impiden que los últimos avances se traduzcan en una mejora del tratamiento de la enfermedad.

El diagnóstico del cáncer de mama se lleva a cabo por estudios histopatológicos que incluyen la determinación de los receptores de estrógenos y progesterona y la sobreexpresión del receptor tirosina quinasa ErbB2 en la membrana de las células tumorales realizados en la biopsia del tumor del paciente. También los cánceres se clasifican en estadíos clínicos de I a IV teniendo en cuenta el tamaño tumoral, compromiso ganglional y metástasis a distancia (NCI, <u>http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/healthprofessional/page3</u>). Es así que la sobrevida a cinco años es del 83,8/ cuando se detectan metástasis ganglionares al diagnóstico y solo del 22,3/ cuando las metástasis son a distancia (Maxmen 2012). A partir del diagnóstico

Página |8

histopatológico y el estadio clínico, se siguen distintos tratamientos como tumorectomía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal o terapias dirigidas contra blancos específicos, como es el caso del uso del anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin[®]) contra el ErbB2, miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico. Sin embargo, el fracaso de las terapias se refleja por la recurrencia de la enfermedad que es del 30/ en estadíos I-II, y alcanza al 70/ en estadio III. Por ello, es importante conocer los mecanismos que promueven la proliferación tumoral e investigar terapias innovadoras para poder ofrecer alternativas terapéuticas a los pacientes afectados con este mal.

2. CANCER DE MAMA Y PROGESTÁGENOS

Según datos epidemiológicos la incidencia del cáncer de mama no sólo aumenta con la edad sino que la mayor tasa de incremento ocurre durante los años reproductivos (Bernstein, et al. 2002; Pike & Spicer, 2000) observándose un marcado pico de incidencia en la etapa de la premenopausia. Este aumento en la incidencia estaría causado por los efectos acumulativos provocados por la proliferación que inducen los esteroides sexuales ováricos sobre el epitelio mamario (Henderson & Feigelson 2000). Con cada sucesivo ciclo menstrual, la proliferación de las células del epitelio mamario, dirigida por los esteroides sexuales, puede resultar en la adquisición progresiva de mutaciones somáticas en el linaje celular, lo cual conduciría a la transformación y progresión neoplásica. Esta hipótesis está avalada por la observación de que una menarca tardía (Apter et al., 1989; Apter & Vihko 1983) o una menopausia temprana (Pike & Ross 2000; Trichopoulos et al., 1972) se correlacionan con una reducción del riesgo de cáncer de mama. En ambas situaciones, se minimiza la exposición del epitelio mamario a los esteroides sexuales a lo largo de la vida. De los esteroides ováricos, los estrógenos fueron considerados tradicionalmente los principales esteroides sexuales involucrados en la proliferación del epitelio mamario y por extensión en la progresión de dicho linaje al fenotipo neoplásico (Bernstein & Ross 1993; Henderson & Feigelson 2000). Basándose en el efecto antiproliferativo que la progesterona tiene en el endometrio, en contraposición a los estrógenos, se asumió que la progesterona ejercería similares efectos inhibitorios en el epitelio mamario y, por lo tanto, no

contribuiría significativamente a la iniciación o progresión tumoral (Lydon, et al., 2000). No obstante, con estos indicios ha sido difícil explicar por qué el índice proliferativo del epitelio mamario era más alto durante la fase luteal del ciclo menstrual dominada por la progesterona (King, et al, 1993), por qué la inclusión de progestágenos en los protocolos de terapia de reemplazo hormonal (HRT por sus siglas en inglés, Hormone Replacement Therapy) incrementó la densidad de las células epiteliales mamarias con respecto a la administración de estrógenos solos (Haslam, et al., 2002; Hofseth et al., 1999), por qué los progestágenos combinados en anticonceptivos orales podían prevenir el cáncer de ovario y endometrio pero no el de mama (Pike & Spicer 2000), o por qué un gran número de ensayos clínicos mostraron un leve pero significativo aumento en el riesgo de cáncer de mama cuando el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) fue incluido en los regímenes de HRT (Chlebowski, et al., 2003; Magnusson et al., 1999). En particular, el ensayo Women's Health Initiative Randomized Trial, cuyo objetivo fue determinar la relación entre el uso de estrógenos y progesterona y el cáncer de mama en más de 16.000 mujeres postmenopáusicas en Estados Unidos, debió ser detenido antes de la finalización del protocolo previsto. Esta determinación se tomó debido a que las estadísticas para cáncer de mama invasivo, excedieron los límites permitidos para este efecto adverso (Chlebowski et al. 2003). Finalmente, los resultados del estudio clínico The Million Women Study, que investigaba la relación entre distintos patrones de uso de HRTs e incidencia de cáncer de mama y mortalidad en más de un millón de mujeres inglesas, permitió interpretar efectivamente que las HRTs que incluían progestágenos están asociadas a un aumento en el riesgo de cáncer de mama respecto a las que incluyen sólo estrógenos (Beral 2003).

Los efectos de la progesterona en la glándula mamaria son controversiales debido a la complejidad estructural y funcional de este órgano. Dependiendo del modelo experimental, del contexto celular y de la duración del tratamiento, la progesterona puede ejercer efectos proliferativos o antiproliferativos en el crecimiento del epitelio mamario. Se ha hipotetizado que, luego de una ronda de proliferación, el pulso inicial de progesterona actúa como un factor iniciador para las acciones de factores secundarios involucrados en vías proliferativas, de diferenciación o apoptóticas. Entonces, serían los múltiples factores secundarios que regulan el

crecimiento y desarrollo de un tumor de mama, en combinación con la progesterona, los que contribuyen con esta variedad de efectos (Lange, et al 1999).

El concepto primitivo que consideraba a los estrógenos inductores y a la progesterona protectora en el carcinoma mamario se encuentra actualmente y, a la luz de las explicaciones antes citadas, en proceso de revisión. Los riesgos y beneficios asociados con la progesterona y los progestágenos sintéticos requieren una mejor comprensión de su función en la biología de células de mama normales y en la desregulación que ocurre en los tumores malignos de mama.

Muchos trabajos, incluyendo los de nuestro laboratorio, demostraron que existe una interacción entre las hormonas esteroideas y las vías de señalización de los factores de crecimiento, las cuales en un principio, se describían como procesos independientes (Béguelin et al. 2010b; Carnevale et al. 2007; Labriola et al. 2003; Lange et al., 2000; Proietti et al. 2009; Real et al. 2002).

De hecho, los pacientes que tienen tumores que expresan receptores de estrógenos y progesterona, son beneficiados con la terapia antihormonal. Sin embargo algunos tumores igual progresan adquiriendo características de hormono-resistencia. Esto es probable que suceda debido a que los factores de crecimiento toman el control del crecimiento tumoral, no sólo porque son capaces de activar vías de señalización mitogénicas sino también porque pueden transactivar a los receptores esteroideos. En este sentido, la familia de proteínas transductoras de señales y activadoras de las transcripción (STATs) está involucrada en la interacción entre hormonas esteroideas y factores de crecimiento (De Miguel, et al. 2003; Stoecklin, et al. 1999; Zhang, Jones, Hagood, Fuentes, & Fuller, 1997). Esta interacción es bidireccional y STAT3 constituye un nodo de convergencia entre la señalizacion de los factores de crecimiento y hormonas esteroideas (De Miguel et al. 2003; Stoecklin et al. 1999; Zhang et al. 1997).

3. PROTEINAS TRANSDUCTORAS DE SEÑALES Y ACTIVADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN (STATS)

3.1. Miembros de la familia

Las proteínas STATs se identificaron originalmente como factores de transcripción críticos en la mediación de la señalización por citoquinas. Se han identificado 7 genes codificantes para STATs en mamíferos: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6 (Bromberg & Darnell 2000). Además, reacciones de *splicing* alternativo o de proteólisis, generan formas adicionales de STAT1 (STAT1α o p91 y STAT1β o p84) y STAT3 (STAT3α y STAT3β). Las proteínas resultantes contienen entre 750 y 850 aminoácidos y la estructura de sus 6 dominios es altamente homóloga y conservada (Figura 1).



Figura 1. *Representación esquemática de los dominios estructurales de los miembros de la familia de proteínas STATs.* El dominio amino (N) terminal está involucrado en las interacciones proteína-proteína. El dominio de unión al ADN hace contacto directo con sitios consenso TT(N4-6)AA en los promotores de los genes regulados. La interacción entre el dominio SH2 de un monómero y el residuo fosfotirosina (pY) de otro media la formación del dímero activo. El dominio de transactivación está involucrado en la activación transcripcional de los genes blanco a través de interacciones con correguladores. El dominio carboxi terminal contiene un sitio de fosforilación en serina que estimula la activación transcripcional en algunos miembros de la familia. Tomado de Yu y Jove 2004.

3.2. Mecanismos de acción de las proteínas STATs

Las STATs funcionan como moléculas señalizadoras en el citoplasma y como factores de transcripción luego de su translocación al núcleo (Bromberg & Darnell 2000; Yu & Jove 2004). La unión de factores de crecimiento (Olayioye et al. 1999; Ren & Schaefer 2002; Silvennoinen et al. 1993) o de citoquinas a sus receptores resulta en la activación de la actividad tirosina quinasa intrínseca del receptor o de las quinasas intracelulares asociadas al receptor, como quinasas de la familia de Janus (Jaks) o de Src (Darnell, et al. 1994; Taga & Kishimoto 1997). Estas quinasas fosforilan las colas citoplasmáticas de los receptores en residuos tirosina específicos, que proveen sitios de anclaje para el reclutamiento de monómeros de STATs por sus dominios SH2. Las STATs reclutadas son fosforiladas en residuos tirosina específicos en el dominio carboxi-terminal y forman homo o heterodímeros activos por interacción recíproca a través del residuo fosfotirosina y del dominio SH2, que deben ser mutuamente compatibles. Las STATs fosforiladas dimerizan y translocan al núcleo, donde a través de su dominio de unión al ADN, reconocen su secuencia específica en el ADN y regulan la transcripción génica (Figura 2). Debido a que las STATs pueden conservar la habilidad de unirse a la misma secuencia altamente conservada, hay una notable superposición en el sitio de reconocimiento en el ADN entre STAT1, STAT3 y STAT5 (Decker & Kovarik 2000).





El patrón de activación de las STATs suele ser específico del ligando y del tipo celular. En las células normales, y bajo condiciones fisiológicas, la activación de las proteínas STATs es rápida y transitoria, ya que su activación se encuentra finamente regulada por varias familias de proteínas como SOCS (proteína supresora de la señalización de citoquinas) y PIAS (proteína inhibidora de STATs activadas) (Shuai 2000). Dado que la actividad de las STATs está regulada por varias modificaciones post-traduccionales y por interacciones proteína-proteína, estos factores de transcripción son capaces de integrar señales de múltiples redes de señalización. Debido a la gran variedad de ligandos y factores de crecimiento capaces de activarlas, las STATs están involucradas en un gran espectro de eventos celulares incluyendo diferenciación, proliferación, apoptosis, angiogénesis y respuesta inmune (Ren & Schaefer 2002; Silva 2004).

3.3. STAT3 como regulador de la transformación celular

STAT3 regula una serie de vías importantes en la tumorigénesis. Se han encontrado sitios de unión de STAT3 en los promotores de genes cuyos productos están involucrados en la progresión del ciclo celular y la apoptosis (c-fos, c-Myc, ciclina D1) (Bromberg et al., 1999; Leslie et al., 2006) y en la angiogénesis tumoral (factor de crecimiento del endotelio vascular, VEGF) (Niu et al. 2002). Se probó además que STAT3 participa en los procesos de invasión y metástasis (Yu & Jove 2004). Los mecanismos a través de los cuales las STATs promueven eventos pro-tumorigénicos constituyen un área de activa investigación. La fosforilación de las STATs está finamente regulada y la perturbación del delicado balance de las STATs activas en las células podría predisponer a la malignización mediante la desregulación de la apoptosis o la proliferación.

Se ha encontrado activación constitutiva y persistente de STAT3 en una gran variedad de tumores humanos, entre ellos de mama, y en líneas celulares establecidas a partir de tumores humanos (Bowman & Jove 1999). En particular, STAT3 está constitutivamente activa en el 69/ de cánceres de mama (Dolled-filhart, et al. 2003), en el 82/ de cánceres de próstata (Mora et al. 2002), en el 82/ al 100/ de carcinomas de cabeza y cuello (Nagpal et al., 2002) y en el 71/ de carcinomas nasofaríngeos (Hsiao et al. 2003). Además, se ha demostrado que STAT3 es requerida para la transformación de los fibroblastos NIH 3T3 por una serie de oncogenes, como v-src (Bromberg, et al. 1998), y para la proliferación tumoral. De hecho, una forma mutante constitutivamente activa de STAT3, STAT3-C, (que dimeriza espontáneamente por puentes cisteína-cisteína en vez de por interacciones fosfotirosina-SH2) es suficiente para inducir la formación tumoral en ratones *nude* cuando se inoculan células transfectadas con

STAT3-C (Bromberg et al., 1999). Tales hallazgos reafirman la concepción de STAT3 como un mediador en el proceso de transformación maligna.

Los efectos de STAT3 activo son muy diferentes según el tipo celular. En particular, STAT3 puede ser una señal de muerte para las células epiteliales secretoras de la mama normal (Watson 2001) en comparación con los efectos opuestos de STAT3 en carcinomas mamarios. Una de las razones de estos efectos paradójicos puede deberse a que, mientras que la activación de las STATs es un proceso transiente en células normales, la sobreexpresión o activación persistente de tirosina quinasas en cáncer puede provocar la activación constitutiva de las STATs. De hecho, hasta ahora, no se han reportado mutaciones naturales de STAT3 que resulten en su activación persistente. Por lo cual, es probable que la generalizada activación de STAT3 en líneas celulares de cáncer y en tejidos sea debido a un mal funcionamiento de los eventos de señalización río arriba de STAT3. Se sabe que son numerosos los receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca que pueden activar a STAT3, como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el ErbB2, el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, (PDGFR) y el receptor de VEGF (VEGFR). En las células tumorales, muchos de estos receptores se encuentran constitutivamente activados, ya sea por el resultado de mutaciones que afectan su estructura, o debido a su sobreexpresión o ya sea por la continua activación por ligandos autócrinos o parácrinos, dando como resultado una continua señalización de activación de STAT3. Esto produce cambios permanentes en la expresión de genes que controlan procesos biológicos fundamentales, y lleva a cambios en el fenotipo celular (Yu & Jove 2004).

4. STAT3 y CANCER DE MAMA

Como mencionamos, STAT3 se encuentra activo en más del 50/ de los tumores primarios de mama, en sus cultivos primarios y en varias líneas celulares derivadas de tumores mamarios como MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MDA-MB-435 (Bromberg, 2002; Cotarla et al., 2004; Dechow et al., 2004; Dolled-filhart et al., 2003; Leslie et al., 2006; Vultur et al., 2004).

La evidencia que indica que STAT3 participa en el desarrollo de la tumorigénesis mamaria proviene de ensayos en donde muestran que la expresión de la forma constitutivamente activa de STAT3 (STAT3C) en células epiteliales mamarias humanas inmortalizadas y en células MCF-10 produjo su transformación (Dechow et al. 2004). Por otro lado, el tratamiento de células de cáncer de mama humano in vitro e in vivo, con el inhibidor farmacológico S3I-201 que inhibe la dimerización de STAT3, su unión al ADN y su actividad transcripcional, inhibe la expresión de ciertos genes regulados por STAT3, como ciclina D1, Bcl-XL, y survivina conduciendo a una inhibición de su crecimiento (Siddiquee et al. 2007). Interesantemente, estos genes blanco de STAT3 están implicados en la progresión del cáncer de mama o en su pronóstico (Bromberg, 2000). Otro trabajo que pone de manifiesto la relevancia de STAT3 en cáncer de mama fue realizado en células tumorales mamarias 4T1. En estas células, el bloqueo de la expresión de STAT3 por ARN corto de interferencia (shRNA) suprimió la tumorigenicidad de las mismas y la formación de metástasis en los pulmones de ratones inmunocompetentes (Ling & Arlinghaus 2005). Además, varios trabajos postulan que la disminución de los niveles de STAT3 activo aumenta la muerte por apoptosis en células en cultivo y disminuye la tumorigénesis, el crecimiento tumoral y la angiogénesis en modelos tumorales que utilizan xenoingertos (Alvarez et al. 2005; Diaz et al. 2006; Kotha et al. 2006; Leslie et al. 2006; Ling & Arlinghaus 2005). Finalmente, estudios clínicos demostraron que aquellos pacientes con cáncer de mama en estadio temprano tipo II, que presentaban niveles elevados de pSTAT3, respondían de manera incompleta a la quimioterapia, revelando que la activación de STAT3 puede conducir a la resistencia a la terapia (Diaz et al. 2006).

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, en esta Tesis nos focalizamos en STAT3 como blanco molecular en cáncer de mama. Para ello, estudiamos las vías de transducción de señales moduladas por progestágenos para fosforilar STAT3 en el residuo tirosina 727 y su relevancia biológica. Luego, diseñamos una inmunoterapia basada en la administración de células tumorales que tienen bloqueada la activación de STAT3 a partir de la cual: i) describimos la inducción de senescencia en las células tumorales ii) logramos efectos antitumorales profilácticos y terapéuticos que podrán ofrecer una alternativa terapéutica a pacientes con cáncer de mama.

FACULTAD FACULTAD

· DE · B

MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. METODOLOGÍA GENERAL

Animales

Los experimentos se realizaron en hembras vírgenes de la cepa BALB/c de dos meses de edad criadas en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). Las hembras provenían de reproductores sanos y fueron criadas en un ambiente controlado y de entrada restringida, con agua y comida *ad libitum*, con doce horas de luz y doce de oscuridad. Los ratones *nude* de la cepa NIH (S), hembras de 2 meses de edad, fueron provistas por el bioterio de la Facultad de Veterinaria, Universidad de La Plata. Se mantuvieron en el bioterio del IBYME, en jaulas estériles en racks ventilados con filtros HEPA. Todos los experimentos con animales fueron realizados de acuerdo con los más altos estándares de cuidados animales, como se detalla en la guía del *National Institute of Health* de los EEUU para el cuidado y uso de animales de laboratorio (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 1996) y fueron aprobados por el comité de ética del IBYME.

Tumor C4HD

Se utilizó el adenocarcinoma mamario murino C4HD perteneciente al modelo experimental desarrollado por la Dra. Claudia Lanari (Lanari et al. 1986). Los tumores se originaron en ratones hembra BALB/c tratados con 40 mg del progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA) (Medrosterona, Laboratorios Craveri, Buenos Aires, Argentina) cada 3 meses durante 1 año y han sido mantenidos por pasajes singeneicos en ratones tratados con MPA (Lanari & Molinolo, 1986; Proietti et al., 2005; Salatino et al., 2004). El MPA se administra en forma de depósito (40mg) en el flanco contralateral al inóculo tumoral. El adenocarcinoma mamario C4HD es de histología ductal, de crecimiento hormono-dependiente, requiriendo MPA para proliferar tanto *in vivo* como *in vitro* (Molinolo et al. 1987). El tumor

C4HD expresa receptores de progesterona (RP) y estrógenos (RE), carece de expresión de receptores de glucocorticoides y de EGFR, sobreexpresa ErbB-2, exhibe altos niveles de ErbB-3 y baja expresión de ErbB-4 (Balañá et al. 2001; Labriola et al. 2003; Lanari et al., 1986).

Cultivos primarios de células epiteliales C4HD

Para realizar los cultivos primarios, los tumores C4HD se extirparon de los ratones en el flujo laminar aproximadamente a los 21 días de haber sido inoculados. Luego se realizó una disgregación mecánica y enzimática después (tripsina 0,25/ p/v; colagenasa tipo II 0,25/ p/v; SAB 0.5/ p/v), agitando durante 40 min a 37° C y se agregó al final, medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 sin rojo fenol (DMEM/F12, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) + 10/ de de suero fetal bovino (SFB, Gen S.A., Buenos Aires, Argentina) decomplementado. El suero se decomplementa previamente calentándolo a 56°C durante 30 minutos. Se obtuvo una suspensión compuesta por una población de estirpe epitelial y otra fibroblástica, que se separaron según la técnica de Pandis y col (Pandis et al. 1992) con algunas modificaciones. Brevemente, esta técnica se basa en que la velocidad de sedimentación de las células epiteliales que forman agregados celulares es mayor que la de los fibroblastos, permitiendo su separación luego de varias decantaciones diferenciales. Para comenzar la purificación, las células obtenidas luego de la disgregación se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en solución de lavado (DMEM/F12 + SFB 2 / v/v), dejando sedimentar durante 20 minutos; el sedimento constituye la fracción enriquecida en células epiteliales que se encuentran habitualmente en agregados, el sobrenadante se descartó luego de cada decantación. Este procedimiento se repitió aproximadamente 10 veces, hasta que no se detectaron fibroblastos en el sobrenadante. Las células epiteliales fueron cultivadas en DMEM/F12 + 10/ SFB, durante 48 h para favorecer el pegado de acúmulos de células epiteliales y luego fueron cultivadas en DMEM/F12 + 2,5/ SFB deprivado de esteroides por tratamiento con carbón activado (ChSFB) + 10 nM MPA durante otras 48-72 h. Luego de ello, se realizaron todos los experimentos descriptos. El cultivo de células epiteliales fue de una pureza mayor al 98/ evidenciado por inmunohistoquímica de citoqueratina.

Progestágeno

El MPA (6α -metil-17 α -hidroxi-acetato-progesterona) utilizado en los medios de cultivo es de Sigma (Sigma, St. Louis, MO). En los tratamientos *in vivo* se utilizó MPA (Medrosterona, (Medrosterona, Laboratorios Craveri, Buenos Aires, Argentina) en forma de depósito (40 mg/ratón).

Líneas celulares

Las células de tumor mamario humano T-47D y MDA-MB 231, de tumor mamario murino 4T1, de carcinoma de colon de ratón CT-26 y de linfoma de ratón YAC-1 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EEUU). La línea celular T-47D-Y, que no expresa RP (Sartorius et al. 1994), fue donada por la Dra. Horwitz (University of Colorado, Denver, CO, EEUU) y se obtuvo mediante clonación por dilución límite a partir de la línea T47-D (Keydar et al. 1979). La línea celular T-47D-Y-PR-B es el resultado de la transfección estable de las células T47-D-Y con la isoforma B del RP (Sartorius, et al. 1994), y fue también donada por la Dra. Horwitz. La línea T47-D-Y-RP-BmPro, donada por la Dra. C. Lange (University of Minnesota Cancer Center, Minneapolis, MN, EEUU) se obtuvo por transfección estable de las células T-47D-Y con una mutante de la isoforma B del RP que tiene las tres prolinas 422, 423 y 427, ubicadas en el dominio rico en prolinas del RP, convertidas a alanina. Este dominio del receptor fue definido como absolutamente necesario para su interacción con todos los dominios SH3, impidiendo por lo tanto la interacción con Src y la consecuente activación rápida de cascadas de señalización (Boonyaratanakornkit, et al. 2001; Carnevale, Proietti et al. 2007). La línea celular T-47D-Y y las derivadas de ella fueron cultivadas en las mismas condiciones que la línea T-47D. Para mantener las líneas T-47D-Y-RP-B y T-47D-Y-RP-BmPro se agregó al medio de cultivo el antibiótico análogo de la neomicina, G418 (500 µg/ml, Sigma). Las líneas celulares de cáncer de mama humano T-47-D y MDA-MB-231 fueron mantenidas en medio DMEM/F12 + 10/ SFB. Las células 4T1, CT26 y YAC-1 se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Gibco, BRL, Gaitherburg, MD, EEUU) + 10/ SFB. En experimentos donde se estimuló con MPA, las células T-47D se cultivaron en DMEM/F12 sin rojo fenol suplementado con 0,1/ SFBCh.

Inhibidores farmacológicos

Se utilizaron los siguientes inhibidores farmacológicos: JSI-124 2 μ M (Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU) para inhibir la fosforilación de STAT3; U0126 10 μ M (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EEUU) para bloquear MEK1/2. Los inhibidores de la familia de quinasas Src, 4-Amino-5-(4-clorofenil)-7-(t-butil) pirazolo [3,4-d] pirimidina (PP2, Calbiochem) y Dasatinib 10 μ M (LC Laboratories, Woburn, MA, EEUU). Los mismos fueron agregados 30-60 minutos antes del agregado de MPA en ciertos ensayos. Se realizaron controles para verificar que el dimetilsulfóxido (1:2000), utilizado como vehículo de los inhibidores farmacológicos, no modificaba la fosforilación de c-Src, p42/p44 MAPK ni la fosforilación de STAT3Ser727 inducida por MPA.

Ensayo de Western blot

Los extractos proteicos totales de células sometidas a las distintas transfecciones y/o tratamientos descriptos, fueron obtenidos a partir de células lisadas en buffer conteniendo Tris (pH 7,4) 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, 10/ glicerol, 1/ Nonidet P-40, SDS 0,1/, Mg₂Cl 1 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 10 µg/ml, pepstatina 5 µg/ml, aprotinina 5 µg/ml, Na₃VO₄ 1 mM y NaF 25 mM. Los lisados fueron centrifugados a 12.000 g durante 30 min a 4° C, y se determinó el contenido proteico en el sobrenadante mediante el método de Bradford. También se obtuvieron extractos proteicos a partir de tumores extirpados de ratones. Para ello, se homogeneizó un trozo de tumor (aproximadamente 100 mg) con un *Ultraturrax* en presencia del buffer de extracción de proteínas previamente descripto. El homogenato tumoral se centrifugó a 105000 g a 4°C durante 45 min en una ultracentrífuga. Se descartó el *pellet* y el contenido proteico del sobrenadante fue determinado de acuerdo al método de Bradford.

Los extractos proteicos se corrieron en geles de poliacrilamida desnaturalizante con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). El extracto proteico (25 a 50 µg de proteínas) se diluyó en buffer de siembra 3X (Tris-HCl 60 mM [pH 6,8], SDS 2/ p/v, glicerol 10/ v/v, 0,7 M 2- βmercaptoetanol y azul de bromofenol 0,1% p/v) y se llevó a ebullición durante 5 min. Las muestras se corrieron en geles de 7,5-15/ acrilamidabisacrilamida según el peso molecular de la proteína a revelar. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0,2 µm,

BioRad, Hercules, CA, EEUU) y se bloquearon durante 18 h a 4°C con leche descremada 5/ p/v o sero albúmina bovina (SAB) 5/ o 3/ p/v, según el caso, en PBS+tween 20 0,1/ v/v. Las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos diluidos en PBS+tween 20 0,1/ v/v durante 2 h a temperatura ambiente con agitación o bien durante 18h. con SAB 5/ o 1/ p/v con agitación, según el anticuerpo:

Stat3 policional de conejo (C-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EEUU) 1/15000 Fosfotirosina Stat3 (Y705) monocional de ratón (B-7, Santa Cruz Biotechnology) 1/1000 Fosfoserina STAT3 (Ser727) monocional de ratón (4G6, Cell SignalingTechnologies) 1/1000 Ciclina D1 policional de conejo (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) 1/2000 para células humanas, 1/50000 para células murinas Src monocional de conejo (36D10, Cell Signaling Technologies) 1/8000 Fosfotirosina Src (Y416) policional de conejo (Cell Signaling Technologies) 1/4000 p42/p44 MAPK policional de conejo (C-14, Santa Cruz Biotechnology) 1/2000 Fosfo p42/p44 MAPK monocional de ratón (E-4, Santa Cruz Biotechnology) 1/3000 RP monocional de ratón (Ab-7, Thermo Scientific) 1/15000 β-tubulina monocional de ratón (Sigma) 1/70000 GFP policional de conejo (Abcam, Cambridge, MA, EEUU) 1/5000 p16INK4a policional de conejo (M-156, Santa Cruz Biotechnology) 1/500

FLAG-M2 monoclonal de ratón (Sigma) 1/1000

Luego de 3 lavados de 10 minutos en PBS+tween 20, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP) anti ratón, anti conejo o anti cabra, todos de Vector Laboratories (Burlingame, CA, EEUU). Las membranas se revelaron utilizando el reactivo de quimioluminiscencia ECL plus (General Electric, Buckinghamshire, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la primera revelada, las membranas se incubaron 30 minutos a 50°C con solución de *stripping* (2-βmercaptoetanol 100 mM, SDS 2/ v/v, Tris-HCl 62,5 mM pH 6,7) en agitación para extraer los anticuerpos unidos a la misma. Luego de dos lavados con PBS+tween, las membranas se bloquearon durante 18 h en leche 5/ p/v y se incubaron al día siguiente con el anticuerpo contra la proteína total correspondiente.

<u>Análisis estadístico</u>: Las bandas obtenidas se escanearon, y se midió la densidad de cada una con el programa Image J (*National Institute of Health*, EEUU). Las formas fosforiladas de las proteínas fueron normalizadas con sus respectivas proteínas totales. En los casos en que se evaluaron niveles de expresión, las bandas de la proteína en cuestión se normalizaron con las bandas de actina o β tubulina corrida en el mismo gel. La significancia de las diferencias de intensidad entre los distintos tratamientos se analizó realizando un "t test" o un ANOVA, de acuerdo a si se tratan de dos o más tratamientos a comparar, respectivamente, de muestras de varios experimentos.

Plásmidos

La construcción del promotor de ciclina D1 humano de 1745 pares de bases de longitud ubicado río arriba del gen de la luciferasa (-1745 ciclina D1-luc) fue donado por el Dr. R. Pestell (Northwestern University Medical School, Chicago, IL, EEUU). El plásmido reportero de luciferasa que contiene cuatro copias del sitio de unión a STAT3 de alta afinidad "m67" (p4xm67-tk-luc) fue donado por el Dr J. Darnell (The Rockefeller University, New York, NY, EEUU). El plásmido de expresión de luciferasa Renilla RL-CMV fue comprado a Promega (Madison, WI, EEUU). El vector de expresión de STAT3 fusionado a GFP (STAT3-GFP), el vector que codifica para la proteína STAT3 posee una mutación puntual en la serina 727 y por lo tanto no puede ser fosforilada en este residuo y también fusionada a GFP (STAT3S727A-GFP) y el vector backbone de las construcciones anteriormente mencionadas (pcDNA5/FRT) fueron gentilmente donadas por H. Yu (Beckman Research Institute, Duarte, CA, EEUU) (H. Lee et al. 2009). El vector de expresión de la forma dominante negativa de STAT3, STAT3Y705F, posee una mutación puntual en el codón 705, una sustitución de la tirosina por fenilalanina, que provoca la reducción de la fosforilación en tirosina de la proteína STAT3 salvaje endógena y por lo tanto inhibe la dimerización y la unión de STAT3 al ADN (Bromberg et al. 1998; Bromberg et al. 1999). Este vector, al igual que el plásmido vacío pcDNA3.1, fue provisto por el Dr. J. Darnell.

Transfecciones transientes

Las células C4HD o T-47D fueron transfectadas transientemente durante 48 o 24 h con 2 µg/ml de STAT3-GFP o STAT3S727A-GFP o con el plásmido vacío pcDNA5/FRT en placas de 6 hoyos. Las células C4HD fueron transfectadas en DMEM-F12 + SFBch 2,5/ v/v + MPA 10 nM, y las células T-47D fueron transfectadas en DMEM-F12 + SFB 10/ v/v con el reactivo de transfección Fugene HD (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. La eficiencia de transfección fue evaluada determinando el porcentaje de células que exhibieron la expresión de GFP 4 días después de la transfección, que varió entre el 60 y 70/. En los experimentos en los que se estudió el rol de la fosforilación de STAT3 en serina 727 en la capacidad del MPA de inducir la actividad transcripcional de STAT3 las células C4HD o T-47D, según lo indicado en cada caso, fueron transfectadas transientemente durante 48 o 24 hs, respectivamente, con 1 µg/ml del vector 4xm67-tk-luc o con 1 µg/ml del plásmido reportero -1745 ciclina D1-luc y con 10 ng/ml de RL-CMV utilizado para corregir variaciones internas en las eficiencias de transfección. Las células fueron co-transfectadas con 2 µg/ml de STAT3-GFP o STAT3S727A-GFP. Las cantidades totales de ADN transfectado fueron estandarizadas agregando el plásmido vacío pcDNA5/FRT. En los casos de los ensayos de actividad del gen reportero, las células fueron lavadas con PBS, lisadas con la solución Pasive Lysis Buffer (Promega) y con un ciclo de congelado-descongelado en nitrógeno líquido. La actividad luciferasa fue determinada empleando el kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y con un luminómetro 20n/20 (Turner Bio Systems, Madison, WI, EEUU). La actividad luciferasa se informó cómo veces de inducción de la razón entre la actividad Firefly luciferasa y la actividad Renilla luciferasa con respecto a cada grupo sin MPA. Se realizaron triplicados para cada tratamiento. Las diferencias entre los grupos experimentales fueron analizadas por ANOVA seguida del test de Tukey.

Para los ensayos del capítulo II y III las células C4HD y 4T1 fueron sembradas en placas de 6 hoyos y transfectadas transitoriamente durante 48 h o durante los tiempos indicados según cada experimento con 2 µg del vector de expresión STAT3Y705F. Las células C4HD se transfectaron en DMEM/F12 + 2,5/ + MPA 10 nM y las 4T1 en RPMI-1640 + 10/ SFB siempre

en la ausencia antibióticos. Como control se transfectaron células con el vector vacío pcDNA3.1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU).

Para el estudio de las citoquinas secretadas, se tomaron los sobrenadantes de las células C4HD transfectadas durante 48 h con STAT3Y705F o controles.

Transfecciones con ARN de interferencia (siRNA)

Los siRNAs dirigidos contra RP, STAT3 y p16INK4a fueron sintetizados por Dharmacon (Lafayette, CO, EEUU). Las secuencias de siRNAs fueron las siguientes: siRNA contra STAT3 murino: 5'-GGUCAAAUUUCCUGAGUUGUU-3'; siRNA contra STAT3 humano: 5'-GAGCAGAGAUGUGGGAAUGUU-3'; siRNA contra RP murino: 5'-AUAGGCGAGACUACAGACGUU-3'. El número de catálogo del siRNA contra p16INK4a utilizado es J-043107-06 (Dharmacon). Como siRNA control, se utilizó un siRNA no silenciador, que no corresponde a ninguna secuencia conocida de genes de mamíferos, también comprado a Dharmacon. Las células fueron transfectadas durante 24 a 72 h con 25 a 100 nM de siRNAs, según el experimento, con el reactivo de transfección DharmaFECT (Dharmacon) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células MDA-MB-231 fueron transfectadas con 50 nM siRNA contra STAT3 o siRNA control durante 48 h en medio DMEM/F12 + SFB 10/.

Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las células C4HD y T-47D crecidas sobre cubreobjetos fueron transfectadas o no, según el experimento, y luego incubadas en DMEM-F12 con los tratamientos que se indican en cada ensayo. Las células fueron fijadas y permeabilizadas en metanol a -20°C y luego bloqueadas con PBS + SAB 1/ a temperatura ambiente durante 30 minutos. La incubación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo en PBS + SAB 1/ durante 18 h a 4°C, utilizando una dilución del anticuerpo de 1/100. Los anticuerpos empleados fueron los siguientes:

Stat3 policional de conejo (C-20, Santa Cruz Biotechnology)

Fosfoserina STAT3 (Ser727) monoclonal de ratón (4G6, Cell SignalingTechnologies)

Trimetil K9 H3 monoclonal de conejo (Millipore, Temecula, CA, EEUU)

Luego de 3 lavados de 10 minutos con PBS + SAB 1/, los cubreobjetos con células fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos. Para detectar pSTAT3Ser727 y TriMeK9H3, se utilizó un anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen); y para detectar Stat3 (C-20) se empleó un anticuerpo de cabra anti IgG de ratón conjugado con rodamina (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EEUU). Los controles negativos se realizaron incubando las células con PBS + SAB 1/ en lugar del anticuerpo primario, seguido de la incubación con los anticuerpos secundarios. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol) (Sigma) utilizado en una dilución de 2 ng/ml. Para cada tratamiento se analizaron entre 100 y 200 células. Las fotos que se muestran en los Resultados ilustran algunas células representativas de las examinadas. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio Nikon Eclipse E800 (Nikon Instruments), cuyo límite de resolución es de 300 nm.

Ensayos de proliferación por incorporación de timidina-[³H] en células C4HD, T-47D y MDA-MB-231

Para realizar los ensayos de proliferación con las células C4HD se repicaron las células creciendo en DMEM-F12 + SFBch 2,5/ v/v + MPA 10 nM y se sembraron 4x10⁴ células por hoyo en placas de 96 hoyos de fondo plano. Las células repicadas se dejaron adherir durante 24 hs en DMEM-F12 + SFB 10/ v/v. Dicho medio fue luego reemplazado por medio de transfección suplementado con los diferentes siRNAs y vectores de expresión. Luego de 72 hs, las células se incubaron durante 48 hs con DMEM-F12 con o sin MPA o con DMEM-F12 10/, según lo indicado. Para los ensayos de proliferación con las células T-47D, se sembraron 10⁴ células por hoyo en placas de 96 hoyos. Se dejaron adherir durante 24 hs y luego se reemplazó el medio por medio de transfección suplementado con diferentes vectores de expresión indicados para cada caso. Después de 24 hs, las células se incubaron durante 24 hs más DMEM-F12 con o sin MPA. Para las células MDA-MB-231, se sembraron 10⁴ células por hoyo y se dejaron adherir durante 24 hs. Luego se transfectaron con los siRNAs indicados durante 72 h en DMEM-F12 + SFB 10/. Todos los ensayos se realizaron por octuplicado. Se empleó el método de incorporación de timidina-[³H] para evaluar la síntesis de ADN como medida de la proliferación
celular. Durante las últimas 24 hs de incubación de todos los tipos celulares, se aplicó un pulso de 1 μ Ci de timidina-[³H] (New England Nuclear, Dupont, Boston, MA, EEUU) actividad específica: 20 Ci/mmol) en cada hoyo. Los cultivos se despegaron de la placa de cultivo con tripsina (50 μ l/hoyo) y se cosecharon en un cosechador de células Nunc. La radioactividad incorporada se midió en un contador beta de centelleo líquido (Tri-Carb2800TR, Perkin Elmer) durante 1 minuto por métodos estándar de centelleo líquido. Previamente se demostró que la incorporación de timidina-[³H] se correlaciona con el número de células (Dran et al. 1995) siendo de este modo, un método apropiado para medir proliferación celular. La incorporación de timidina-[³H] se muestra como cuentas por minuto (cpm).

<u>Análisis estadístico</u>: En cada experimento individual se promediaron los octuplicados, se calcularon las cpm ± DE (desviación estándar) y se evaluó la significancia estadística mediante un test de ANOVA. Para la comparación de distintos tratamientos entre sí, se usó el test de Tukey después del ANOVA.

2. METODOLOGÍA ESPECÍFICA CAPITULO I

Ensayo de fosforilación in vitro con ATP no radioactivo

Las células T-47D fueron preincubadas o no con 10 µM de U0126 durante 90 min y luego fueron tratadas o no con MPA 10 nM durante 2 min. Las células fueron lisadas en un buffer de lisis para quinasas (20 mM HEPES pH 7.5, 10 mM EGTA, 1/ NP-40, 2.5 mM MgCl₂) y la quinasa MAPK fue inmunoprecipitada a partir de 500 µg de extractos proteicos usando un anticuerpo anti p42/p44 MAPK (C-14; Santa Cruz). STAT3 fue inmunoprecipitado a partir de 500 µg de extractos proteicos de células T-47D no estimuladas utilizando un anticuerpo contra STAT3 total (C-20, Santa Cruz). STAT3 así inmunoprecipitada fue sometida a un ensayo de fosforilación *in vitro* con p42/p44 MAPK inmunoprecipitada de cada tratamiento. La reacción fue realizada incubando los inmunocomplejos conteniendo a p42/p44 MAPK con STAT3 inmunoprecipitado como sustrato, en 30 µl de buffer quinasa con el agregado de 3.3 mM DTT y 100 µM de ATP durante 30 min a 30°C, como se describió previamente (M Salatino et al. 2006). Las proteínas

fueron separadas mediante electroforesis, los geles transferidos a membranas de nitrocelulosa y revelados utilizando anticuerpos anti pSTAT3Ser727. Las membranas fueron sometidas a *stripping* y re incubadas con un anticuerpo anti STAT3. La parte inferior de la membrana fue revelada con un anti pp42/p44 MAPK y luego anti p42/p44 MAPK.

Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Se sembraron 3 millones de células T-47D por placa de 80 mm de diámetro, se transfectaron durante 48 h y se mantuvieron en el medio de ayuno correspondiente durante 48 h y se trataron o no con MPA. Se realizó un *crosslinking* incubando las células con formaldehído en una concentración final de 1/ durante 10 minutos a 37ºC, y la reacción se detuvo agregando glicina en una concentración final de 140 mM. Luego las células se lavaron con PBS frío dos veces, se recolectaron de las placas de cultivo en 1,5 ml de PBS con inhibidores de proteasas (descriptos previamente) utilizando un scrapper, y fueron precipitadas por centrifugación y resuspendidas en 1 ml de buffer hipotónico (HEPES 20 mM [pH 7,9], EDTA 1 mM, EGTA 1 mM). Se centrifugó 1 minuto a 16000 x g para obtener los núcleos en el pellet, que se resuspendió en 300 µl de buffer de lisis (SDS 1/, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM [pH 8,1]). Después de la lisis los extractos celulares fueron sonicados en hielo con un sonicador Fisher Scientific, modelo 500. Recibieron 4 a 6 pulsos de 10 segundos al 20/ de potencia del sonicador. Se centrifugaron durante 10 minutos a 16000 x g a 4ºC, el sobrenadante se diluyó 10 veces con buffer de inmunoprecipitación (Triton X-100 1,1/, EDTA 1,2 mM, Tris-HCl 16,7 mM [pH 8,1], NaCl 167 mM) y la cuantificación de proteínas fue determinada por un ensayo de Bradford (BioRad). Trescientos µg de proteína fueron preclareados con 40 µl de bolitas de agarosa conjugadas a proteína A, bloqueadas con ADN de esperma de salmón (Millipore). Dos por ciento de esta cromatina se reservó como "input" (ADN total) y se procesó luego junto con los inmunoprecipitados en el paso de reversión del crosslinking (más adelante). La cromatina remanente fue incubada durante 18 h a 4ºC con 4 µg de Ac anti STAT3 (C-20, Santa Cruz Biotechnology) o con IgG de conejo (Sigma). El complejo proteína-ADN-anticuerpo fue precipitado incubando durante 2 hs a 4ºC con 80 µl de bolitas de agarosa conjugadas a proteína A, bloqueadas con ADN de esperma de salmón (Millipore). Las partículas de agarosa asociadas

al complejo fueron precipitadas por una centrifugación de 1 min a 4000 x g. Se lavaron con dos buffers de lavado diferentes de alta concentración salina (SDS 0,1/, Triton X-100 1/, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM [pH 8,1], NaCl 150 mM, y el otro buffer: SDS 0,1/, Triton X-100 1/, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM [pH 8,1], NaCl 500 mM), luego con un tercer buffer de lavado de baja concentración salina (LiCl 0,25 M, NP-40 1/, deoxicolato 1/, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM [pH 8,1]), y dos lavados con Tris-EDTA (TE). El complejo proteína-ADN se obtuvo extrayendo las partículas de agarosa con 400 µl de buffer de elución (SDS 1/, NaHCO3 0,1 M). La reversión del *crosslinking* del complejo proteína-ADN se realizó incubando con NaCl 0,2 M a 65°C durante 18 h. Las proteínas de las muestras fueron digeridas por incubación con 50 µg de proteínasa K durante 1 h a 45°C. El ADN se extrajo con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol, 1,25 volúmenes de AcNH₄ y 20 µg de glucógeno durante 30 min a -70°C. El ADN fue precipitado por una centrifugación de 10 min a 16000 x g y resuspendido en 10 µl de H2O hexadestilada libre de DNAsas (Promega). Para cada PCR se utilizaron 2 µl. Los controles "input" se usaron en una dilución de 1/10.

<u>PCR cuantitativa en tiempo real:</u> El ADN obtenido de los ensayos de ChIP fue amplificado por reacciones de PCR en tiempo real, que se realizaron con el equipo detector ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) utilizando SYBR green PCR master mix de Applied Biosystems. El par de primers 5'-GCACCAAAGAGACAGAAC-3' y 5'TTAACCGGGAGAAACACACC-3', fue diseñado para amplificar dos regiones del promotor de ciclina D1 humano que contiene un sitio GAS (-984). Estos primers se diseñaron con el software "Primer Express" (Applied Biosystems). El programa de PCR en tiempo real fue: 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Los números de los ejes de las ordenadas de los histogramas de ChIP se calcularon dividiendo los números arbitrarios obtenidos para cada muestra en la PCR cuantitativa por el "input" (ADN total), estableciendo en 1 los valores de las muestras sin tratar y determinando las veces de incremento de ADN inmunoprecipitado relativo a ese punto. La significancia de las diferencias entre dos tratamientos se analizó realizando un "t test" de muestras apareadas.

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

Para el análisis del ciclo celular, cultivos primarios de células C4HD o células de la línea T-47D fueron transfectadas con el vector de expresión STAT3-GFP o STAT3S727A-GFP durante 24 h, luego fueron ayunadas en medio DMEM/F12 + 0,1/ SFBCh por 24 h y tratadas o no con MPA 10 nM durante 18 o 24 h. Las células fueron cosechadas por la acción de la tripsina y fijadas en etanol 70/ por 24 h a 4° C. Posteriormente fueron lavadas dos veces con PBS, seguido de digestión por ARNsa (ARNsa A 50 U/ml) y tinción con ioduro de propidio (20µg/ml) durante 30 min a temperatura ambiente, en oscuridad. Las células se analizaron en un citómetro FACScan (Becton Dickinson (BD), La Jolla, CA, EEUU). El análisis del ciclo celular se realizó mediante el software Modfit LT (Beckton Dickinson). Se indica el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G_0/G_1 y S+ G_2 M).

Crecimiento in vivo del tumor C4HD transfectado con STAT3S727A-GFP

Las células C4HD transfectadas *in vitro* con el vector de expresión de STAT3S727A-GFP o con el vector vacío (pcDNA5/FRT) fueron cosechadas incubándolas 45 min con PBS-EDTA 1 mM estéril, y resuspendidas en medio sin suero en una concentración de 1x10⁶ células/100µl y se inyectaron subcutáneamente 100 µl en el flanco izquierdo del ratón utilizando una jeringa 25G (Terumo, Somerset, NJ, EEUU). En el flanco derecho se inoculó el MPA de depósito. Cuando los tumores se hicieron palpables, aproximadamente una semana después de la inoculación, se comenzó a medir el largo y el ancho de los mismos con un calibre de Vernier calculando tres veces por semana el volumen tumoral. El volumen tumoral (mm³) se calculó con la siguiente fórmula: (L x W²)/2, donde L=largo del tumor (mm), W=ancho del tumor (mm) (Leonetti *et al.* 1996). El día 35, los animales fueron sacrificados y el tumor removido. Los tejidos destinados a estudios moleculares fueron mantenidos a -80^o C, y los que se utilizarían para análisis histopatológico de rutina (Hematoxilina y Eosina –H&E-) fueron fijados en formol neutro 10/ . Todas las muestras fueron examinadas por un patólogo que desconocía el tratamiento que había recibido cada ejemplar. Varios cortes de cada tumor u órgano fueron evaluados.

Pacientes y micro arreglos de tejido (TMA)

Se seleccionaron 48 tejidos incluidos en parafina de carcinomas de mama invasivos para la construcción de bloques de TMA de los archivos del departamento de Histopatología del Instituto de Oncología Henry Moore, Buenos Aires, entre el 2001 y el 2008. De estos, en 9 muestras no se pudo determinar los niveles nucleares de pSTAT3Ser727 por la pérdida de las secciones analizadas. Todos los pacientes fueron tratados con cirugía. Este estudio fue realizado bajo la aprobación del comité de ética del IBYME y del Instituto de Oncología Henry Moore y los consentimientos escritos de los pacientes fueron obtenidos antes de su inclusión en este estudio. El estadio de los pacientes antes del tratamiento fue clasificado de acuerdo al sistema de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Singletary et al. 2002). Para la determinación del grado histológico se utilizó el sistema Elston and Ellis (Page, et al. 1995). Los TMA fueron construidos como se describió previamente (Roxana Schillaci et al. 2012).

Immunofluorescencia de tejidos

La recuperación antigénica se realizó utilizando buffer citrato de sodio 10mM pH 6 durante 4 min a máxima potencia en microondas. Los vidrios fueron bloqueados por 30 min en Buffer Hank Modificado (MHB de sus siglas en inglés Modified Hank's Buffer) con 5% de SAB, luego se incubaron durante 18h a 4ºC con el anticuerpo anti pSTAT3Ser727 (4G6) (1:50, Cell Signalling). Seguidamente se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo acoplado a Alexa 488 (Molecular Probes) Para reducir la autofluorescencia se incubaron los vidrios en Sudan Black B 0.1/ (Sigma). Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio Nikon Eclipse E800 (Nikon Instruments). Los controles negativos se realizaron con MHB sin el agregado de los anticuerpos primarios. La señal de intensidad de marcación nuclear se puntuó según la siguiente escala: 0, sin tinción o tinción débil en menos del 10/, 1, tinción débil del 10-25/, 2, tinción moderada del 26-50/; y 3, tinción intensa de más del 50/, como se describió previamente para la clasificación de la tinción nuclear de pSTAT3Tyr705 por otros autores (Dolled-Filhart et al. 2003, Sato et al. 2011). Dos patólogos determinaron el puntaje de forma independiente, con una alta correlación entre ambos. Las discrepancias entre ambos fueron promediadas para obtener un único puntaje final. Para que la muestra sea considerada positiva para la expresión nuclear de pSTAT3Ser727 se

requirió un puntaje de uno (1) o más (Sato *et al.* 2011). RE y RP fueron evaluados por inmunohistoquímica con los Ac clon 6F11 (Novocastra Laboratories) y el clon hPRa2+hPRa3 (NeoMarkers), respectivamente y puntuados como se describió previamente (Schillaci *et al.* 2012).

<u>Análisis estadístico</u>: El análisis se llevó a cabo utilizando el software SPSS Software version 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Las correlaciones entre las distintas variables se realizaron utilizando el χ 2-test o el test exacto de Fisher.

3. METODOLOGÍAS ESPECIFICAS DEL CAPÍTULO II

3.1. Experimentos in vivo capítulo II

Transfección celular y protocolo de inmunización

Las células C4HD y 4T1 fueron sembradas en placas de 80mm y transfectadas transitoriamente durante 48 h con 11 µg del vector de expresión STAT3Y705F, que codifica para una proteína que no puede fosforilarse en el residuo tirosina 705 y que actúa como un dominante negativo de STAT3 (Bromberg et al. 1998; Proietti et al 2005). Las células C4HD se transfectaron en DMEM/F12 suplementado con ChSFB 2,5/ + MPA 10 nM y las 4T1 en RPMI-1640 + 10/ SFB siempre en la ausencia antibióticos. Como control se transfectaron células con el vector vacío pcDNA3.1 (Invitrogen). En todos los casos, se utilizó el reactivo de transfección FuGENE HD (Roche Biochemicals) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Estas células fueron utilizadas para inmunizar ratones BALB/c. Brevemente, las células se cosecharon incubándolas 45 min con PBS-EDTA 1mM estéril y se resuspendieron en PBS estéril en una concentración de $2x10^6$ células/100µl. Dicha suspensión celular se irradió con 50 Gy (C4HD) o 100 Gy (4T1) de una fuente de cobalto (⁶⁰Co). Mediante un ensayo de incorporación de timidina-[³H], realizado como se describió previamente, se comprobó que la dosis de irradiación era efectiva para anular la proliferación celular, mientras que, realizando un ensayo de exclusión del colorante azul de tripán se verificó la viabilidad celular. Los ratones (BALB/c o nude) se inyectaron subcutáneamente utilizando una jeringa 25G (Terumo) en el flanco

izquierdo con 2x10⁶ células transfectadas con el vector STAT3Y705F e irradiadas. Se efectuaron tres dosis de inmunización separadas por 15 días; o sea seis, cuatro y dos semana antes del desafío tumoral, el cual se efectuó inoculando subcutáneamente a los ratones inmunizados con un fragmento (1 mm³) del tumor parental C4HD o con 1x10⁴ células 4T1 implantadas en la cuarta glándula mamaria. Simultáneamente al desafío con C4HD se les administró a los ratones MPA de depósito. En cada grupo se incluyeron de 5 a 8 ratones según los experimentos. Los grupos controles incluyeron ratones inyectados, siguiendo el mismo esquema, con el vehículo (100µl de PBS estéril), con células sin tratamiento o con células transfectadas con el vector vacío pcDNA3.1 durante 48 h e irradiadas de manera similar. Cuando los tumores se hicieron palpables, aproximadamente una semana después de la inoculación, se comenzó a medir el largo y el ancho de los mismos con un calibre de Vernier calculando tres veces por semana el volumen tumoral. El volumen tumoral (mm³) se calculó con se explicó anteriormente. Se monitoreó el crecimiento tumoral por 21 (C4HD) o 33 (4T1) días después de inoculadas las células. Se determinó, conjuntamente con el volumen tumoral, la tasa de crecimiento, como la pendiente de la curva de crecimiento, la cual se obtuvo graficando el volumen tumoral en función del tiempo. También se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral dividiendo el volumen tumoral medio del grupo de ratones inmunizados con células transfectadas con el vector STAT3Y70F por el volumen tumoral medio de cada grupo control, restando el resultado a 1 y multiplicándolo por 100.

Evaluación de metástasis pulmonares

Los ratones BALB/c (n = 8) con tumores 4T1 fueron sacrificados al día 33, los pulmones se fijaron con Bouin y se contó el número de colonias pulmonares superficiales mediante la observación en lupa.

<u>Análisis estadístico</u>: la comparación del número de metástasis de pulmón entre los diferentes grupos se realizó por la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

Inmunización de ratones nude

Los ratones *nude* se inmunizaron con células epiteliales provenientes de un cultivo primario del tumor C4HD como se describió anteriormente para la inmunización de los ratones BALB/c. Dos semanas después de la última dosis se efectuó el desafío tumoral, inoculando a los ratones inmunizados con un fragmento (1mm³) del tumor parental C4HD estéril. Simultáneamente al desafío tumoral se les administró a los ratones MPA de depósito. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 15 mm³, aproximadamente una semana después de la inoculación, se comenzó a medir el largo y el ancho de los mismos calculando el volumen tumoral como se explicó previamente. Se monitoreó el crecimiento tumoral durante 25 días. En cada grupo se incluyeron 6 ratones.

Depleción in vivo de las subpoblaciones linfocitarias

Los animales inmunizados fueron depletados de linfocitos T (LT) CD4+ y de LT CD8+ por la administración intraperitoneal (*i.p.*) de 0,5 mg/ratón de anticuerpo contra CD4 (clon YTS 191.1), CD8 (clon YTS 169.4) (gentilmente provistos por el laboratorio del Dr. Podhajcer) en los días -1, 0, 1, 8, 15 y 22, con relación a la inoculación del tumor (día 0). Para la depleción de células NK, los ratones fueron inyectados con 0,25 mg/ratón de anticuerpo anti-asialo GM1 (Wako, Richmond, VA, EEUU) en los días -1, 7, 14 y 21. Los ratones control recibieron cantidades equivalentes de IgG normal de rata o IgG de conejo en los mismos días. En el día 7, se tomaron muestras de sangre de la vena facial para confirmar las depleciones por citometría de flujo. Se lisaron los eritrocitos usando un buffer ACK (NH₄Cl 154 mM, KHCO₃ 9,9 mM, EDTA 0,09mM) y se marcaron las distintas poblaciones linfocitarias utilizando anticuerpos anti CD3 (PeCy5), CD4 (FITC), CD8 (PE) y DX5 (APC). Las células se analizaron en un citómetro FACSaria (Becton Dickinson). El análisis de los datos obtenidos se realizó utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Inc, Ashland, OR, EEUU).

Inmunización terapéutica

Los ratones hembra BALB/c (n = 5) fueron desafiados con un fragmento del tumor C4HD y se les administró MPA de depósito en el flanco opuesto al desafío. Una vez que el tumor fue

palpable (día 6 post-desafío) los animales fueron inmunizados con 2x10⁶ células C4HD-STAT3Y705F o células control irradiadas por inyección *s.c.* Los animales fueron inmunizados por segunda vez el día 18 y sacrificados el día 38.

En otro experimento, ratones hembra BALB/c (n=8) fueron inyectados *s.c.* con 1×10^4 células 4T1 el día 0. En el día 4, cuando los tumores ya fueron palpables, los ratones fueron inmunizados con 1×10^6 células 4T1-STAT3Y705F o con células control, 4T1-pcDNA3.1. Se repitieron las inmunizaciones en los días 11 y 18. Los animales fueron sacrificados el día 34.

Análisis Histopatológicos

Los tumores se extirparon al final del experimento en los días indicados previamente y se fijaron en formol neutro 10/. Los fragmentos más representativos se incluyeron en parafina, se cortaron secciones de 5 µm utilizando un micrótomo y se tiñeron con H&E para observarlas luego en el microscopio, con la asistencia de un patólogo especializado. Se realizó un conteo de mitosis por campo (High Power Field, 1 HPF=0.152 mm²) con un objetivo 40x.

Determinación de la especificidad de la respuesta imnune generada por la inmunización

Los ratones se inmunizaron como se explicó detalladamente en el protocolo de inmunización con células 4T1 transfectadas transientemente e irradiadas, n=5 para cada grupo. Dos semanas después de la última inmunización los ratones inmunizados se desafiaron inoculándolos con un fragmento (1mm³) del tumor C4HD o con 4x10⁵ células CT26 por ratón. Las células C4HD y CT26 se cosecharon con PBS- EDTA 1mM, se diluyeron en medio a una concentración de 4x10⁵ células en 100 μ l y se inyectaron subcutáneamente en el flanco izquierdo del ratón utilizando una jeringa. Cuando los tumores alcanzaron un volumen medio de 15 mm³, aproximadamente una semana después de la inoculación, se comenzó a medir el largo y el ancho de los mismos calculando diariamente el volumen tumoral como se explicó previamente.

Ensayo de Hipersensibilidad retardada (DHT)

Los ratones se inmunizaron tal como se describió previamente para el protocolo de inmunización con células C4HD. Una semana después de la última dosis los ratones se desafiaron con 3x10⁵ células C4HD en 50µl de PBS tratadas por 48 hs con MPA 10nM e irradiadas, inyectándolas subcutáneamente en la almohadilla plantar del miembro trasero izquierdo. Como control de ausencia de reacción se inyectó la almohadilla plantar del miembro trasero trasero derecho con 50µl de PBS estéril. La respuesta de hipersensibilidad retardada se determinó a las 48 hs. midiendo con un micrómetro la inflamación de ambas almohadillas plantares. Los resultados se expresaron como un índice de inflamación de la almohadilla plantar (IAP) obtenido al restar el grosor de la almohadilla plantar derecha (basal) al grosor de la almohadilla plantar izquierda (desafiada). Cinco ratones fueron incluidos en cada grupo experimental. Se evaluó la significancia estadística mediante un test de ANOVA. Para la comparación de distintos tratamientos entre sí, se usó el test de Tukey después del ANOVA.

Análisis estadístico

Para todos los casos, las diferencias entre el control y los grupos experimentales fueron analizadas mediante ANOVA, seguida por prueba *t* de Tukey. El análisis de regresión lineal se realizó sobre curvas de crecimiento, y las pendientes fueron comparadas mediante ANOVA para determinar la significación estadística. Los gráficos de Kaplan-Meier fueron generados utilizando el software GraphPad Prism (La Jolla, CA, EEUU) y analizados con la prueba de logrank.

3.2. Ensayos in vitro capítulo II

Arreglo de citoquinas

Las células C4HD fueron transfectadas como se describió previamente, con el vector STAT3Y705F o fueron tratadas con el inhibidor farmacológico JSI-124 2 µM. Se colectaron los medios condicionaos después de 48 h de tratamiento. Se utilizaron microarreglos de anticuerpos de citoquinas y quimioquinas en membranas de nitrocelulosa (Panomics, Redwood City, CA, EEUU), las cuales fueron incubadas durante 2 h a T° ambiente con los medios

condicionados. Las membranas se revelaron siguiendo las indicaciones del fabricante. Cada punto fue densitometrado usando el programa Image J y se graficaron las intensidades relativas al control positivo en la membrana.

Determinación de título de anticuerpos

Se evaluó la presencia de anticuerpos IgG contra el tumor C4HD en los sueros de ratones inmunizados y controles. Los ratones se inmunizaron tal como se describió previamente para el protocolo de inmunización con células C4HD. En este caso, dos semanas después de la última dosis se obtuvieron muestras de sangre de los ratones inmunizados por punción de la vena facial. La sangre se dejó coagular a temperatura ambiente por 30 min y se centrifugó a 1000 g por 10 min para separar el suero, el cual fue decomplementado como se explicó previamente. La detección de anticuerpos se realizó por inmunofluorescencia indirecta. Las células C4HD cultivadas en presencia de 10nM de MPA fueron cosechadas con PBS-EDTA 1mM. Luego de dos lavados con PBS las células C4HD se resuspendieron en PBS + 3/ SAB + 0,02 ∕ azida, se alicuotaron a razón de 5x10⁵ células por tubo y se incubaron 30 min a 4ºC con una dilución 1:50 de los sueros de los ratones inmunizados. Luego de dos lavados, las células se incubaron con un segundo anticuerpo específico para IgG de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (dilución de uso 1:200, Molecular Probes). La intensidad de fluorescencia se evaluó utilizando un citómetro de flujo FACScan, y los niveles de fluorescencia inespecífica se determinaron incubando a las células del mismo modo, pero con un suero de ratón control no inmunizado. Los datos se analizaron utilizando el programa FlowJo (Tree Star Inc, Ashland, OR, EEUU). Los resultados se expresaron como intensidad de fluorescencia media (IFM) determinada restando la fluorescencia media inespecífica obtenida con el suero de ratón control a la fluorescencia media obtenida con los sueros de los ratones inmunizados. Los ensayos de realizaron por cuadruplicado.

Ensayo de proliferación de esplenocitos

Los ratones se inmunizaron tal como se describió previamente para el protocolo de inmunización con células C4HD. En este caso, dos semanas después de la última dosis los

ratones inmunizados fueron sacrificados, se les extrajeron los bazos y se aislaron a partir de los mismos los esplenocitos. Para ello, los bazos fueron disgregados en fragmentos pequeños usando una tijera de punta curva, obteniéndose una suspensión celular. A cada bazo se le agregó 3 ml de RPMI-1640 (Gibco), se homogeneizó y se pasó la suspensión por filtros de 70 μ m. Se realizó un lavado con RPMI-1640, resuspendiendo luego a las células en medio de cultivo completo, constituido por RPMI-1640 suplementado con SFB 10/, 2-mercaptoetanol 50 μ M, HEPES 10 mM, glutamina 2mM y gentamicina 50 μ g/ml (RMPI-1640 completo) y se sembraron en una placa de 96 hoyos a razón de 5x10⁵ células/hoyo. Los esplenocitos se cultivaron por 5 días en estas condiciones en presencia o ausencia de 1x10⁴ células C4HD, que habían sido previamente incubadas con 50 μ g/ml de mitomicina C por 1 hora a 37°C y lavadas exhaustivamente. Dieciséis horas antes de terminar el cultivo se agregó 0,5 μ Ci de timidina-[³H] por hoyo, luego de lo cual se cosecharon las células y se midió la incorporación de timidina-[³H] como se describió previamente.

Ensayos de citotoxicidad

La capacidad de los esplenocitos o de células NK provenientes de los ratones inmunizados para lisar a las células blanco C4HD y YAC-1 fue determinada *in vitro* utilizando un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr. Los linfocitos del bazo, referidos como células efectoras, fueron aislados de los ratones inmunizados como se describió en detalle previamente y fueron co-cultivados durante 5 días en medio RPMI-1640 + SFB 10 / con células C4HD previamente inactivadas por tratamiento con mitomicina C y lavadas exhaustivamente. Paralelamente, células C4HD o células YAC-1 se cosecharon con PBS-EDTA y se marcaron con 100 µCi de ⁵¹Cr (Na⁵¹CrO₄ actividad específica: 19,5 GBq/mg, NEN) por 1 hora a 37°C, las células se lavaron 4 veces con PBS y se plaquearon en una microplaca de fondo cóncavo a razón de 1x10⁴ células/hoyo (Células blanco). Los linfocitos del bazo que habían sido estimulados al cocultivarlos con las células C4HD, se plaquearon en esta microplaca en las siguientes relaciones efector:blanco; 100:1, 50:1, 25:1, 12:1 y 6:1. En el caso del ensayo de citotoxicidad de células NK, las células NK fueron purificados mediante selección negativa usando el kit de enriquecimiento de células NK de ratón (BD Biosciences) a partir de los esplenocitos cocultivados durante 5 días con células C4HD según lo descripto previamente. Las células NK purificadas se plaquearon en una microplaca conteniendo 1×10^4 células blanco C4HD o YAC-1 en las siguientes relaciones efector:blanco; 5:1, 2,5:1, 1,25:1 y 0,625:1. Las placas se centrifugaron a 200 g por 1 min para ubicar ambas estirpes celulares en el fondo cóncavo del hoyo y maximizar el contacto, y se incubaron por 4 hs a 37°C en una estufa humidificada con 5⁄ de CO₂. Se plaquearon también hoyos sólo con células blanco en medio de cultivo para determinar la liberación espontánea de ⁵¹Cr y otros con triton X-100 1⁄ para determinar la liberación máxima de ⁵¹Cr. Al terminar la incubación las placas se centrifugaron nuevamente, se tomaron 100 µl de sobrenadante de cada hoyo y se contó la radioactividad presente, o sea liberada por la lisis de las células blanco, en un contador gama. El porcentaje de lisis específica de las células blanco se calculó utilizando la fórmula [E-S)/(T-S)]x 100, donde E= el promedio de radiactividad de liberación espontánea, y T= el promedio de radiactividad máxima.

Determinación del tipo de citotoxicidad: CD4⁺, CD8⁺ o NK dependiente

Para determinar si la citotoxicidad era CD4⁺ o CD8⁺ o NK dependiente, se realizó un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr, previa depleción selectiva de la población de LT CD4⁺ o LT CD8⁺ o de células NK. Los linfocitos totales fueron aislados de los ratones inmunizados como se describió en detalle previamente y fueron co-cultivados durante 5 días con células C4HD previamente inactivadas por tratamiento con mitomicina C. En el día 5 se cosecharon los esplenocitos que habían sido estimulados al co-cultivarlos con las células C4HD y se realizó el protocolo de depleción de CD4⁺ o de CD8⁺ utilizando el kit Dynabeads mouse CD4-CD8 de separación celular inmunomagnética (Dynal, Oslo, Noruega) o de células NK utilizando el kit de selección positiva EasySep[®] Mouse panNK (CD49b) (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) según las indicaciones de los fabricantes. Brevemente, las partículas inmunomagnéticas Dynabeads se lavaron 3 veces con PBS-SFB 1/ , en cada lavado se descartó el sobrenadante, las partículas se sedimentaron apoyando el tubo sobre la gradilla magnética, se resuspendieron en el volumen originalmente pipeteado de PBS-SFB 1/ . Se partió de 3x10⁶ linfocitos totales por ratón para cada depleción. Para depletar de CD4⁺ se tomaron 13 µl de la suspensión de

partículas anti-CD4, mientras que para depletar de CD8⁺ se tomaron 8 μ l de la suspensión de partículas anti-CD8. Estos valores se calcularon según la relación partícula:célula recomendada por el fabricante (4-10:1). Los linfocitos totales (aproximadamente 300 μ l) se mezclaron con las correspondientes partículas, se incubaron 20 min en hielo agitando por inversión cada 3 min. La separación se completó al ubicar el tubo en la gradilla magnética. Se tomó el sobrenadante, el cual quedó depletado completamente de LT CD4⁺ en un caso, y de LT CD8⁺ en el otro, y se sembró en una microplaca de fondo cóncavo 100 μ l por hoyo junto con 1x10⁴ células C4HD marcadas con ⁵¹Cr /hoyo (relación efector:blanco, 100:1). Se procedió como se describió en el punto anterior. El porcentaje de lisis específica se calculó como se explicó previamente.

Degranulación de células NK

Para la evaluación de la degranulación, Se sembraron 4x10⁶ esplenocitos de ratón (2x10⁶ esplenocitos/ml) en ausencia o en presencia de 2 x 10⁵ células C4HD tratadas con mitomicina C. Las células fueron incubadas 18 h en estufa de atmósfera controlada a 37°C con 5⁄ de CO₂. Durante las últimas 4 h de cultivo se añadió al cultivo el anticuerpo anti-CD107a (FITC) (eBioscience, San Diego, CA, EEUU) o el correspondiente control de isotipo. A continuación se lavaron las células y se marcaron anticuerpo anti CD3 (PeCy5) y anti DX5 (APC) (eBiocience) durante 30 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se lavaron las células con PBS/BSA1⁄ /NaN₃. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSAria y los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo. Se seleccionaron las células NK (CD3⁻DX5⁺) para determinar el porcentaje de CD107a⁺ en esta población.

Determinación de citoquinas liberadas al medio de cultivo

Los linfocitos del bazo de los ratones inmunizados fueron aislados como se describió en detalle previamente. En una placa de 24 hoyos se co-cultivaron en medio RPMI-1640 + SFB 10/ $4x10^6$ linfocitos por hoyo con $8x10^4$ células C4HD durante 48 hs, las cuales habían sido crecidas en medio + MPA e inactivadas por tratamiento con mitomicina C en un volumen de 1ml. Luego de terminada la incubación se colectó el sobrenadante de cada hoyo y se determinó la cantidad de IFN- γ , de IL-2, IL-4 y de IL-10 liberada al medio de cultivo mediante un ensayo de ELISA de

captura (OptEIATM, PharMingen, San Diego, EEUU). El protocolo se realizó según las instrucciones del fabricante. Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado.

Determinación de IFN-y intracelular

Para la detección intracelular de IFN-γ, se cultivaron durante 18 h esplenocitos (2x10⁶ células/por ml) en medio RPMI-1640 completo con IL-2 recombinante murino (10 U/ml) (Peprotech, Rocky Hill, NJ, EEUU) en presencia o ausencia de células C4HD tratadas con mitomicina C, o en presencia de 1 ng de IL-12 (Peprotech). Durante las últimas 4 h de cultivo, se añadió monensina (10 µg/ml, Sigma) para inhibir el transporte del Golgi. Las células fueron marcadas con diferentes combinaciones anticuerpos acoplados a fluorocromos anti-CD4 (FITC), -CD3 (PE) y -DX5 (APC) (eBioscience). Para determinar la producción de IFN-γ, las células se marcaron adicionalmente con anti-IFN-γ (PercpCy5.5) (eBioscience) utilizando un kit de fijación y permeabilización (eBioscience), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se incubaron en paralelo células con anticuerpos contra los isotipos correspondientes. La fluorescencia se adquirió usando un citómetro FACSAria y se analizaron con el software FlowJo.

Evaluación de los linfocitos infiltrantes del tumor

Los tumores C4HD y 4T1 se extirparon los días detallados previamente y fueron disgregados de forma mecánica y luego enzimática en una solución de RPMI-1640 conteniendo 400 U/ml de colagenasa tipo II (Invitrogen Life Techonologies) y 50 U/ml de DNasa I (Thermo Scientific) durante 1 h a 37 ° C. Las células fueron lavadas en PBS dos veces y filtradas (filtros de poro de 70 µm). Las células fueron incubadas durante 30 min con un anticuerpo bloqueante de receptores Fc, CD16/32 (eBioscience) y marcadas con anticuerpos conjugados a fluorocromos para la caracterización fenotipica por citometría de flujo de las distintas subpoblaciones. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: CD45 (APC), CD3 (FITC o PECy5), DX5 (APC), CD4 (FITC), CD8 (PE), FOXP3 (PE) y CD25 (APC) (eBiosciences) durante 30 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se lavaron las células con PBS/SAB1/ /NaN₃. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSAria y los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo. Se seleccionó la población linfoide en función de los parámetro de tamaño y granularidad y del

marcador CD45⁺ y a partir de estas células se calcularon los porcentajes de células NK (CD3⁻ DX5⁺), T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺), T CD8⁺ (CD3⁺CD8⁺) y Tregs (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺).

La expresión de CD69 y la producción de IFN-γ en LT CD4⁺ y en células NK cells fue determinada en suspensiones del tumor disgregado y cultivadas en RPMI-1640 + SFB 10/ durante 5 h en presencia de dosis mitogénicas de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) de 10 ng/ml e ionomicina 1 µg/ml. Junto con el estímulo se agregó monensina (10 µg/ml). Al finalizar el experimento, se realizó una marcación intracelular de IFN-γ como se describió previamente. La expresión en membrana de CD69 fue realizada mediante una inmunomarcación directa con un anticuerpo anti-CD69 (PE) Ab (eBioscience). Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSAria y los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo. Se seleccionó la población linfoide en función de parámetro de tamaño y granularidad y se calcularon los porcentajes de células NK (CD3⁻DX5⁺) y T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺) positivas para CD69 y para IFN-γ en esta población.

Análisis de células NK en ganglios linfáticos y LT CD4⁺ de memoria bazo

Se obtuvieron ganglios linfáticos y bazos de los ratones BALB/c inmunizados dos semanas luego de la última inyección. Los ganglios fueron disgregados mecánicamente con tijera y luego enzimáticamente con 400 U/ml colagenasa tipo II. Se lavaron con PBS/SAB 3/ /NaN₃, se centrifugaron y luego marcaron con anticuerpo anti-CD3 (PeCy5) y -DX5 (APC). Los esplenocitos de los bazos de los ratones inmunizados se co-cultivaron durante 5 días con células C4HD como se explicó previamente para el ensayo de proliferación de esplenocitos. Luego de ser lavados con PBS/SAB3/ /NaN₃, los esplenocitos se incubaron con un anticuerpo anti-CD4 (FITC), -CD3 (PeCy5) y -CD44 (PE) (eBioscience) por 30 min a 4°C. La marcación inespecífica se evaluó incubando a las células con una IgG control del mismo isotipo de la utilizada para la marca específica conjugada con PE. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSAria y los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo. Se seleccionó la población linfoide en función de parámetro de tamaño y granularidad y se calcularon los porcentajes de células NK (CD3⁻DX5⁺) en ganglio y LT CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺) positivas para CD44 en bazo.

Activación de células dendríticas de bazo (DCs)

La activación de DCs se evaluó mediante la medición de la expresión de diversos marcadores de superficie por citometría de flujo. Los esplenocitos de los animales inmunizados fueron co-cultivados durante 48 h con las células C4HD tratadas con mitomicina C, y después se tiñeron con anticuerpos conjugados específicos para CD11c (FITC), CD40 (APC), CD86 (PE) y MHC clase II (PECy5) o control de isotipo (eBiosciences). Después de la tinción, las células fueron fijadas y analizadas por citometría de flujo usando un FACSAria. Los datos fueron analizados mediante el software FlowJo.

Para el análisis ex vivo de la activación de DC, las suspensiones celulares se obtuvieron a partir de nódulos linfáticos de drenaje y el bazo se tiñeron como se ha descrito anteriormente.

Análisis por citometría de flujo de la expresión de RAE-1 y H-60

Las células C4HD fueron cosechadas con PBS-EDTA 1 mM y fueron incubadas con un anticuerpo anti RAE-1 (APC) o H-60 (PE) murinos (R & D Systems, Minneapolis, MN, EEUU). Las células fueron entonces lavadas y un total de 10⁴ células por muestra fueron analizadas usando un citómetro FACSAria. La tinción basal fue evaluada utilizando un anticuerpo irrelevante del mismo isotipo al de detección. El análisis de los datos se realizó con el programa FlowJo.

4. METODOLOGÍAS ESPECÍFICAS DEL CAPÍTULO III

Evaluación de la enzima B-galactosidasa (B-gal) a pH 6,0

Células C4HD, 4T1 y MDA-MB 231 fueron cultivadas cobre cubreobjetos y transfectadas con el vector de expresión de STAT3Y70F o con siRNA contra STAT3 según lo descripto anteriormente. Las células se lavaron dos veces en PBS, se fijaron en una solución 2/ formaldehído/0,2/ glutaraldehído durante 5 min y se lavaron nuevamente en PBS. Las células se incubaron durante 18 h a 37 ° C (sin CO₂) con la solución de tinción de la β-gal asociada a senescencia (SA-β-Gal) (1 mM MgCl, 1 mg/mL X-Gal (Sigma), 5 mM de ferrocianuro de potasio,

Página |44

5 mM de ferricianuro de potasio (1 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indolil P3-D-galactósido (X-Gal) por ml/ 40 mM de ácido cítrico/fosfato de sodio, pH 6,0/5 mM de ferrocianuro de potasio/ 5 mM de ferricianuro de potasio/150 mM de NaCl/2 mM MgCl₂). Al día siguiente se lavaron las células durante dos veces con PBS, y una vez con metanol. Los cubreobjetos se dejaron secar y luego se observaron a microscopio de campo claro y se contaron las células azules sobre el total de células por campo para poder calcular el porcentaje de células senescentes (/ SA-β-Gal).

Extracción de ARN, transcripción reversa y PCR en tiempo real

El ARN total fue aislado de las células C4HD crecidas en placas de 6 hoyos previamente transfectadas, durante los tiempos indicados en medio completo, utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se cuantificó por espectrofotometría y 1 µg de ARN se sometió a transcripción reversa mediante el uso de la enzima retrotranscriptasa SuperScript III de Invitrogen, según las indicaciones del fabricante.

El ADNc obtenido fue amplificado por PCR en tiempo real. Los primers utilizados para amplificar el ADNc de p16INK4a murino fueron: 5'-CTCAACTACGGTGCAGATTCGA-3' y 5'-CACCGGGCGGGGAGAA-3'. Los primers que se usaron para amplificar el ADNc de GAPDH murino fueron: como control de normalización 5'-CCAGAACATCATCCCTGCAT-3', 5'-GTTCAGCTCTGGGATGACCTT-3'. Las condiciones de ciclado de la PCR y el diseño de primers fueron tal como se describió para ChIP. Las veces de inducción de la expresión del ARNm de p16INK4a se calculó dividiendo los números arbitrarios obtenidos para cada muestra en la PCR cuantitativa por las cantidades obtenidas del control interno GAPDH, estableciendo en 1 los valores de las muestras sin tratar y determinando las veces de incremento o disminución de ARNm relativo a las muestras sin tratar. La significancia de las diferencias entre dos tratamientos se analizó realizando un "t test" de muestras apareadas.

Efectos no genómicos de los progestágenos sobre

la activación de STAT3 y su relación con la

proliferación de células de cáncer de mama

INTRODUCCION (CAPITULO I)

1. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA

El receptor de progesterona (RP) es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroideas con actividad de factores de transcripción dependientes de ligando y media los diversos efectos biológicos de la progesterona. Es una proteína modular que presenta los tres dominios estructurales característicos de los receptores nucleares: el dominio amino terminal, el dominio central de unión al ADN (DBD, por sus siglas en inglés, *DNA binding domain*) y el dominio carboxilo terminal de unión al ligando (LBD, por sus siglas en inglés, *Ligand Binding Domain*). Dentro de estos módulos hay por lo menos dos dominios de activación de la transcripción (AFs). El dominio de activación ligando independiente AF-1 se encuentra en el dominio amino terminal y el dominio AF-2 dependiente de ligando está presente en el LBD (Figura 3). El DBD contiene dos clásicas estructuras de dedos de zinc que le permiten la unión al ADN y la interacción con ciertas proteínas. Tanto el LBD como el DBD se encuentran altamente conservados entre los miembros de la familia de receptores nucleares, mientras que el dominio amino terminal presenta una gran variabilidad en la longitud y en la secuencia (Leonhardt, et al. 2003).

El RP se expresa en dos isoformas: A y B. El receptor de progesterona B, RP-B (120 kDa), presenta en el extremo amino terminal 164 aminoácidos más que el RP-A (94 kDa). A pesar de que ambas isoformas poseen DBD y LBD similares, se ha descripto que regulan la expresión de diferentes genes, que tienen actividades transcripcionales distintas y que reclutan correguladores diferentes (Richer et al. 2002). La isoforma B presenta un tercer dominio de activación de la transcripción (AF-3) en los primeros 164 aminoácidos, siendo así un activador transcripcional diez veces más fuerte que la isoforma A (Figura 3) (Beato, et al. 1996; Leonhardt, et al. 2003).



Figura 3. *Esquemas de los dominios de las isoformas A y B del RP humano.* La isoforma B posee 164 aminoácidos más que la isoforma A y en el dominio amino terminal contiene un tercer dominio de activación (AF-3) que le confiere una mayor actividad transcripcional. DBD: dominio de unión al ADN, LBD: dominio de unión al ligando, AF-1 y AF-2: dominios de activación transcripcional, IF: dominio de inhibición.

En la glándula mamaria, se requiere la expresión de ambas isoformas en iguales proporciones para su correcto desarrollo y diferenciación (Mote et al. 2002). En contraste, las cantidades relativas del RP-A y RP-B se encuentran alteradas en la mayoría de los tumores mamarios. Numerosos trabajos demostraron que dichas alteraciones son un evento temprano en el proceso de carcinogénesis mamaria y aumentan con el progreso de la enfermedad (Hopp 2004; Mote et al. 2002).

2. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL RECEPTOR DE PROGESTERONA

2.1. Efectos genómicos

En ausencia de ligando, el RP se encuentra asociado a un complejo de proteínas chaperonas como las proteínas de shock térmico Hsp70 y Hsp90. La progesterona difunde a través de la bicapa lipídica de una célula blanco para unirse y activar su receptor. En el modelo clásico, la unión de la progesterona al RP induce un cambio conformacional del receptor, su fosforilación, disociación de las proteínas chaperonas, seguido de su dimerización y translocación al núcleo. Cuando se sitúa en el núcleo, se fosforila nuevamente en varios residuos y se une a elementos respondedores a progesterona (PRE, por sus siglas en inglés) en

los promotores o regiones *enhancer* de los genes blanco, para activar o silenciar la transcripción de aquellos genes que regula, lo que da como resultado la respuesta biológica de la célula blanco (Figura 4).

El mecanismo por el cual los receptores de hormonas esteroideas unidos a sus ligandos afectan la velocidad de transcripción dirigida por la RNA polimerasa II involucra la interacción de los receptores con componentes del complejo de preiniciación. Esta interacción ocurre de manera directa e indirecta a través del reclutamiento secuencial de varios coactivadores. Los coactivadores constituyen un grupo diverso de moléculas que otorgan múltiples funciones estructurales y enzimáticas al promotor (Rowan & Malley, 2000). Son reclutados al complejo RP-ligando y tienen la capacidad de facilitar el ensamblado del complejo de preiniciación y de aumentar la transactivación dependiente del receptor (Figura 4) (Li et al. 2003).



Figura 4. *Modelo de acción del receptor de progesterona.* El RP está presente en un complejo inactivo con proteínas chaperonas (Hsp 70 y 90). Al unirse a la progesterona, el RP se fosforila, se dimeriza, se disocia de las proteínas chaperonas y transloca del citoplasma al núcleo donde se fosforila nuevamente en varios residuos. Tras

el reclutamiento de las proteínas necesarias, se une a los elementos respondedores a hormonas (HRE) presentes en los promotores de los genes cuya transcripción regula, PRE para el RP. Src: coactivador de receptores de esteroides, CBP: proteína de unión al elemento respondedor de unión a cAMP (CREB), P/CAF: p300/factor de asociación a CBP. Adaptado de Rowan y O'Malley 2000.

Además de unirse directamente al ADN, el RP puede unirse a otros factores de transcripción, incluyendo a SP1 (*Specificity Protein 1*), STAT5, AP1 (*Activator Protein 1*) y STAT3 para regular promotores de genes que no poseen secuencias canónicas PRE, como β-caseína, ciclina D1, Bcl-X y p21^{CIP1} (Stoecklin et al. 1999; Cicatiello et al. 2004; Proietti et al. 2011), en un llamado mecanismo "genómico no clásico". En cualquier caso, para activar la transcripción de los genes blanco, el RP activado por su ligando recluta las enzimas remodeladoras de la cromatina y el aparato transcripcional de la RNA polimerasa II. Paradójicamente, muchos de los genes blanco del RP involucrados en el ciclo celular o la proliferación, no contienen PREs canónicos en sus regiones promotoras y por lo tanto estarían regulados por estos mecanismos no clásicos del RP independientes de su unión directa al ADN (Faivre, et al., 2008). El RP puede también mediar la transcripción y/o represión de genes de manera independiente de ligando (Buser et al. 2007; Jacobsen et al. 2002).

El RP presenta un nivel basal de fosforilación que aumenta sensiblemente en presencia del ligando. Numerosos trabajos demostraron que su fosforilación es un importante mecanismo de regulación de su función. En particular, la fosforilación inducida por ligando en la serina 294 está mediada por acción de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) p42/p44 MAPKs, siendo necesaria para su actividad transcripcional y la posterior exportación nuclear, ubiquitinación y degradación citoplasmática, demostrando la participación de las MAPKs tanto en la estabilidad como en la funcionalidad del receptor (Lange, et al., 2000; Shen et al., 2001; Qiu et al., 2003).

2.2. Efectos no genómicos

La regulación transcripcional mediada por el RP abarca varios niveles de complejidad y mecanismos intrincados involucrando acciones genómicas (efectos transcripcionales directos) y efectos rápidos o no genómicos. Estos últimos fueron descubiertos a partir del hallazgo de vías de regulación génica mediadas por el RP pero que no son dependientes de la unión del receptor al ADN. Auricchio y colaboradores demostraron por primera vez que los progestágenos activan en forma rápida la vía Src/p21RAS/MAPKs a través del RP clásico ubicado en el citosol o cercano a la membrana plasmática, en células de carcinoma mamario T-47D (Migliaccio et al. 1998). Luego se demostró que la activación de la tirosina quinasa c-Src por el RP ocurre en forma indirecta, mediante la interacción de dos dominios presentes en el dominio amino terminal del RP con el LBD del receptor de estrógenos (Ballaré et al. 2003). A su vez, este último interactúa con c-Src mediante la unión de los dominios SH2 de la quinasa y el residuo Tyr537 del receptor de estrógenos. Sin embargo, los trabajos de Edwards y colaboradores determinaron una interacción directa entre el RP y la familia de quinasas Src (Boonyaratanakornkit et al. 2001). La presencia del sitio rico en prolinas, PPPPLPPR, presente entre los aminoácidos 421-428 del dominio amino terminal del RP le permite interactuar con dominios SH3 de proteínas de la familia Src activando en forma rápida la vía Src/MAPKs luego del tratamiento con progesterona (Figura 5). Tras la unión del ligando al RP o receptor de estrógenos, la interacción proteínaproteína con c-Src, libera una conformación inhibitoria intermolecular permitiendo la autoactivación de c-Src. c-Src activa inicia la cascada de transducción de señales vía RAS/RAF/MAPK (Migliaccio et al. 1998; Boonyaratanakornkit et al. 2001). Esta activación ocurre fuera del núcleo y sería inducida sólo por la isoforma B del RP debido a la distribución principalmente nuclear que presenta la isoforma A (Boonyaratanakornkit et al. 2007). Las discrepancias observadas podrían explicarse por la formación de diferentes complejos dependiendo de la presencia de diversas moléculas adaptadoras y transductoras de señales (Lange, 2004). La isoforma B del RP, pero no la A, además de activar rápidamente la señalización en el citosol (Boonyaratanakornkit et al. 2001), media las acciones proliferativas de los progestágenos (Faivre et al. 2008) y es la isoforma clave requerida para el desarrollo de la glándula mamaria (Mulac-Jericevic et al. 2003).



Figura 5. *Modelo de la función dual del RP.* El RP modula en el citoplasma vías de señalización celular a través de los dominios hormono dependientes SH3 y modula la transcripción de genes en el núcleo asociándose directamente al ADN a través de factores de transcripción. Adaptado de Hagan et al. 2012 y V Boonyaratanakornkit et al. 2001.

3. RECEPTOR DE PROGESTERONA Y CÁNCER DE MAMA

A pesar de los significativos avances logrados con respecto a la funcionalidad y estructura del RP *in vitro*, el progreso con respecto a la respuesta fisiológica atribuible a este receptor nuclear ha estado retrasado debido a la superposición con las funciones de los estrógenos, muchas de las cuales dependen de la activación del RP. Los experimentos realizados utilizando ratones knock-out y knock-in del RP demostraron que la señal proliferativa de la progesterona no sólo es esencial en la morfogénesis y función normal de la glándula mamaria, sino también en el aumento de incidencia de tumores mamarios (Ismail et al. 2003).

En estos experimentos, se observó que ratones normales para la expresión de RP pero que poseían una alta cantidad de progesterona circulante, tenían una mayor incidencia de tumores mamarios, al ser tratados con el carcinógeno dimetil-benzantraceno (DMBA), en comparación a los ratones knock-out del RP. Este estudio no sólo puso en evidencia la importancia de la progesterona como un mitógeno endócrino mamario, sino también avaló las conclusiones obtenidas de aquellos estudios en los que se discute la relación riesgo-beneficio asociada a los regímenes de HRTs post-menopáusicos que incluyen a la progesterona, mencionados previamente en la Introducción.

Los progestágenos son mitogénicos para células de cáncer de mama y las protegen de la apoptosis (Moore, et al., 2000; Faivre & Lange 2007). A pesar de que estos estudios aportan conocimientos sobre las ventajas proliferativas que confieren los progestágenos a los tumores de mama humanos, no están dilucidados todos los mecanismos por los cuales los progestágenos median la proliferación.

En cuanto a la participación de los efectos no genómicos de los progestágenos en la regulación del desarrollo del cáncer de mama, permanece poco investigada. Los trabajos pioneros de Auricchio y Edwards mencionados anteriormente abrieron el camino a la exploración en este campo.

4. STAT3 Y PROGESTERONA

Las proteínas STATs constituyen un punto de convergencia importante para muchas vías de señalización. En particular, se demostró que las interacciones entre las vías de las STATs y de los receptores de hormonas esteroideas, tienen una naturaleza bidireccional, en donde los receptores de hormonas esteroideas regulan la transcripción dependiente de STATs; y de manera inversa, las STATs modulan la transcripción mediada por hormonas esteroideas (De Miguel et al. 2003; Stoecklin et al. 1999; Zhang et al. 1997; Takeda et al. 1998). En particular, el grupo de la Dra. Horwitz ha demostrado interacciones funcionales entre progestágenos y STATs en donde el tratamiento de la línea celular de cáncer de mama humano T-47D con el progestágeno sintético R5020 indujo un aumento en los niveles de expresión de STAT3 y de

STAT5 (Lange et al. 1998; Richer et al. 1998). En particular, la regulación de STAT3 por progestágenos se comprobó en el mesometrio decidual de ratas durante la preñez, en donde la progesterona aumentó el pool citoplasmático de STAT3 (Liu & Ogle 2002). Este efecto fue inhibido por el antagonista de progestágenos RU486, lo que prueba que la expresión de STAT3 es, en este modelo, el resultado de la acción de la progesterona. Resultados consistentes con estas líneas de evidencia se obtuvieron también de un análisis de la expresión de STAT3 fosforilada en líneas celulares de cáncer de mama y en tejidos de cáncer de mama invasivo, que mostraron que los altos niveles de fosforilación de STAT3 en el residuo Tyr705 están significativamente asociados a la expresión del RP (Hsieh, et al. 2005).

En nuestro laboratorio también contribuimos con nuevos hallazgos sobre la relación entre STAT3 y los progestágenos en cáncer de mama. En particular, hemos demostrado que los progestágenos inducen la rápida fosforilación en la Tyr705 de STAT3 (pSTAT3Tyr705), a través de un mecanismo dependiente de las Janus quinasas (JAKs) y c-Src. Estos efectos sobre la activación de c-Src y JAKs dependen de RP, mostrando que a través de una vía de señalización rápida, RP es capaz de activar STAT3. A su vez, hemos observado que el progestágeno sintético acetato de medroxiprogesterona (MPA), estimula la asociación entre RP y STAT3, la translocación nuclear de STAT3, su unión al ADN y su activación transcripcional. Esta activación transcripcional inducida por MPA es un requisito para la estimulación del crecimiento de las células de cáncer de mama murinas y humanas (Proietti et al. 2005). Estos hallazgos proveyeron la primera evidencia sobre la participación de STAT3 en el crecimiento celular del cáncer de mama inducido por progestágenos y respaldan la participación de STAT3 en la proliferación de células de cáncer de mama ya descripta (Figura 6) (Proietti et al. 2005).



Figura 6. Interacción entre las vías del RP y de STATs en células de carcinoma mamario. Los progestágenos (ej: MPA) interactúan con el RP, el cual, mediante efectos no genómicos, activa las vías de las quinasas JAKs y Src. Estas quinasas citoplasmáticas activas fosforilan a STAT3, el cual dimeriza y transloca al núcleo en donde se une a secuencias específicas en el ADN y modula la expresión de genes relacionados con la proliferación y la supervivencia.

En particular, ha sido demostrado que las STATs regulan la proliferación celular a través de distintos mecanismos, como por ejemplo, inhibiendo la apoptosis (Takeda et al. 1998), o modulando la expresión de genes necesarios para la proliferación (Fukada et al. 1996), como es el caso de los genes de ciclinas (ciclina D1) (Bromberg et al. 1999; Leslie et al. 2006) y de ciclinas dependientes de quinasas (CDKs) (Kaplan et al. 1998). Asimismo STAT3 regula, por ejemplo, la transcripción del gen c-Myc, un regulador crítico del crecimiento celular. El producto de este gen está modulado coordinadamente por múltiples señales en funciones celulares diversas

tales como crecimiento, diferenciación y muerte, tanto en células normales como en transformadas (Kiuchi et al. 1999).

5. FOFORILACION DE STAT3 EN SERINA

5.1. Los sitios de fosforilación en serina de STATs están en su dominio de activación transcripcional

Originalmente se pensaba que las proteínas de la familia STAT podían ser fosforiladas únicamente en un residuo tirosina. Sin embargo, ahora es bien conocido que también pueden ser fosforiladas en un residuo serina (Decker & Kovarik 2000). Considerando que un segundo evento de fosforilación permitiría modular más finamente la actividad de una proteína, muchos grupos de investigación han estudiado qué aspectos de la función de STATs están siendo regulados por cada sitio de fosforilación y con qué consecuencias para la respuesta a distintos estímulos. A su vez, a lo largo de estos años también se ha hecho mucho hincapié en la identificación de las quinasas responsables de dichas fosforilaciones.

La función de transactivación de las proteínas STATs reside en su dominio C-terminal, ya que eliminación genera proteínas transcripcionalmente inactivas, resultando su frecuentemente en alelos dominantes negativos (Caldenhoven et al. 1996; Onishi et al. 1996; Shuai 2000). En particular, se observó en la región C-terminal de STAT 1, 3 y 4 un motivo PMSP perfectamente conservado entre las posiciones 720 y 730 (Wen, et al. 1995). Las secuencias PMSP son potenciales sitios de fosforilación de guinasas dirigidas a prolinas, como es el caso de las quinasas de la familia MAP (Clark-Lewis, et al. 1991). Las MAPKs fosforilan sustratos en sitios consenso de fosforilación, residuos serina o treonina seguido de una prolina, o secuencias PX(S/T)P. En 1995, el grupo de Darnell describió que STAT1 y STAT3 podían ser fosforiladas en el residuo Serina 727 (Ser727) del dominio de activación transcripcional (Wen et al., 1995). En particular, la Ser727 de STAT3 puede ser fosforilada en respuesta a diversos estímulos y existen numerosas evidencias que describen su relevancia en la modulación de la actividad transcripcional de la proteína (Decker et al. 2000; Wen et al 1995). Las consecuencias biológicas

de dicha fosforilación se estudiaron usando proteínas mutantes en donde la Ser727 fue reemplazada por una alanina (S727A). En base a este tipo de estudios, se pudo determinar que el rol biológico de la fosforilación de STAT3 en Ser727 varía de acuerdo con el estímulo y/o contexto celular (Sasse et al. 1997). Mientras algunos estudios demuestran que la fosforilación en serina aumenta la actividad transcripcional (Wen, et al. 1995; Wen et al. 1997), otros trabajos proponen que la fosforilación en serina induce una actividad inhibitoria (Chung et al 1997; Lim & Cao, 1999). Por ejemplo, se sabe que STAT3 participa en la transformación de fibroblastos mediada por v-Src (Bromberg, et al, 1998; Turkson et al., 1998, 1999) y que dicha transformación depende de la fosforilación de STAT3 en Ser727 (Bromberg et al. 1998), demostrando la relevancia de este sitio de fosforilación en la transformación oncógenica. A su vez, experimentos de sustitución del alelo salvaje de STAT3 por el mutante STAT35727A revelaron la importancia de la fosforilación en STAT3 Ser727 en la supervivencia postnatal y el crecimiento de ratones (Shen et al., 2004).

5.2. Quinasas que participan en la fosforilación en serina de STAT3

La fosforilación de STATs en serina puede ocurrir a través de diferentes vías de transducción de señales. Como mencionamos anteriormente, las proteínas MAPKs (p42/p44 MPKs, JNK o p38MAPK) juegan un papel importante en la fosforilación del motivo PMSP. Mediante el uso de inhibidores específicos de estas vías se encontró que las proteínas STAT1, 3, 4 y 5 son un blanco de fosforilación de MAPK (p42/p44, p38, JNKs) activadas por factores de crecimiento (Decker & Kovarik 2000). Existe evidencia convincente de que las proteínas p42/p44 MAPK son quinasas río arriba de STAT3 cuando éstas son activadas por receptores tirosina quinasas o por receptores de citoquinas (Ng & Cantrell 1997). También se ha descripto la fosforilación a señales inflamatorias, como TNF y LPS (Zhang et al., 2001; Lim & Cao 1999). Con respecto a la vía de p38MAPK, también se ha encontrado que la fosforilación en serina de STAT3 es sensible a la inhibición de esta vía (Gohet al., 1999). También se describieron otras quinasas capaces de fosforilar a STAT3 en este residuo. La proteína quinasa C delta,

activada por distintos estímulos, como la IL-6 u oncostatina M, fosforila a STAT3 en Ser727 (Jain et al., 1999; Lacreusette et al. 2009). Por otro lado, la proteína quinasa C épsilon, ha sido relacionada con la fosforilación de STAT3 en Ser727 en cáncer de próstata (Aziz et al. 2007). Por último, se ha demostrado que la quinasa mTOR media la activación de STAT3 en el residuo serina inducido por IL-6 en neuroblastoma y en hepatocarcinoma celular (Qin et al., 2008; Yokogami, et al. 2000).

6. CICLINA D1 Y CÁNCER DE MAMA

La ciclina D1 pertenece a la familia de ciclinas tipo D que regulan la progresión del ciclo celular en G1-S (Quelle et al. 1993). La ciclina D1 actúa mediante la activación de quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) que fosforilan e inactivan a la proteína retinoblastoma. Sin embargo, algunos hallazgos indican que ciclina D1 podría promover la progresión del ciclo celular a través de mecanismos independientes de Cdk, como la interacción y modulación de la actividad de factores de transcripción (Arnold & Papanikolaou 2005). La ciclina D1 es un conocido oncogen que se encuentra amplificado y/o sobreexpresado en una gran proporción de cánceres humanos, incluyendo cáncer de colon, linfoma, melanoma y cáncer de próstata (Ewen & Lamb 2004). Específicamente ciclina D1 es uno de los genes más comúnmente sobreexpresados en cáncer de mama humano (hasta el 50/ de adenocarcinomas mamarios) (Arnold & Papanikolaou 2005). La actividad oncogénica de ciclina D1 en la glándula mamaria fue confirmada por modelos en ratones modificados genéticamente, donde la sobreexpresión de ciclina D1 provocó el desarrollo de carcinomas mamarios (Wang et al. 1994), mientras que la ablación de ciclina D1 resultó en la resistencia al cáncer de mama inducido por varios oncogenes en ratones (Yu, et al. 2001). Interesantemente, en células epiteliales mamarias la expresión de ciclina D1 es inducida por estrógenos y progesterona (Sutherland, et al. 1998), actuando a través del receptor de estrógenos ($\alpha \neq \beta$) y el RP (A y B) a pesar de no tener elementos respondedores a estas hormonas en el promotor proximal. La amplificación del gen de ciclina D1 se encuentra sólo en una minoría de cánceres de mama que sobreexpresan ciclina D1, indicando que la activación transcripcional patogénica de este gen por factores como el RP

o el receptor de estrógenos podría ser un mecanismo importante para inducir su sobreexpresión. Experimentos de silenciamiento de ciclina D1 en células de cáncer de mama confirmaron la correlación que existe entre los niveles de expresión de ciclina D1 y la proliferación celular, sugiriendo a ciclina D1 como un blanco terapéutico potencial para el cáncer de mama (Arnold & Papanikolaou 2005; Grillo et al. 2006).

Como hemos mencionado, existen varias quinasas activadas por un gran número de ligandos implicadas en la fosforilación de STAT3 en serina. Sin embargo, no existen reportes que vinculen la activación de STAT3 en Ser727 en respuesta a progesterona. Teniendo en cuenta que la progesterona induce la activación de la vía de MAPKs en células de cáncer de mama, y que ésta vía está involucrada en la fosforilación de STAT3 en Ser727, decidimos estudiar la fosforilación en serina de esta proteína como un nuevo efecto no genómico de RP y explorar su significado biológico como mediadora de la expresión del gen de ciclina D1, proteína íntimamente relacionada con el desarrollo y la progresión de esta patología.

OBJETIVO GENERAL (CAPITULO I)

Estudiar los efectos no genómicos del receptor de progesterona que activan a STAT3 en células de cáncer de mama.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la capacidad de los progestágenos de activar a STAT3 mediante su fosforilación en el residuo Ser 727.
- Evaluar la capacidad de los progestágenos de promover la expresión de ciclina D1 mediante la fosforilación de STAT3 en Ser727.
- Explorar la importancia de la fosforilación de STAT3 en Ser727 en la proliferación de células de cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* inducida por progestágenos.
- Correlacionar las características clinicopatológicas de pacientes con tumores de mama invasivos con la fosforilación de STAT3 en Ser727.

RESULTADOS (CAPÍTULO I)

1. El acetato de medroxiprogesterona (MPA) induce la fosforilación STAT3 en el residuo serina 727

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que el MPA induce la fosforilación de STAT3 en el residuo Tyr705 a través de una vía de señalización dependiente de las proteínas quinasas JAKs y Src y su consecuente activación transcripcional en células de cáncer de mama humano, T-47D, y en las células C4HD progestágeno-dependientes (Figura 6) (Proietti et al. 2005). En trabajo de Tesis decidimos evaluar la fosforilación de STAT3 por MPA en el otro residuo de fosforilación descripto, la Ser727. Para ello, tratamos células C4HD in vitro con MPA durante distintos tiempos y analizamos mediante Western Blot (WB) la fosforilación de STAT3Ser727 (pSTAT3Ser727). La estimulación de las células C4HD con MPA indujo la fosforilación de STAT3Ser727, desde los 5 min, manteniéndose elevada hasta los 30 min (Figura 7 A, panel superior). Los efectos estimulatorios del MPA sobre pSTAT3Ser727 fueron inhibidos por la pre-incubación con el antagonista del receptor de progesterona RU486 (Figura 7 B, panel izquierdo), y por el silenciamiento de la expresión del gen del RP con siRNAs (Figura 7 B, panel de la derecha). En la Figura 7 B (panel de la derecha) se muestra que el siRNA contra RP efectivamente silenció en un 90/ la expresión de RP. En la línea celular de cáncer de mama humano T-47D, también se observó la activación de STAT3Ser727 inducida por MPA, con una cinética de fosforilación similar a la de las células murinas (Figura 7 A, panel inferior). Para explorar más exhaustivamente el rol del RP, se repitieron los experimentos en la línea celular T-47D-Y, derivada de la línea T-47D, que no expresa RP (Sartorius et al. 1994). Encontramos que en estas células, el MPA no tuvo efecto sobre la fosforilación de STAT3 en Ser727. Sin embargo, en las células T-47D-Y transfectadas establemente con la isoforma B del RP (T-47D-Y-RP-B), el tratamiento con MPA indujo una fuerte fosforilación de STAT3Ser727 (Figura 7 C). Estos resultados indican que el MPA regula la fosforilación de STAT3 en el residuo Ser727 actuando a través del receptor clásico de progesterona.



Figura 7. *El tratamiento con MPA induce la fosforilación de STAT3 en Ser727 a través del receptor clásico de progesterona en células de cáncer de mama.* (A) Células C4HD (panel superior) o T-47D (panel inferior) fueron tratadas con MPA 10 nM durante los tiempos indicados. Se prepararon extractos celulares que se analizaron por WB utilizando anticuerpos contra la forma fosforilada en serina de STAT3 en el residuo 727 (pSTAT3Ser727) o contra fosfo p42/p44 MAPK. Las membranas fueron luego sometidas a *stripping* y reveladas con un anticuerpo contra STAT3 y contra p42/p44 MAPK. La β-tubulina fue usada como control de carga. Los WB mostrados son

representativos de cinco experimentos. (B) Células C4HD fueron pretratadas con RU486 10 nM durante 90 min y luego tratadas con MPA 10 nM durante 10 minutos (izquierda). Células C4HD fueron transfectadas durante 72 h con 25 nM de ARNs de interferencia (siRNAs) dirigidos contra RP o con siRNA control como control de especificidad y luego tratadas con MPA 10nM durante 10 min (derecha). En el panel inferior derecho se muestran los WB de extractos de células C4HD transfectadas con 25 nM de siRNAs contra RP o control durante 72 h, para controlar la eficiencia del silenciamiento de RP con los siRNAs, que fue de un 90/ . Los extractos proteicos se analizaron por WB como en (A). (C) Las células T-47D-Y y T-47D-Y-RP-B fueron tratadas con MPA 10 nM durante los tiempos indicados. Los extractos proteicos se analizaron por WB como en (A). En todos los casos las bandas fueron cuantificadas usando el programa Image J y la densitometría de las fosforilaciones fue normalizada a la proteína total. Esta relación en células sin tratar fue considerada como 1. (A-C) La señal de pSTAT3Ser727 sobre STAT3 total está representada en los gráficos de barra (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Las barras indican la media de veces de inducción ± ES de tres experimentos. La disminución de la fosforilación en las células C4HD causada por el siRNA control también es significativa (p<0,001).

2. El MPA induce la fosforilación de STAT3Ser727 a través de la vía de señalización de c-Src/p42/p44 MAPK

La activación de la proteína quinasa c-Src por progestágenos en células de tumores mamarios ha sido estudiada, incluso en el modelo tumoral murino C4HD (Migliaccio et al. 1998; Boonyaratanakornkit et al. 2001; Proietti et al. 2005). Trabajos pioneros han definido al dominio rico en prolinas del RP humano como absolutamente necesario para su interacción con c-Src (Boonyaratanakornkit et al. 2001) y la consiguiente activación de cascadas de señalización en respuesta a progestágenos (Boonyaratanakornkit et al. 2001; Migliaccio et al. 1998). Quisimos entonces explorar si la activación de c-Src estaba involucrada en la fosforilación de STAT3Ser727 mediada por progestágenos. Para evaluar esto, se utilizó la línea celular T-47D-Y transfectada establemente con una mutante de la isoforma B del RP (T-47D-Y-RP-BmPro). Esta mutante tiene las tres prolinas 422, 423 y 427, ubicadas en el dominio rico en prolinas del RP, reemplazadas por alanina, de manera que esta mutante es incapaz de activar las vías rápidas de señalización, incluyendo a c-Src (Boonyaratanakornkit et al. 2001; Carnevale et al. 2007). No se observó pSTAT3Ser727 en respuesta a MPA en las células T-47D-Y-RP-BmPro (Figura 8 A), lo que sugiere que c-Src activado por progestágenos participa de la señalización que conduce a la
fosforilación de STAT3 en Ser727. Además, la inhibición de la actividad de c-Src utilizando los inhibidores farmacológicos PP2 y Dasatinib, impidió la fosforilación de STAT3 inducida por MPA en el residuo Ser727de las células T-47D (Figura 8 B, panel de la izquierda). A pesar de que el RP murino carece de la secuencia poliprolina, éste es capaz de interactuar con c-Src. En nuestro laboratorio hemos demostrado previamente que el tratamiento con MPA de células murinas C4HD durante 2 a 10 min induce una fuerte fosforilación de c-Src en su residuo Tyr416 (Proietti et al. 2005). El bloqueo de la activación de c-Src inducida por MPA por el tratamiento de las células C4HD con el inhibidor farmacológico PP2 condujo a la inhibición de la fosforilación de STAT3Ser727 en estas células murinas (Figura 8 B, panel de la derecha).



Figura 8. c-*Src media la activación de STAT3Ser727 inducida por MPA*. (A) Las células T-47D-Y-RP-BmPro fueron tratadas con MPA 10 nM por los tiempos indicados. Las células T-47D se muestran como control de la fosforilación de STATSer727. Los extractos proteicos se analizaron por WB como en la figura 6. (B) Las células T-47D fueron tratadas con MPA 15 min (pSTAT3Ser727) o 2 min (pSrc y pp42/p44 MAPK) o preincubadas durante 90 min con PP2 o Dasatinib antes del tratamiento con MPA (panel de la izquierda). Las células C4HD fueron tratadas con MPA durante 10 min o fueron preincubadas con PP2 10 μM durante 90 min previo al estímulo con MPA (panel de la derecha). Se realizaron extractos celulares que fueron analizados por WB utilizando anticuerpos contra las fosfoproteínas indicadas. Las membranas se revelaron, después de ser sometidas a stripping, con anticuerpos contra las proteínas totales. Los WB mostrados son representativos de entre tres y cuatro que se hicieron con

resultados similares. En todos los casos, las bandas fueron cuantificadas y representadas en gráficos de barra como se describió para la figura 7 (**, p <0,01). La densitometría de las bandas de las fosfo-proteínas normalizadas con las proteínas totales mostró un aumento significativo de la fosforilación de c-Src en las células tratadas con MPA comparando con las no tratadas (p<0,001).

Es ampliamente conocido que los progestágenos activan a las serina/treonina quinasas p42/p44 MAPK a través de la señalización vía c-Src (Ballaré et al. 2003; Migliaccio et al. 1998). Como mencionamos anteriormente, la Ser727 de STAT3 se encuentra en un motivo conservado que se parece a los motivos consenso en las proteínas blanco de MAPK (Decker & Kovarik 2000). Por lo tanto, hipotetizamos que p42/p44 MAPK estaría involucrada en la fosforilación de STAT3 en Ser727 inducida por progestágenos. En la figura 7 se confirmó que el MPA induce una rápida fosforilación de p42/p44 MAPK en células C4HD y T-47D. Esta activación inducida por MPA se observó entre los 2 y los 5 min después del tratamiento y fue previa a la fosforilación de STAT3Ser727 (Figura 7 A). La figura 9 muestra que la inhibición de la vía de p42/p44 MAPK, utilizando el inhibidor farmacológico U0126, impidió la fosforilación de STAT3Ser727 mediada por MPA en las células C4HD (Figura 9 A). Para determinar si p42/p44 MAPK activada por MPA era capaz de fosforilar a STAT3 en el residuo Ser727 in vitro, realizamos un ensayo de fosforilación con ATP no radioactivo. La quinasa p42/p44 MAPK fue inmunoprecipitada de células T-47D tratadas o no con MPA durante 2 min, y de células T-47D en las cuales la activación de p42/p44 MAPK había sido bloqueada con U0126. Por otro lado inmunoprecipitamos STAT3 a partir de extractos de células no estimuladas y la utilizamos como una fuente de STAT3 no fosforilado en este ensayo. Como se muestra en la Figura 9 B, las quinasas p42/p44 MAPK activada por MPA fueron capaces de fosforilar a STAT3 en el residuo Ser727. Ni las guinasas provenientes de células sin tratar, ni las inactivadas por U0126 indujeron la fosforilación de STAT3 (Figura 9 B). En su conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que p42/p44 MAPK son las quinasas activadas por MPA responsables de la inducción de la fosforilación de STAT3 en Ser727.



Figura 9. p42/p44 MAPK media la fosforilación de STAT3Ser727 inducida por MPA. (A) Células C4HD fueron tratadas con MPA o preincubadas por 90 min con U0126 previo al tratamiento con MPA. Se realizaron WB para pSTATSer727 (panel de arriba) y pp42/p44 MAPK (panel de abajo). Las membranas fueron sometidas a stripping y reveladas contra la proteína total. Los WB mostrados son representativos de cuatro que se realizaron con resultados similares. En todos los casos, las bandas fueron cuantificadas y representadas en gráficos de barra como se describió para la figura 7 (***, p < 0,001). La densitometría de las bandas de las fosfo-proteínas normalizadas con las proteínas totales mostró un aumento significativo de la fosforilación de p42/p44 MAPK en las células tratadas con MPA comparando con las no tratadas (p<0,001). (B) Las células T-47D fueron tratadas o no con MPA durante 2 min, o preincubadas con U0126 90 min antes de la estimulación con MPA. Los extractos proteicos fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo anti p42/p44 MAPK a partir de 500 µg de proteínas de cada tratamiento. STAT3 fue inmunoprecipitado de 500 µg de extractos proteicos de células no estimuladas y fue usado como sustrato en la reacción de fosforilación in vitro. La reacción de fosforilación in vitro fue realizada como se describe en Materiales y Métodos. Las proteínas fueron separadas por electroforesis, transferidas a nitrocelulosa y los inmunoblots fueron realizados en la parte inferior con un anticuerpo anti pp42/p44 MAPK. La parte superior fue revelada utilizando un anticuerpo anti pSTAT3Ser727. La membrana fue sometida a stripping y re-incubada con un anticuerpo anti las proteínas totales. El experimento se repitió tres veces con resultados similares. IP: Inmunoprecipitación. Las bandas de pSTAT3Ser727 fueron cuantificadas y normalizadas con las bandas de STAT3. Las células sin tratar fueron consideradas como 1.

Los progestágenos promueven la fosforilación de STAT3 en el residuo Ser727 a través del receptor clásico de progesterona y por medio de la activación de las vías de señalización de c-Src y p42/p44 MAPKs.

3. MPA requiere la fosforilación de STAT3Ser727 para lograr máxima activación transcripcional de STAT3

A continuación nos propusimos estudiar las consecuencias biológicas de la fosforilación de STAT3 en Ser727 inducida por MPA. Por un lado, como se mencionara anteriormente, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la fosforilación de STAT3 en la Tyr705 es necesaria para la activación transcripcional de STAT3 y para promover la proliferación de las células de cáncer de mama inducida por progestágenos in vitro e in vivo (Proietti et al. 2005). Por otro lado, existen numerosos trabajos que proponen que la fosforilación de STAT3Ser727 es requerida para alcanzar una máxima activación transcripcional. Por lo tanto, nos preguntamos si la fosforilación del residuo Ser727 era necesaria para la activación transcripcional de STAT3 inducida por progestágenos observada en trabajos previos (Proietti et al. 2005; Béguelin et al. 2010). Para ello, las células C4HD fueron co-transfectadas con el vector de expresión STAT3S727A, que lleva una sustitución de serina por alanina en el codón 727, junto con un plásmido reportero que contiene cuatro copias del sitio de unión de STAT3 de alta afinidad "m67", denominado 4xm67-tk-luc (Bromberg et al. 1999). Como control, junto con el plásmido reportero las células fueron co-transfectadas con el vector de expresión de STAT3 salvaje o wilde-type o con un vector vacío. Al igual que lo observado previamente por nuestro grupo, el MPA induce la activación transcripcional de STAT3 (Figura 10 A) (Proietti et al. 2005). La transfección con STAT3S727A inhibió la capacidad del MPA de activar el plásmido reportero m67-Luc (Figura 10 A). Estos datos indican que la fosforilación de STAT3Ser727 es necesaria para la máxima activación transcripcional de STAT3 inducida por MPA. Por estudios de Western blots se observó una expresión similar de STAT3WT y STAT3S727A en las células C4HD transfectadas (Figura 10 B)



Figura 10. *Las fosforilación de STAT3 en Ser727 es un requisito para la activación transcripcional de STAT3.* (A) Las células C4HD fueron transfectadas durante 48 h con 1 μg/ml de un plásmido reportero de luciferasa que contiene cuatro copias del sitio de unión a STAT3 de alta afinidad "m67" (p4xm67-tk-luc). Las células se cotransfectaron junto con 10 ng/ml de luciferasa Renilla y con 2 μg/ml del vector de expresión de STAT3WT, STAT3S727A o un vector vacío (pcDNA 5/FRT). Luego de 24 h de ayuno, las células fueron tratadas o no con MPA 10 nM durante 24 h. Las actividades luciferasa y renilla fueron medidas como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados se expresan cómo veces de inducción de la actividad luciferasa con respecto a células sin tratar con MPA. Los datos representan la media de tres experimentos independientes ± ES (*p<0,05, **p<0,01). (B) WB de los extractos proteicos de las células transfectadas con pcDNA5/FRT, STAT3WT y STAT3S727A, en los que se evaluaron los niveles de STAT3WT-GFP y de STAT3S727A-GFP.

4. La fosforilación de STAT3Ser727 participa en el mecanismo de expresión de ciclina D1 inducida por MPA

Para explorar la relevancia biológica de STAT3Ser727, se estudió la regulación de la expresión de ciclina D1 por progestágenos, ya que se trata de un gen particularmente atractivo por su rol en el crecimiento del cáncer de mama y presenta sitios de unión a STAT3 en su promotor proximal (Leslie et al. 2006). La inducción del gen de ciclina D1 por progestágenos ya ha sido demostrada en líneas celulares de cáncer de mama humano (Boonyaratanakornkit et al., 2007; Faivre et al. 2005; Musgrove et al., 1993; Sutherland & Musgrove, 2004) y murinos (Béguelin et al., 2010). Resulta importante destacar que la región proximal de 1 kb del promotor de ciclina D1 no contiene sitios de unión a RP canónicos (PREs) (Skildum, et al. 2005).

Esto hace que el promotor de ciclina D1 sea un modelo ideal para investigar si la fosforilación de STAT3 en Ser727 es requerida para promover la expresión génica mediada por progestágenos de manera independiente de la unión de RP a sus sitios PREs. Células C4HD y T-47D fueron transfectadas con una construcción del promotor de ciclina D1 humano de 1745 pares de bases de longitud, ubicado río arriba del gen de la luciferasa. Este promotor (esquematizado en la figura 11 A) contiene seis sitios de unión a STAT3, denominados sitios GAS (por *gamma interferon activating site*, de secuencia TTN 5 AA), en las posiciones -984, -568, -475, -239, -68 y -27, y fue descripto previamente por Bromberg y colaboradores (Leslie et al. 2006). A su vez, las células fueron co-transfectadas con un vector vacío, o con un vector de expresión de STAT3 salvaje o con un vector de expresión de STAT3S727A. El tratamiento con MPA de ambos tipos celulares dio como resultado un aumento de la actividad de promotor de ciclina D1 en las células transfectadas con el vector vacío o con STAT3WT (Figura 11 B). Por otra parte, la transfección con STAT3S727A inhibió los efectos del MPA en la activación del promotor de ciclina D1 en estas células (Figura 11 B).





vacío (pcDNA 5/FRT) o del vector de expresión de STAT3WT, STAT3S727A. Luego de 24 h de ayuno, las células fueron tratadas o no con MPA 10 nM durante 18 h. Las actividades luciferasa y renilla fueron medidas como se describió en Materiales y Métodos. Los resultados se muestran cómo veces de inducción de la actividad luciferasa con respecto a células sin tratar con MPA. Los datos representan la media de tres experimentos independientes ± ES (*, p<0,05, **, p<0,01).

Los ensayos que se muestran en las figuras 10 y 11 indican que la proteína STAT3S727A estaría actuando como un dominante negativo del STAT3 endógeno. Por último, nos propusimos determinar la participación de pSTAT3Ser727 en la inducción de la expresión de la proteína ciclina D1 por MPA. La transfección con STAT3S727A inhibió la inducción de la expresión de la expresión de ciclina D1 estimulada por MPA en células C4HD y T-47D (Figura 12).



Figura 12. *La expresión de la proteína ciclina D1 es inducida por MPA a través de un mecanismo dependiente de la fosforilación de STAT3 en Ser 727.* Las células C4HD (A) o T-47D (B) fueron transfectadas o no con 1µg/ml de los plásmidos pcDNA5/FRT, STAT3WT o STAT3S727A durante 48 h; después de 24 h de ayuno fueron tratadas con MPA 10 nM durante 24 h. Los niveles de expresión de ciclina D1 fueron analizados por WB a partir de los extractos proteicos. Se reveló β-tubulina como control de carga. Las bandas fueron cuantificadas usando el software Image J y los valores obtenidos para ciclina D1 fueron normalizados a los de β-tubulina. Las células sin tratamiento con MPA fueron consideradas 1. Estos experimentos se repitieron cuatro veces con resultados similares. El análisis de los resultados demostró que los incrementos en ciclina D1 inducidos por el tratamiento con MPA en células transfectadas con el vector vacío y con STAT3WT en comparación con las células sin tratar y la inhibición causada por la transfección con STAT3S727A fueron significativos (p<0,01).

En conjunto, nuestros resultados indican que la fosforilación de STAT3Ser727 es necesaria para la máxima activación transcripcional de STAT3 inducida por MPA. En particular, esta fosforilación es biológicamente relevante en la inducción de la expresión de ciclina D1 por progestágenos. A su vez, estos resultados sugieren que la proteína STAT3S727A está actuando como un dominante negativo del STAT3 endógeno.

5. La fosforilación de STAT3Ser727 es requerida para la unión de STAT3 al promotor de ciclina D1

Con el objetivo de explorar la participación de pSTAT3Ser727 en la asociación específica de STAT3 con la cromatina en un contexto de células vivas, utilizamos la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). En un trabajo previo del laboratorio, se demostró el reclutamiento de STAT3 a sitios GAS del promotor de ciclina D1 luego del tratamiento con MPA. En esta oportunidad, nos preguntamos si la fosforilación de STAT3 en Ser727 es necesaria para el reclutamiento de STAT3 a estos sitios GAS. Para abordar esta cuestión, se transfectaron células T-47D con un vector vacío, o con el vector de expresión de STAT3WT o de STAT3S727A y se trataron o no con MPA durante 30 min. Luego se inmunoprecipitó la cromatina con un anticuerpo anti-STAT3 o anti-IgG como control de especificidad. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó un par de primers que flanquea los sitios GAS -948 del promotor de ciclina D1 humano, representados con flechas rojas en el esquema de la figura 13 A. Conforme a lo reportado previamente, el MPA indujo la unión de STAT3 al sitio -948 en células transfectadas con el vector vacío, y también en células que expresan STAT3WT (Figura 13 B) (Béguelin et al., 2010). Por otro lado, el bloqueo de la fosforilación de STAT3Ser727 inhibió la ocupación de STAT3 en los sitios GAS del promotor de ciclina D1. Estos resultados revelan que la fosforilación de STAT3 en residuo Ser727 es necesaria para el reclutamiento in vivo de STAT3 en el promotor de ciclina D1 luego del tratamiento con MPA.





Figura 13. *MPA induce el reclutamiento de STAT3 al promotor de ciclina D1 vía pSTAT3Ser727.* (A) Esquema del gen de ciclina D1 humano, los triángulos verdes representan los sitios GAS, las flechas rojas, los pares de *primers* utilizados para la PCR en tiempo real (las secuencias de los *primers* están detalladas en los Materiales y Métodos). Bajo las flechas se indican las posiciones de los extremos 5' de los *primers forward* y *reverse*. Se muestra como "+1" el sitio de inicio de la transcripción. (B) Se realizó la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) sobre extractos de células T-47D. Las células fueron transfectadas con pcDNA5/FRT, STAT3WT, STAT3S727A o no transfectadas tratadas o no con MPA 10 nM por 30 min y se prepararon las cromatinas, como se describe en Materiales y Métodos, para inmunoprecipitado y el total (como control de carga) se amplificó mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los valores arbitrarios obtenidos para cada muestra fueron divididos por los obtenidos para el ADN total sin inmunoprecipitar para cada tratamiento, estableciendo en 1 los valores de las muestras sin tratar, y determinando las veces de incremento de ADN inmunoprecipitado relativo a la muestra sin tratar correspondiente. Los resultados representan la media de dos experimentos independientes ± ES (**, p<0,01).

6. La fosforilación de STAT3 en Ser727 es esencial para la proliferación de células de cáncer de mama progestágeno-dependiente

Con el propósito de investigar la correlación entre la fosforilación de STAT3Ser727 inducida por MPA y la proliferación celular, examinamos la respuesta proliferativa *in vitro* a

MPA de células C4HD y T-47D transfectadas con un vector de expresión de STAT3WT o de STAT3S727A o con el vector vacío correspondiente. La proliferación se evaluó por incorporación de timidina-[³H] a las 48 h o 24 h de tratamiento MPA, respectivamente. Como se muestra en la Figura 14, la expresión de la mutante STAT3S727A tuvo un efecto inhibitorio sobre la proliferación inducida por MPA en las células de cáncer de mama humanas y murinas, en comparación con las células transfectadas con STAT3WT o con un vector vacío y estimuladas con MPA.



Figura 14. La fosforilación de STAT3 en Ser727 es necesarias para la proliferación in vitro de células de cáncer de *mama*. Se transfectaron las células C4HD (izquierda) y T-47D (derecha) durante 24 h con los plásmidos pcDNA5/FRT, STAT3WT o STAT3S727A. Después de 24 h de ayuno fueron tratadas con MPA 10 nM durante 24 o 48 h respectivamente o permanecieron sin tratar. El ensayo de incorporación de timidina-[³H] se utilizó como una medida de la síntesis de ADN. Los datos se presentan como la media de las cpm ± DE de octuplicados. Las diferencias significativas fueron calculadas contra las células transfectadas con el vector vacío o con STAT3WT sin tratar (***, p<0,001). Se muestra un experimento representativo de tres.

La proliferación de células T-47D transfectadas con STAT3S727A fue también evaluada por distribución del ciclo celular mediante análisis por citometría de flujo de células teñidas con ioduro de propidio. La expresión de STAT3S727A tuvo un efecto inhibitorio sobre el efecto proliferativo del MPA que se reflejó en el arresto en fase G0/G1 de la mayoría de las células a diferencia de las células transfectadas con STAT3WT en las cuales se observó un aumento en las fases S y G2/M del ciclo celular (Figura 15). Estos hallazgos demuestran una correlación directa entre la fosforilación de STAT3 en Ser727 y la proliferación inducida por progestágenos de células de cáncer mamario.



Figura 15. Proliferación de células C4HD que expresan STAT3S727A medida por distribución del ciclo celular. Células T-47D fueron transfectadas con STAT3WT o STAT3S727A y tratadas con MPA 10 nM durante 24 h. Luego, fueron teñidas con ioduro de propidio y tratadas con ARNasa y se analizó su distribución en el ciclo celular por citometría de flujo utilizando el programa Modfit. Están indicados los porcentajes de células totales en cada fase del ciclo celular. Estos experimentos fueron repetidos cuatro veces con resultados similares.

7. El bloqueo de la fosforilación de STAT3 en Ser727 inhibe el crecimiento in vivo de tumores mamarios

El modelo de cáncer de mama C4HD posee características únicas que lo hacen particularmente atractivo para experimentos *in vivo* en los que se quiere estudiar la respuesta a progestágenos. Como los tumores C4HD sobreexpresan ErbB2 y también poseen altos niveles de expresión del receptor de estrógenos y progesterona, se asemejan al fenotipo presente en aproximadamente el 50/ de los cánceres de mama humanos que sobreexpresan ErbB2, un fenotipo asociado a la resistencia a la terapia hormonal (Prat & Baselga 2008). Los cultivos primarios de células epiteliales C4HD fueron transfectados con el plásmido vacío o con el vector de expresión de STAT3S727A. Un millón de células fue inyectado subcutáneamente en la cuarta glándula mamaria de ratones hembras vírgenes BALB/c tratadas a su vez con MPA de depósito (conteniendo 40 mg). Como se muestra en la Figura 16, la expresión de STAT3S727A en células C4HD inhibió un 55/ el crecimiento tumoral inducido por MPA (p<0,001). La media del tamaño tumoral y la tasa de crecimiento de los tumores desarrollados a partir de las células transfectadas con STAT3S727A fueron significativamente menores que aquellas de los tumores del grupo control (tabla 1 y Figura 16). Los animales fueron sacrificados y los tumores del grupo de

ratones que recibieron las células transfectadas con STAT3S727A, exhibieron extensas áreas de fibrosis y una disminución marcada en las figuras mitóticas en comparación con los tumores de las células transfectadas con un vector vacío (tabla 1).



Figura 16. El bloqueo de la fosforilación de STAT3 en Ser727 inhibe el crecimiento in vivo progestágenodependiente de tumores mamarios C4HD. Las células C4HD fueron transfectadas por 48 h con el plásmido vacío pcDNA5/FRT o con STAT3S727A. Un millón de células fue inyectado s.c. en la cuarta glándula mamaria de ratones hembras vírgenes BALB/c. A la vez, se les administró MPA de depósito de forma s.c. Los volúmenes tumorales fueron calculados como se describió en Materiales y Métodos. Cada punto representa el volumen tumoral medio ± ES de 5 tumores para todos los grupos experimentales. El experimento fue repetido dos veces con resultados similares (*, p<0.05).

Tratamiento	Media del volumen tumoral (mm³) ± ES	Tasa de crecimiento ± ES (mm³/día)	∕ Inhibición del crecimiento	Mitosis por campo	/ Fibrosis
C4HD-vector vacío	416,4 ± 86,2ª	14,3 ± 1,6ª		3-5	<20
C4HD- STAT3S727A	132,4 ± 67,6 ^b	$4,9 \pm 1,1^{b}$	68,3 ± 5,4	2-3	20-60

Los volúmenes tumorales y el porcentaje de inhibición del tumor C4HD-STAT3S727A con respecto al C4HD-vector vacío fueron calculados al día 36 post-desafío. Las tasas de crecimiento se calcularon como las pendientes de las curvas de crecimiento.

^avs^b, *p*<0.01

Luego se examinó el estado de activación de STAT3 en Ser727 y la expresión de ciclina D1 en muestras de extractos tumorales de ambos grupos experimentales. Como se muestra en la figura 17, los tumores desarrollados en los ratones inyectados con células C4HD-STAT3S727A presentaron niveles significativamente más bajos de pSTAT3Ser727 y de ciclina D1 que los tumores de ratones inyectados con células C4HD-vector vacío.



Figura 17. *Fosforilación de STAT3Ser727 y expresión de ciclina D1 en tumores C4HD*. Se realizaron extractos proteicos a partir de los tumores extirpados de los ratones. Mediante WB se determinaron los niveles de fosforilación de STAT3 en Ser727 y de ciclina D1. Se muestra el resultado de dos tumores representativos de cada grupo. Las membranas fueron sometidas a *stripping* y reveladas con anticuerpos anti STAT3 o actina, como control de carga. Las bandas fueron cuantificadas como se mencionó anteriormente. La primera muestra de tumores C4HD transfectados con el vector vacío fueron consideradas 1.

Estos resultados apoyan la importancia de la fosforilación de STAT3Ser727 en la proliferación del cáncer de mama *in vitro* e *in vivo* inducida por progestágenos.

8. La fosforilación de STAT3 en Ser727 se asocia con la expresión de RP en carcinomas invasivos

Debido a que los ensayos *in vitro* e *in vivo* previamente descriptos proporcionaron evidencia de que la inducción de la fosforilación de STAT3Ser727 por progestágenos es esencial para la regulación de la expresión de ciclina D1 y la proliferación celular, se exploró si pSTAT3Ser727 se correlaciona con diferentes parámetros clínicos en pacientes con carcinomas invasivos. Mediante inmunofluorescencia nos propusimos analizar la localización nuclear de pSTAT3Ser727 utilizando un anticuerpo específico en los micro arreglos de tejido (TMA por sus siglas del inglés *Tissue Micro Arrays*). Antes de proceder con este ensayo, evaluamos la especificidad de este anticuerpo en el reconocimiento de pSTATSer7273. Para tal fin, realizamos una inmunofluorescencia y análisis por microscopía confocal de células T-47D transfectadas con siRNA dirigido contra STAT3 (Béguelin et al. 2010) y estimuladas con MPA durante 10 min. Como control, las células fueron transfectadas con una secuencia de siRNA que no está dirigida contra algún producto génico conocido (siRNA Control) y también tratadas con MPA. Para el ensayo de inmunofluorescencia utilizamos el anticuerpo anti-pSTAT3Ser727 (9G6) de Cell Signaling Technlogies seguido de incubación con un anticuerpo anti-IgG de ratón-Alexa 488, y anti-STAT3 (Santa Cruz C-20) seguido de incubación con un anticuerpo anti-IgG de conejo-Rodamina. Como esperábamos, en células transfectadas con siRNA Control y tratadas con MPA observamos una fuerte señal de co-localización de pSTAT3Ser727 y STAT3 tanto en los compartimentos citosólicos como nucleares, que se muestra en amarillo en el panel de superposición (Figura 18, primera línea del tercer panel). Por otro lado, células transfectadas con siRNA contra STAT3 mostraron una drástica disminución en la tinción de STAT3 y de pSTAT3Ser727 (Figura 18, segunda línea, primer y segundo panel). Estos datos nos proporcionaron evidencia de la especificidad del anticuerpo pSTAT3 Ser727 y nos permitieron continuar con nuestro objetivo, que es el análisis por inmunofluorescencia de pSTAT3Ser727 en muestras de pacientes.



Figura 18. *Análisis de la especificidad del anticuerpo anti-pSTAT3Ser727.* Células T-47D fueron transfectadas con siRNA contra STAT3 o siRNA Control durante 48 h. Luego de 24 h de ayuno, las células fueron tratadas con MPA 10 nM durante 10 min. La técnica de inmunofluorescencia se realizó como se describe en "Materiales y Métodos". pSTAT3Ser727 fue identificada con un anticuerpo monoclonal de ratón seguido de la incubación con un segundo

anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con Alexa 488 (verde). STAT3 fue identificada con un anticuerpo de conejo seguido de la incubación con un segundo anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con rodamina (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Imágenes representativas de dos experimentos independientes. Barras de escala: 10 µm.

Evaluamos 48 muestras de tumores obtenidos de los pacientes antes de la terapia de nuestra cohorte. Las expresiones de receptores de estrógenos y RP fueron realizados por inmunohistoquímica usando los anticuerpos comúnmente utilizados en la clínica para su diagnóstico. De las 48 muestras de tumores en los TMA, pudimos interpretar 39 muestras (82/). Las características clínicopatológicas de estos ejemplares se muestran en la Tabla A del anexo. Los niveles de pSTAT3Ser727 nucleares detectados por IF se contabilizaron teniendo en cuenta tanto el porcentaje de células positivas como la intensidad de la tinción. Para el análisis se consideró que una muestra era positiva para pSTAT3Ser727 nuclear cuando su puntaje era 1+ o más. En la figura 19 A se muestran tinciones representativas de los tumores. El puntaje 0 corresponde a una tinción apenas perceptible en menos del 10/ de las células, 1+ a una tinción débil en el 10-25/ de las células, 2+ a una tinción moderada en el 26-50/ de las células y 3+ tinción fuerte en más del 50/ de las células. Observamos una tinción nuclear positiva en 27 de 39 muestras analizables (69,2/). La distribución de pSTAT3Ser727 nuclear se muestra en la Figura 19 B, y fue similar a la distribución previamente descripta para pSTAT3Tyr705 (T. Sato et al. 2011).





Figura 19. *Localización celular de pSTAT3Ser727 en muestras de carcinomas mamarios invasivos.* (A) Puntaje nuclear de pSTAT3Ser727. Los niveles de pSTAT3Ser727 (verde) fueron determinados por inmunofluorescencia y analizados por microscopía confocal. Los núcleos fueron teñidos con ioduro de propidio (rojo). La superposición de las imágenes muestra la tinción nuclear de STAT3Ser727. El puntaje 0 representa tinción tenue o apenas perceptible en menos del 10/ de las células, 1+ tinción de localización nuclear débil en el 10-25/, 2+ tinción moderada en el 26-50/, y 3+ tinción de localización nuclear fuerte en >50/ de las células. (B) Distribución de la tinción nuclear de pSTAT3Ser727 en las muestras de carcinomas mamarios invasivos analizados (*puntajes* 0-3).

Cuando se examinó la posible correlación entre los diferentes parámetros clínicos, se encontró que la localización nuclear de pSTAT3Ser727 correlaciona significativamente con la expresión de RP en las muestras tumorales (P = 0,027, Tabla 2). De hecho, entre los tumores positivos para RP, 22 de los 27 (81/) presentaron localización nuclear de pSTAT3Ser727. En contraste entre los tumores RP-negativos sólo el 37/ presentó localización nuclear de pSTAT3Ser727 (3 de 8 tumores). Por otro lado, también se observó una tendencia para la localización nuclear de pSTAT3Ser727 en tejidos que expresan receptores de estrógenos, pero esta tendencia no fue estadísticamente significativa (P = 0,061).

de mama.					
	Cohorte Total (N=39)				
	pSTAT3Ser727, n (/)		valor de P ª		
	Negativo	Positivo	•		
Tamaño tumoral					
≤ 20mm	5 (41,7)	14 (56,0)	0,321		
>20mm	7 (58,3)	11 (44,0)			
Total N (⁄)	12 (32,4)	25 (67,6)			
Metastasis ganglionares					
Negativo	8 (66,7)	14 (56,0)	0,401		
Positivo	4 (33,3)	11 (44,0)			
Total N (⁄)	12 (32,4)	25 (67,6)			
Metástasis a distancia					
M0	11 (91,7)	26 (100,0)	0,316		
M1	1 (8,3)	0 (0)			
Total N (⁄)	12 (31,6)	26 (68,4)			
Estadio clínico					
I	4 (33,3)	11 (40,7)	0,472		
+ + V	8 (66,7)	16 (59,3)			
Total N (⁄)	12 (30,8)	27 (69,2)			
Grado tumoral					
Bien a moderadamente diferenciado ^c	5 (41,7)	17 (70,8)	0,092		
Poco diferenciado	7 (58,3)	7 (29,2)			
Total N (⁄)	12 (33,3)	24 (66,7)			
Expresión de RE ^d					
Negativo	3 (30,0)	1 (4,0)	0,061		
Positivo	7 (70,0)	24 (96,0)			
Total N	10 (28,6)	25 (71,4)			
Expresión de RP ^e					
Negativo	5 (50 <i>,</i> 0)	3 (12,0)	0,027		
Positivo	5 (50 <i>,</i> 0)	22 (88,0)			
Total N	10 (28,6)	25 (71,4)			

Tabla 2. Asociación entre la expresión de pSTATSer727 nuclear y las características clinicopatológicas del cáncer

^aTest de Fisher's. ^bAlgo a moderadamente diferencido: grado tumoral 1+2, Poco diferenciado: grado tumoral 3. ^cRE: Receptor de estrógeno. ^dRP: Receptor de progesterona.

CAPÍTULO II

Desarrollo de una inmunoterapia contra el

cáncer de mama utilizando a STAT3 como

blanco molecular

INTRODUCCIÓN (CAPITULO II)

1. BREVE INTRODUCCIÓN AL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune está compuesto por el sistema inmune innato y adaptativo. Esta clasificación tiene como fin facilitar el estudio de la inmunología. La inmunidad innata es la primera barrera de defensa del organismo, no requiere sensibilización previa y por lo tanto se manifiesta rápidamente (Janeway & Medzhitov, 2002). Básicamente, se compone de barreras físicas y anatómicas como la piel y los epitelios de las mucosas. Entre los componentes celulares, se destacan los neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células asesinas naturales o natural killers (NK) y células dendríticas (CDs). Además posee componentes humorales como el sistema de complemento, las proteínas de fase aguda y los interferones (IFN)- α y β (Fainboim & Geffner 2005). El sistema inmune innato carece de la exquisita especificidad del adaptativo, pero sin embargo, es capaz de discriminar lo propio respecto de lo no propio, peligroso o extraño a través de ciertos patrones moleculares presentes en los microorganismos (Janeway, 2005). La inmunidad adaptativa emplea como sistema de reconocimiento un repertorio amplio y variado de receptores antigénicos, distribuidos clonalmente en células T y B (Janeway, 2005). En el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa participan fundamentalmente los linfocitos y mediadores solubles liberados por los mismos como citoquinas. Cada clon B o T reconoce epitopes antigénicos a través de sus receptores BCR o TCR. La existencia de centenares de millones de clones diferentes brinda un repertorio adecuado para el reconocimiento de los diferentes antígenos (Fainboim & Geffner 2005). El linfocito T CD4⁺ (LT CD4⁺) o CD8⁺ (LT CD8⁺) que reconoció a su antígeno en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) II o I, respectivamente, se activa y sufre un proceso denominado expansión clonal que genera una progenie compuesta de células con idéntica especificidad antigénica. Al dividirse, una fracción mayoritaria de los integrantes del clon expandido mediarán funciones efectoras que llevarán a cabo frente al patógeno. Una fracción menor se diferenciará a células de memoria, las cuales pueden permanecer por años en nuestro organismo y permitir en el futuro una respuesta

rápida y eficiente frente a una re-exposición al mismo patógeno. Por lo tanto, la expansión clonal y la memoria inmunitaria representan dos propiedades esenciales de la inmunidad adaptativa, no compartidas por la inmunidad innata.

Los LT CD8⁺ citotóxicos (CTL) desempeñan un papel central en la erradicación o control de patógenos intracelulares como los virus y en la respuesta inmune anti-tumoral. Las células T CD4⁺ vírgenes pueden diferenciarse en linfocitos T colaboradores o helper (Th), que a su vez constituyen una población heterogénea ya que una vez activados pueden diferenciarse en diversas subpoblaciones efectoras, entre las cuales pueden mencionarse los linfocitos Th1, Th2 y Th17. Estas subpoblaciones difieren en la forma de inducción, los patrones de circulación, el perfil de citoquinas que producen y los mecanismos efectores que activan (Janeway, 2005). Además, las citoquinas características de cada perfil promueven la diferenciación de la propia subpoblación y en algunos casos pueden inhibir el desarrollo de otras subpoblaciones (O'Garra & Arai 2000). Las células T se diferencian hacia un perfil Th1 cuando las CDs producen IL-12 en ausencia de IL-4 o citoquinas inmunosupresoras. Los linfocitos Th1 se caracterizan por ser células productoras de IFN- γ , interleuquina (IL)-2 y linfotoxina- β y son esenciales en la activación de una respuesta inmune mediada por células fagocíticas, especialmente frente a patógenos intravesiculares. El IFN-y producido por los linfocitos Th1 estimula la actividad microbicida de las células fagocíticas, lo cual favorece la destrucción intracelular de los microorganismos fagocitados. El IFN-y también estimula la síntesis de anticuerpos IgG opsonizantes y fijadores de complemento, que facilitan la fagocitosis. Por el contrario, en la diferenciación hacia un perfil Th2 es importante la presencia de IL-4 (producida por células NKT y en menor grado por mastocitos) y ausencia de IL-12. Este perfil es característico de la respuesta a helmintos y alérgenos. Los principales mecanismos efectores asociados a las células Th2 son las reacciones inmunes mediadas por IgE, eosinófilos y mastocitos. A su vez, los linfocitos Th2 colaboran con las células B a los fines de promover la diferenciación a células plasmáticas productores de anticuerpos. Recientemente se ha descripto un nuevo linaje de células T CD4⁺ que poseen un alto potencial patogénico en enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes (Weaver et al 2006). Estas células se caracterizan por producir IL-17 y se denominan Th17 (Steinman 2007). Entre los factores claves involucrados en la generación de

dichas células se encuentran los factores de diferenciación TGF- β e IL-6 o IL-21, la IL-23 (que actúa como factor de crecimiento y estabilización) y los factores de transcripción STAT3, ROR γ t y ROR α (Korn et al. 2009). Las células Th17 actúan en infecciones por hongos y baterías extracelulares y son las responsables de perpetuar procesos autoinmunes e inflamatorios crónicos (Mcgeachy & Cua 2008).

2. INMUNIDAD TUMORAL

La historia natural de un tumor incluye las fases de crecimiento *in situ*, invasión, extravasación y metástasis. Durante esas fases, las células tumorales interaccionan con su microambiente tolerogénico y son influenciadas por señales que provienen del estroma, del endotelio vascular y del sistema inmune. En este contexto, los tumores sólidos están infiltrados por diferentes tipos celulares, como linfocitos, macrófagos y mastocitos. Generalmente se ha asociado a estos últimos con la producción de factores relacionados con la inflamación crónica y la progresión tumoral (Coussens & Werb 2002), mientras que el infiltrado de LB y LT, células NK y CDs se ha relacionado con el control de la enfermedad y mejor pronóstico en muchos tipos de cáncer (Sato et al. 2005).

Los tumores humanos albergan una multitud de mutaciones genéticas somáticas y desregulaciones epigenéticas que dan como resultado proteínas aberrantes que pueden ser potencialmente reconocidas por el sistema inmune como antígenos extraños. En 1909, Paul Erlich propuso por primera vez la idea de que el sistema inmune puede protegernos del desarrollo de tumores (Ehrlich, 1909). En 1950, Burnet y Thomas lograron demostrar esto, y postularon la teoría de la inmunovigilancia (Burnet 1957; Thomas 1959), que propone que el sistema inmune es capaz de detectar y eliminar las células transformadas antes de que puedan crecer e invadir nuevos tejidos. En aquella época su teoría fue luego desalentada ya que no hallaron diferencias en la incidencia de tumores cuando expusieron ratones atímicos a carcinógenos químicos. Alrededor de 1990, resurge la hipótesis de la inmunovigilancia al descubrirse que los ratones atímicos tienen células NK y poblaciones funcionales de células T de desarrollo extratímico. También en esa década se demostró que el IFN-y es clave para la

Página |85

protección frente a tumores transplantados o inducidos químicamente (Dighe et al. 1994) y espontáneos (Street, et al. 2002). Años más tarde, sobre la base de la hipótesis de la inmunovigilancia se propuso la teoría de la inmunoedición de tumores, definida por tres eventos claves: eliminación, mediante la cual el sistema inmune puede reconocer y deshacerse de las células tumorales recientemente originadas; equilibrio, donde el sistema inmune puede seleccionar y/o promover variantes de células tumorales que sobrevivan al control inmunológico, y escape, en la cual el tumor, a través del desarrollo de mecanismos de resistencia, puede evadir la respuesta inmunológica (Dunn, et al. 2004).

2.1. Efectores de la inmunidad anti-tumoral

Uno de los mecanismos efectores más efectivos de la respuesta inmune anti-tumoral es la activación de células citotóxicas (LT CD8⁺ y células NK). Estos tipos celulares inducen la muerte de las células blanco por apoptosis mediada por dos tipos de mecanismos. En el primero, las células citotóxicas reconocen y movilizan sus gránulos secretorios hacia la sinapsis inmunológica, contactando con las células blanco. Estos gránulos contienen diferentes componentes que participan en el mecanismo citotóxico, como la granzima B, capaz de activar caspasas y la perforina, capaz de desestabilizar la membrana plasmática. El complejo de granzima B junto a la perforina acceden al citosol de la célula blanco y activan al sistema de caspasas que inducen la muerte por apoptosis (Barry & Bleackley 2002). El segundo proceso involucra miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF)- α tales como el ligando de Fas (FasL). Una vez activadas, las células citotóxicas comienzan a expresar FasL en su superficie, lo que les permite unirse a diversas células que expresan su receptor CD95 (Fas). La interacción entre Fas y FasL induce la trimerización de Fas en la célula blanco promoviendo el reclutamiento de proteínas al dominio de muerte de Fas que desencadenan una cascada de activación de caspasas que involucra a la caspasa 8 y conduce a la apoptosis de la célula blanco.

Las células NK fueron descriptas por su capacidad de lisar células tumorales o células infectadas con virus que no expresaban moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Esto dio origen a la hipótesis de *missing self*, que propone que la

función de las células NK está regulada en parte por el reconocimiento de moléculas CMH de clase I (CMH-I) en la célula blanco (Cooper, et al. 2001). Para que las células NK desarrollen su función tienen primero que identificar a la célula blanco. Para ello las células NK poseen diferentes tipos de receptores con función de reconocimiento de moléculas en las células blanco y en consecuencia de activar la maquinaria citolítica y/o secretora de estas células. A su vez, existe otro tipo de receptores cuya función es inhibitoria. En consecuencia hoy se conoce que la actividad citotóxica de las células NK se encuentra finamente regulada por la integración de las señales inhibitorias y activadoras procedentes de sus receptores de superficie. En condiciones normales, la señalización a través de los receptores activadores está continuamente bloqueada y prevalecen las señales desencadenadas por los receptores inhibitorios, que mayoritariamente reconocen a diversas moléculas de clase I del CMH. En situaciones patológicas (principalmente frente a células tumorales o infectadas con virus) en las que se produce una disminución en la expresión de ligandos de receptores inhibitorios de células NK o en situaciones en las que se produce un aumento en la expresión de ligandos de receptores activadores de células NK, se genera un balance en la señalización intracelular en favor del desarrollo de citotoxicidad (Bryceson et al. 2006). La unión de receptores activadores a moléculas de membrana de células blanco no sólo desencadena la citotoxicidad sino que también promueve la producción de citoquinas, la migración de las células NK, su activación y su proliferación.

Hoy en día se sabe que las células NK poseen no sólo funciones efectoras citotóxicas contra los tumores, sino que además tienen un rol inmuno-regulatorio, ya que promueven la activación de CDs y su producción de citoquinas pro-inflamatorias, lo que en definitiva estimula respuestas T CD4⁺ y CD8⁺. En particular, las células NK secretan TNF- α e IFN- γ que contribuyen a la maduración de CDs. La producción continua de estas citoquinas genera una retroalimentación positiva que permite potenciar tanto la actividad de las células NK como de las CDs, conduciendo a una respuesta rápida y amplificada. Este diálogo recíproco entre las células NK con las CDs puede originar fuertes respuestas anti-tumorales a través de múltiples mecanismos. En primer lugar, las CDs maduras que infiltran el tumor tienen aumentada su capacidad migratoria y su capacidad como presentadora de antígenos, lo que permite su

movilización hacia el nódulo linfático donde puede iniciar una respuesta inmune adaptativa (Cooper, 2004). En segundo lugar, las CDs producen citoquinas, como la IL-12, que promuevan la activación y maduración de células NK por un lado, y por el otro la polarización hacia un perfil Th1. Esta interacción entre células NK y CDs puede ser muy importante a la hora de iniciar y sostener una respuesta anti-tumoral dependiente de linfocitos T (Moretta et al. 2002). Esto hace a las células NK muy atractivas en los estudios tendientes al desarrollo de inmunoterapias para el tratamiento del cáncer, ya que son capaces de perfilar la respuesta inmune adaptativa anti-tumoral y destruir células transformadas.

2.2. Acción de los linfocitos T CD4⁺ en la inmunidad anti-tumoral

Los LT CD4⁺ son fundamentales para la activación y regulación de la defensa del organismo contra las infecciones y para una adecuada función de LT CD8⁺. Sin embargo, el rol de los LT CD4⁺ en la inmunidad anti-tumoral es bastante controvertido (Muranski & Restifo 2009). Tradicionalmente, los CTL eran considerados el único componente necesario para la eliminación de tumores, pero en los últimos años se hizo evidente el rol de los LT CD4⁺ en el desarrollo de una inmunidad anti-tumoral efectiva. En la bibliografía existen numerosos reportes que describen la función de los LT CD4⁺ como proveedores de señales regulatorias requeridas para la activación de los CTL (Kennedy & Celis 2008). Sin embargo, se ha demostrado que en muchos casos, los tumores pierden con frecuencia la capacidad de procesar y presentar antígenos endógenos a los LT CD8⁺, indicando que se requieren otros mecanismos de eliminación del tumor independientes de los CTLs (Khong & Restifo 2002). Algunos trabajos demostraron que los LT CD4⁺ son capaces de proteger a los animales de experimentación contra la inoculación de tumores hematológicos o sólidos sin la participación de la población de células CD8⁺ (Fujiwara & Fukuzawa 1984). También existen evidencias que tanto las células Th1 como las Th2 son capaces de mediar respuestas anti-tumorales mediante el directo reconocimiento y eliminación de células malignas (Nishimura et al. 1999). Por otro lado, las citoquinas producidas por los LT CD4⁺ pueden activar células de la inmunidad innata como los eosinófilos y los macrófagos lo que favorece la eliminación de las células tumorales (Hung et al.

1998). En particular, la secreción de IFN-γ parece tener un rol fundamental en la regulación de la actividad anti-tumoral de los macrófagos (Corthay et al. 2005; Nishimura et al. 2000). Asimismo, las células T CD4⁺ también pueden reclutar células NK en los tumores (Kennedy & Celis 2008) y mediar sus respuestas anti-tumorales (Broeke, et al. 2003).

2.3. Estrategias inmunosupresoras mediadas por células tumorales

Como mencionamos anteriormente, para que se desarrolle un tumor, las células precancerígenas deben primero adquirir mecanismos de escape inmunológico para evadir el ataque de las células del sistema inmune. Entre los principales mecanismos utilizados por los tumores para evitar el reconocimiento inmunológico se encuentran la inducción de una presentación antigénica inadecuada, la producción de factores inmunosupresores, la expresión de galectina-1 y la activación de las señales negativas de co-estimulación (Rabinovich et al., 2007). Además, las células tumorales pueden promover la expansión, activación y migración de ciertos tipos de células regulatorias capaces de suprimir la respuesta inmunológica antitumoral, tales como linfocitos T reguladores (Tregs), células supresoras mieloides (MDSCs), macrófagos asociados al tumor (TAM) y distintos subtipos de CDs maduras e inmaduras (Zou 2006). Asimismo, las células tumorales pueden interferir con la acción de las células efectoras; se observaron trabajos en los que las células tumorales evitan ser detectadas por las células NK al no expresar ligandos para receptores activadores, como por ejemplo el ligando de NKG2D. También pueden evitar su eliminación mediada por células T al desarrollar insensibilidad a IFNy. Aun cuando la presentación antigénica es correcta, las células tumorales pueden evitar al sistema inmune aumentando la expresión de moléculas anti-apoptóticas (FLIP y BCL-XL), expresando receptores de muerte mutados (Fas, TRAIL) (Hinz et al. 2000; Takahashi et al. 2006) o inhibiendo directamente la actividad de células T a través de la expresión de ligandos supresores (PD-L1) (Salatino et al., 2008).

3. STAT3 E INMUNOSUPRESIÓN TUMORAL

Como mencionamos en la introducción general, STAT3 regula genes implicados en la proliferación celular y en la producción de factores angiogénicos y antiapoptóticos (Bromberg et al. 1998; Buettner et al. 2002). Además, estudios recientes han identificado a STAT3 como una molécula importante en la mediación de la inmunosupresión inducida por tumores. Por un lado, STAT3 es un potente regulador negativo de la respuesta inflamatoria mediada por linfocitos Th1. Por el otro, es un importante activador de genes cruciales para la inmunosupresión, ya que la activación de STAT3 en células tumorales promueve la secreción de factores inmunosupresores, como el VEGF y la IL-10. Estos factores, a su vez, tienen la capacidad de activar a STAT3 en aquellas células que se encuentran interactuando con el tumor (Wang et al. 2004). Esto lleva a la propagación de la activación de STAT3 desde las células tumorales hacía, por ejemplo, diversas células del sistema inmune, lo cual provee un mecanismo de retroalimentación positiva que conduce a la supresión de la respuesta de la inmunidad innata y adaptativa contra el tumor. Por un lado, la actividad de STAT3 en CDs afecta negativamente su maduración, inhibiendo la expresión de CMH de clase II y de moléculas coestimuladoras, y citoquinas como la IL-12 (Tianhong Wang et al. 2004). Por el otro, el aumento de la actividad de STAT3 en neutrófilos y células NK inhibe su actividad citotóxica contra las células tumorales y disminuye la capacidad efectora en LT C8⁺ (Figura 20).



Figura 20. La señalización de STAT3 facilita la comunicación entre las células tumorales y diversas células del sistema inmune inhibiendo la inmunovigilancia. La actividad de STAT3 está aumentada en células T regulatorias (Treg). La señalización de STAT3 en Treg puede aumentar la expresión de moléculas inmunosupresoras, como el factor de transformación de crecimiento- β (TGF- β) e IL-10, que a su vez inhiben la función efectora de los LT CD8⁺ así como también la maduración de células dendríticas. Las células NK y los neutrófilos en el microambiente tumoral también tienen activación constitutiva de STAT3, lo que inhibe su actividad citotóxica en ambos tipos celulares. STAT3P⁺, STAT3 fosforilada en el residuo tirosina (activada).

Los hallazgos que vinculan la activación de STAT3 con la inhibición de la inmunovigilancia comenzaron en el año 1999. Mediante terapia génica contra el melanoma murino B16, usando un vector de expresión que codifica para una variante dominante negativa de STAT3 (DNSTAT3), se observó no sólo una disminución del crecimiento tumoral sino también una fuerte infiltración de células del sistema inmune (Niu et al. 1999). Años más tarde, esta observación fue reforzada mediante el trabajo pionero de Wang y colaboradores que demostraron que la inhibición de la actividad de STAT3 en células tumorales promueve la expresión de varias citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas. A la inversa, la activación de STAT3 en fibroblastos normales, ya sea a través de la transformación mediada por Src o por la

sobreexpresión de un mutante constitutivamente activa de STAT3, STAT3C, inhibe la liberación de citoquinas pro-inflamatorias inducida por el lipopolisacárido (LPS). Tomados en conjunto, estos hallazgos demuestran que la actividad de STAT3 en tumores puede influir negativamente en la expresión de moléculas inmunoestimulatorias. Trabajos adicionales revelaron que los mediadores pro-inflamatorios producidos por las células tumorales que tienen bloqueada la activación de STAT3 podrían activar células del sistema inmune, como macrófagos y neutrófilos, lo que conduce a una secreción adicional de mediadores pro-inflamatorios y en consecuencia a un aumento de la citotoxicidad contra las células tumorales (Wang et al. 2004). En efecto, los mediadores pro-inflamatorios producidos por el bloqueo de STAT3 en células tumorales también conducen a un aumento de la presentación antigénica en CDs derivadas de médula ósea, promoviendo de este modo la activación de LT vírgenes (Wang et al. 2004).

La capacidad de STAT3 para inhibir la expresión de mediadores pro-inflamatorios no es exclusiva de las células tumorales ya que, como mencionamos previamente, STAT3 también regula negativamente la expresión de moléculas inmunoestimulatorias en células del sistema inmune. Por ejemplo, la inhibición de STAT3 en macrófagos conduce a la expresión de altos niveles de varias citoquinas pro-inflamatorias similares a las encontradas en las células tumorales en las que la señalización de STAT3 esta inhibida (Takeda et al. 1999). Estudios de los últimos años han demostrado que el bloqueo de la señalización de STAT3 en células hematopoyéticas, antes o después del establecimiento del tumor, puede inhibir significativamente el crecimiento del tumor e incluso provocar el rechazo del tumor por medio de la activación del sistema inmune, independientemente de la actividad STAT3 en las células del tumor (Kortylewski et al. 2005).

La actividad persistente de STAT3 en células mieloides resulta en la acumulación de células mieloides inmaduras y en la inhibición de la diferenciación *in vitro* de CDs. La inhibición de STAT3, mediante el uso del inhibidor farmacológico JSI-124 (Cucurbitacin I), resultó en la diferenciación de CDs y en la eliminación de células mieloides inmunosupresoras en distintos modelos tumorales (Nefedova, et al. 2005). Es más, se ha demostrado en varios trabajos que el uso de este inhibidor farmacológico potencia el efecto de varias vacunas anti-tumorales (Molavi et al. 2008; Nefedova et al. 2005).

Como ya mencionamos, STAT3 se encuentra constitutivamente activa en una gran variedad de tumores humanos. En particular, STAT3 está constitutivamente activa en el 69/ de cánceres de mama (Dolled-filhart et al. 2003), en el 82/ de cánceres de próstata (Mora et al. 2002), en el 82/ al 100/ de carcinomas de cabeza y cuello (Nagpal et al. 2002) y en el 71/ de carcinomas nasofaríngeos (Hsiao et al. 2003). Adicionalmente, existe una correlación inversa entre los niveles de activación de STAT3 en células tumorales con la migración de células del sistema inmune *in vitro* y la infiltración de tumores *in vivo* (Burdelya et al. 2005).

Estos antecedentes en su conjunto, indican que STAT3 está activado en una gran variedad de tipos de cáncer y que el bloqueo de STAT3 puede inducir un potente efecto antitumoral mediado tanto por la inmunidad innata como adaptativa. Este efecto pleiotrópico es una potencial consecuencia de la amplia función de STAT3 en la organización del microambiente del tumor, por un lado promoviendo el crecimiento del tumor y por el otro inhibiendo la inmunovigilancia. Es por esto que STAT3 ha surgido como un blanco interesante en el desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer.

4. INMUNOTERAPIAS DIRIGIDAS CONTRA EL CÁNCER

En la actualidad existen tres tratamientos convencionales contra el cáncer: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Los dos primeros cumplen su objetivo terapéutico cuando las células tumorales se encuentran localizadas puntualmente. Por el contrario, cuando éstas se han diseminado desde su lugar de origen, es necesario recurrir a la quimioterapia, para poder eliminar a las células tumorales diseminadas en el organismo. No obstante los procedimientos de esta práctica son, en mayor o menor medida, tóxicos para las células normales limitando sus aplicaciones terapéuticas. Por otro lado, en base a la relación entre el sistema inmune y el cáncer, actualmente se están estudiando y aplicando en la clínica otro tipo de terapias conocidas como inmunoterapias.

Existen distintos tipos de inmunoterapias:

 Terapias con anticuerpos monoclonales: basada en el desarrollo de anticuerpos contra antígenos tumorales.

- Inmunoterapias no específicas: diseñadas para potenciar la respuesta del sistema inmune de manera general, resultando en una mayor reactividad contra las células tumorales.
- Vacunas anti-tumorales: funcionan de igual manera que las vacunas tradicionales, con el objetivo de activar el sistema inmune para atacar las células tumorales de manera específica. Su objetivo es ayudar a tratar el cáncer o prevenir su recurrencia.

4.1. Terapia con anticuerpos monoclonales

Las terapias basadas en el uso de anticuerpos monoclonales en el tratamiento del cáncer se ha consolidado como una de las estrategias terapéuticas más eficaces tanto para malignidades hematológicas como para tumores sólidos. Algunos ejemplos de anticuerpos monoclonales para el tratamiento del cáncer aprobados por la FDA (del inglés, *US Food and Drug Administration*) son: trastuzumab (Herceptin[®]), que es un anticuerpo contra el receptor ErbB2, aprobado para el tratamiento del cáncer de mama; bevacizumab (Avastin[®]), contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) aprobado para el cáncer de colon, glioblastoma y cáncer renal; y rituximab (Rituxan[®]), contra el CD20 aprobado para linfomas no-Hodgkin y leucemia linfocítica crónica (Scott, et al. 2012).

Además de los antígenos tumorales, otro de los blancos de las inmunoterapias es la modulación de citoquinas y el bloqueo de moléculas involucradas en inmunosupresión. En particular el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) es un regulador crucial en la inducción y mantenimiento de la tolerancia (Peggs et al. 2009) y está presente en todas las células T. El bloqueo de CTLA-4 con anticuerpos monoclonales (Ipilimumab) fue eficaz en la inhibición del crecimiento tumoral en ratones y actualmente está aprobado por al FDA para el tratamiento de melanoma metastásico (Ribas et al. 2005; Scott et al. 2012; Weber et al. 2008).

4.2. Inmunoterapias no específicas

No están dirigidas contra una determinada célula o antígeno, sino que estimulan el sistema inmune de manera general, lo cual puede dar lugar a una mayor actividad contra las células tumorales. Algunas inmunoterapias no específicas se pueden administrar solas como tratamientos contra el cáncer o pueden ser utilizadas como adyuvantes para estimular el sistema inmune. Algunos ejemplos de este tipo de terapia aprobados por la FDA son: las citoquinas, como la IL-2, aprobada para tratar el cáncer avanzado de riñón y melanomas metastásicos; el IFN- α aprobado para el uso contra leucemias, linfoma no-Hodgkin, linfoma cutáneo de células T, melanomas, cáncer de riñón y sarcoma de Kaposi; el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) se utiliza para aumentar el número de glóbulos blancos después de la quimioterapia. También se han aprobado numerosos fármacos que estimulan el sistema inmune de una manera inespecífica, al igual que las citoquinas, cómo la talidomida, que se utiliza como un tratamiento para el mieloma múltiple y algunos otros tipos de cáncer; el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) que ayuda a activar el sistema inmune y se utiliza para tratar el cáncer de vejiga (Monjazeb, et al., 2012).

4.3. Vacunas anti-tumorales

El objetivo de una vacuna anti-tumoral es inducir una respuesta inmune celular o humoral eficaz contra al tumor o bien mejorar la respuesta ya existente. Para alcanzar esto, es necesario inducir la activación de células reactivas contra el tumor y que estas células puedan ejercer su acción anti-tumoral. Es por esto, que el primer paso para el desarrollo de una eficaz vacuna anti-tumoral es superar los mecanismos inmunosupresores asociados al tumor. El uso del sistema inmune adaptativo como una herramienta específica contra el cáncer es atractivo, precisamente por su exacta especificidad y porque no daña otros tejidos, cómo si ocurre con la quimioterapia. La especificidad puede estar dada por el reconocimiento de anticuerpos a proteínas de superficie celular o por LT CD8⁺ citotóxicos o por LT CD4⁺ colaboradores que reconocen péptidos tumorales asociados a los CMH de clase I y II, respectivamente. Por otro lado, las vacunas anti-tumorales son atractivas porque de ser exitosas, la respuesta inmune

desarrollada puede derivar en memoria inmunológica, proporcionando la capacidad para proteger en el futuro contra alguna recurrencia del tumor.

Existen numerosos desafíos a la hora de diseñar una vacuna eficaz. En primer lugar, se deben seleccionar aquellos antígenos presentes en las células tumorales que sean inmunogénicos. En segundo lugar, se debe proporcionar una plataforma capaz de ofrecer adecuadamente estos antígenos, y por último, es necesario mejorar el contexto inmunoestimulante en el cual la vacuna es entregada. En algunos casos de cánceres inducidos por virus (por ejemplo: papiloma humano, Hepatitis B y C, Epstein Barr) que son aproximadamente el 15/ de todos los canceres diagnosticados, puede pensarse en realizar vacunas dirigidas contra antígenos virales. En este sentido, se han desarrollado vacunas preventivas frente a dos serotipos del virus del papiloma humano (HPV-16 y HPV-18) a administrarse en mujeres que no son sexualmente activas (Garland et al. 2007). Estas vacunas inducen una respuesta humoral frente a estos serotipos pero suelen fallar durante una infección crónica de HPV donde ocurre integración genómica de genes virales codificando para oncoproteinas (E6 y E7). Se desarrollaron también vacunas terapéuticas en las cuales E6 y E7 son administradas junto con adyuvante de Freund incompleto obteniéndose 50/ de erradicación del tumor en mujeres con neoplasia pre-maligna (Kenter et al. 2009).

Por último nos referiremos a las terapias en donde se busca incrementar la respuesta del portador frente al tumor mediante la inoculación de células enteras. Entre este tipo de estrategias, se halla, por un lado, la transferencia adoptiva de células inmunes. Algunas metodologías se centran en la transferencia de células efectoras como LT CD4⁺ y LT CD8⁺ (Dudley et al. 2008; Muranski & Restifo 2009); o en la transferencia de células genéticamente modificadas para que expresen un TCR anti-tumoral de alta afinidad (Lauritzsen & Bogen 1993). Algunas metodologías buscan mejorar la presentación antigénica al realizar transferencia de células dendríticas expuestas *ex vivo* a antígenos tumorales. Un ejemplo de este tipo de vacuna es Sipuleucel-T (Provenge®), la única vacuna anti-tumoral aprobada por la FDA hasta el momento. Esta vacuna se utiliza en pacientes con cáncer de próstata que no responden a la terapia hormonal y se basa en la exposición *in vitro* de CDs diferenciadas del propio paciente al antígeno tumoral fosfatasa ácida prostática (*prostatic acid phosphatase*, PAP). Estas CDs

cargadas con el antígeno tumoral PAP son inyectadas al paciente donde promueven el desarrollo de una respuesta inmune contra el cáncer de próstata. A pesar de que esta vacuna no erradica por completo a las células tumorales, ha mostrado cierta efectividad prolongando la supervivencia de los pacientes en varios meses (Monjazeb et al. 2012). Por otro lado, en nuestro país el grupo del Dr. Mordoh ha desarrollado una inmunoterapia contra el melanoma basada en la inyección de células dendríticas cargadas con células tumorales apoptóticas y necróticas. Esta terapia ha sido probada en pacientes con melanoma en un ensayo clínico de fase I, en donde se ha observado que la vacuna es segura, bien tolerada y puede inducir inmunidad específica contra antígenos tumorales (Von Euw et al. 2008).

Por último, haremos una mención especial sobre las vacunas de células tumorales enteras, ya que son de interés para nuestro trabajo.

4.3.1. Vacunas basadas en células enteras

Las vacunas celulares se definen como vacunas que usan células enteras o lisados celulares, ya sea como fuente de antígenos o como plataforma para presentar los antígenos. Existen distintos tipos de vacunas celulares, las vacunas de células tumorales salvajes inoculadas junto a algún adyuvante o de células tumorales modificadas genéticamente para suministrar antígenos *in vivo* en un contexto inmunoestimulatorio. En este último enfoque, se utiliza a la célula tumoral como una fuente de inmunógenos capaz de inducir una respuesta inmune anti-tumoral. La ventaja de utilizar este tipo de enfoque es que no es necesario identificar de manera prospectiva a los antígenos tumorales y que se pueden dirigir simultáneamente múltiples antígenos. En la actualidad, se encuentran en desarrollo clínico este tipo de vacunas, basadas en la inmunización con células tumorales enteras, tanto autólogas como alogénicas. Los primeros estudios realizados con células tumorales irradiadas enteras por sí solas no han demostrado eficacia alguna. Sin embargo, la expansión del conocimiento de cómo las citoquinas y quimioquinas trabajan juntas para inducir una inmunidad sistémica, condujo al desarrollo de enfoques basados en células tumorales enteras modificadas

genéticamente para expresar estas moléculas inmuno-estimulantes. Se han hecho extensas pruebas preclínicas y clínicas basadas en esta segunda generación de vacunas de células tumorales enteras que expresan citoquinas, quimioquinas y moléculas co-estimuladoras que han demostrado diversos grados de inmunidad anti-tumoral en modelos de ratón y en los primeros ensayos clínicos. Un ejemplo de esto es la vacuna GVAX (Cell Genesys), que consiste en la modificación genética de cualquier célula tumoral, autóloga o alogénica, para expresar GM-CSF. El GM-CSF funciona localmente de una manera paracrina para reclutar y activar células presentadoras de antígeno y para promover la fagocitosis de células tumorales irradiadas para ser presentadas a la inmunidad adaptativa (Ercolini et al. 2005; Betty Li et al. 2009). Otro tipo de vacuna con células enteras es Canvaxin (CancerVax) que se trata de una vacuna contra el melanoma basada en la inyección de células de tres líneas celulares de melanoma irradiadas junto a BCG. Ensayos clínicos utilizando esta estrategia han demostrado una respuesta positiva en una pequeña proporción de los pacientes en un estadio avanzado de la enfermedad (Hsueh et al. 1999; Morton et al. 1992).

En numerosos modelos pre-clínicos las vacunas contra el cáncer han demostrado éxito en la inhibición del crecimiento de tumores e inclusive en su regresión (Le et al. 2011). También existen pruebas sobre su capacidad para inducir respuestas inmunes en pacientes. En muchos casos, estas respuestas se correlacionan con mejores resultados clínicos. Sin embargo, las vacunas contra el cáncer aún no han demostrado su verdadero potencial en los ensayos clínicos. Esto se debe, probablemente, a la dificultad de inducir una respuesta anti-tumoral significativa en aquellos pacientes con enfermedad avanzada a causa de los mecanismos de tolerancia pre-existentes, proporcionando pruebas de que los criterios tradicionales pueden ser insuficientes a la hora de probar la eficacia de los enfoques inmunoterapéuticos. Es por esto que nos proponemos en el siguiente trabajo desarrollar una estrategia de vacunación capaz de superar la tolerancia tumoral.

OBJETIVO GENERAL (CAPÍTULO II)

Evaluar el efecto anti-tumoral de la inmunización con células de cáncer de mama que tienen bloqueada la activación de STAT3.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar el fenotipo secretorio de células de cáncer de mama luego del bloqueo de la activación de STAT3.
- Estudiar el efecto de la inmunización con células de cáncer de mama que tienen inhibida la activación de STAT3 frente al desarrollo tumoral (abordaje profiláctico).
- Evaluar la efectividad de la inmunización con células que tienen bloqueada la activación de STAT3 en la inhibición de metástasis espontáneas.
- Caracterizar los efectores del sistema inmune involucrados en la respuesta antitumoral inducida por la inoculación de células tumorales con STAT3 bloqueado.
- Estudiar la capacidad de la inmunización con células tumorales que tienen inhibida la activación de STAT3 de superar la tolerancia inmunológica e inhibir el crecimiento de un tumor ya establecido (abordaje terapéutico).
RESULTADOS (CAPÍTULO II)

1. Estudio de la secreción de mediadores inflamatorios en células tumorales que tienen bloqueada la activación de STAT3

Existen numerosas evidencias indicando que la activación constitutiva de STAT3 en células tumorales regula negativamente su capacidad para expresar mediadores inflamatorios. Estudios realizados en células B16 de melanoma murino, en células de carcinoma de colon CT-26, y en la línea de carcinoma mamario SCK-1, demostraron que el bloqueo de STAT3 por transfección con una variante dominante negativa (DN) de STAT3 (STAT3 β) o con un oligonucleótido antisentido de STAT3, aumentó la expresión de interferón- β (IFN- β), del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), de IL-6 y de las quimioquinas RANTES e IP 10 (Wang et al. 2004). Teniendo en cuenta estas evidencias, decidimos investigar el efecto del bloqueo de STAT3 en la expresión de citoquinas y quimioquinas en células C4HD, provenientes de un carcinoma mamario murino progestágeno dependiente. Para ello, transfectamos células C4HD con un vector de expresión de STAT3DN, STAT3Y705F, (C4HD-STAT3DN) o alternativamente las tratamos con un inhibidor farmacológico de STAT3, JSI-124. Luego de 48 horas, se levantaron las células y se colectaron los sobrenadantes y sobre este último se determinó la presencia de citoquinas por medio de un arreglo de anticuerpos anti citoquinas. La expresión de la proteína STAT3Y705F fue corroborada por Western Blot (WB), revelando la membrana con un anticuerpo contra el péptido FLAG, fusionado a STAT3Y705F (Figura 21 A, panel de la izquierda). Por otro lado, también verificamos la efectividad del tratamiento con JSI-124, observando que la incubación con el inhibidor farmacológico inhibe la fosforilación de STAT3 en el residuo tirosina 705 en células C4HD (Figura 21 A, panel de la derecha). A continuación incubamos las membranas del arreglo de anticuerpos de captura para las distintas citoquinas y quimioquinas, con los sobrenadantes de los distintos tratamientos y luego revelamos por quimioluminiscencia (Figura 21 B). La intensidad de la señal obtenida para cada punto del arreglo de anticuerpos anti citoquinas y quimioquinas fue semicuantificada y graficamos las veces de inducción en la expresión de las distintas citoquinas o quimioquinas en cada tratamiento con respecto al control sin tratar (Figura 21 C). Pudimos observar un aumento en la secreción de las citoquinas TNF- α , IL-2, IFN- γ e IL-6 γ en las quimioquinas IP-10 γ Rantes.



Figura 21. Secreción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias en células C4HD que tienen bloqueada la activación de STAT3. (A) Células C4HD fueron transfectadas con el vector de expresión de una variante dominante negativa de STAT3 (C4HD-STAT3Y705F) o con el vector vacío (C4HD-pcDNA3.1) o tratadas con el inhibidor farmacológico de STAT3 JSI-124 (2 µM), en presencia o ausencia de MPA 10 nM. Las células 4T1 fueron transfectadas con STAT3Y705F o con pcDNA3.1 durante 48 h. Realizamos WB con los extractos proteicos para evaluar la fosforilación de STAT3 en tirosina 705 y la expresión de FLAG. Las membranas fueron sometidas a *stripping* y reveladas con la proteína total. (B) Se colectaron medios condicionados de células C4HD transfectadas con un vector de expresión de STAT3Y705F en presencia de MPA 10 nM o tratadas con JSI-124 en presencia de MPA o únicamente crecidas en medio con MPA. Utilizamos un arreglo de anticuerpos específicos para analizar la presencia de citoquinas y quimioquinas en los medios condicionados. (C) Cuantificación del arreglo de anticuerpos de citoquinas y quimioquinas. Los puntos del arreglo fueron cuantificados por densitometría usando el programa

Image J y normalizados al control positivo (recuadro). Los resultados están expresados como veces de inducción de cada citoquina con respecto a C4HD control (valor arbitrario de 1).

2. Efecto anti-tumoral de la inmunización con células tumorales que tienen bloqueada la activación de STAT3

En línea con lo observado por otros investigadores, nuestros resultados muestran que el bloqueo de la señalización de STAT3 en células tumorales induce la expresión de mediadores inflamatorios necesarios para la activación de células del sistema inmune. Este es uno de los aspectos más interesantes con respecto al potencial uso terapéutico de las estrategias anti-STAT3, ya que el efecto antitumoral observado al bloquear la activación de dicha proteína estaría mediado por una respuesta inmune del huésped. Por lo tanto, diseñamos un protocolo de inmunización tendiente a explorar si la inyección seriada de células que expresan un DN de STAT3 podía tener un potencial inmunogénico capaz de inducir una respuesta inmune antitumoral y proteger contra un posterior desafío con el tumor C4HD. Para ello, los ratones se invectaron tres veces, a intervalos de 2 semanas, con 2x10⁶ células de un cultivo primario del tumor C4HD que habían sido transfectadas durante 48 h con el vector STAT3Y705F e irradiadas con 50 Gy de una fuente de ⁶⁰Co para inactivarlas. Como se mostró en la figura 21 A, las células se transfectaron con 2 μ g/hoyo de p6, cantidad de vector necesaria para ver una alta expresión de la proteína mutante y que a su vez resulta efectiva para inhibir la proliferación celular mediada por MPA (Proietti et al. 2005). Como grupos controles se inocularon ratones con células tratadas con MPA 10nM o transfectadas con un vector vacío, pcDNA3.1, e irradiadas, o simplemente se inocularon con el vehículo, PBS estéril. Dos semanas después de la última inoculación, los animales se desafiaron con un fragmento de tumor parental C4HD y simultáneamente se les aplicó MPA de depósito en el flanco opuesto. Se monitoreó el crecimiento tumoral 21 días luego del desafío (Figura 22 A). Como se muestra en la curva de crecimiento en la figura 22 B, no se observó protección alguna en los ratones inmunizados con células tratadas con MPA o transfectadas con el vector vacío, ya que dichos ratones desarrollaron tumores con la misma velocidad de crecimiento que los ratones sin inmunizar

(grupo PBS). Sin embargo, se observó una inhibición significativa en el crecimiento tumoral en ratones que habían sido inmunizados con las células transfectadas con STAT3Y705F (Figura 22 B), en comparación con los tumores de los grupos controles. Al final del experimento, día 21, el crecimiento tumoral en los animales inoculados con células transfectadas con el DN de STAT3 resultó inhibido en un 77,3±5,4/, 74,3±6,1/, 78,2±5,2/ con respecto a los grupos PBS, C4HD salvajes y vector vacío, respectivamente. La velocidad de crecimiento de los tumores en los ratones inmunizados con células transfectadas con STAT3Y705F fue también significativamente menor (p<0,001) que la de los controles (Tabla 3). Estos resultados sugieren que la inyección con células que tienen bloqueada la activación de STAT3 podría estar promoviendo una respuesta inmune del huésped contra el tumor parental C4HD, que resulta en la inhibición del crecimiento tumoral.



Figura 22. Efecto de la inmunización con células C4HD transfectadas con el vector STAT3Y705F sobre el crecimiento de tumor C4HD. (A) Células C4HD fueron transfectadas in vitro con 2 µg de STAT3DN (C4HD-STAT3Y705F) o un vector vacío (C4HD-pcDNA3.1) por 48 h, y posteriormente fueron inactivadas por irradiación con 50 Gy de ⁶⁰Co. Se inyectaron ratones hembra BALB/c tres veces en total (n=6/grupo), con un intervalo de dos semanas entre cada inyección, con 2x10⁶ células C4HD-DNSTAT3 o C4HD-pcDNA3.1 o células C4HD salvajes (sin transfectar) o con PBS. Dos semanas después de la última inoculación, los animales se desafiaron con un fragmento de tumor C4HD y simultáneamente se les aplicó MPA de depósito en el flanco opuesto. (B) Se monitoreó el crecimiento tumoral 21 días post-desafío tal como se explica en "Materiales y Métodos". Cada punto representa la media del volumen de 5 tumores ± ES. *, p<0,05; ***, p<0,001, ratones inmunizados con C4HD STAT3DN vs grupos control. Se muestra un experimento representativo de cinco realizados.

Tratamiento	Media del volumen tumoral (mm ³) ± ES	Tasa de crecimiento ± ES (mm ³ /día)	 / Inhibición del crecimiento
PBS	639,5 ± 54,3 ^ª	16,1 ± 1,8ª	
C4HD	534,1 ± 116,6 ^ª	18,7 ± 3,7 ^a	
C4HD-pcDNA3.1	662,6 ± 164,7 ^a	$21,4 \pm 2,9^{a}$	
C4HD-STAT3Y705F	157,2 ± 37,3 ^b	5,6 ± 1,4 ^b	77,3 ^c , 74,3 ^d y 78,2 ^e

Tabla 3. Vacuna celular profiláctica de células C4HD-STAT3Y705F

Los volúmenes tumorales y el porcentaje de inhibición del tumor de animales inmunizados con C4HD-STAT3Y705F con respecto a los inyectados con PBS, o inmunizados células C4HD o con células C4HD-pcDNA3.1 fueron calculados al día 23 post-desafío. Las tasas de crecimiento se calcularon como las pendientes de las curvas de crecimiento.

^a vs^b, *p*<0.01.

^c con respecto a PBS, para la inhibición del crecimiento, p<0,001,

^d con respecto C4HD cells, para la inhibición del crecimiento, p<0,001,

^e con respecto células C4HD-pcDNA3.1, para la inhibición del crecimiento, p<0,001,

Adicionalmente estudiamos la morfología general de los tumores extirpados el día 21 de los ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F, C4HD-pcDNA3.1, C4HD o con PBS, a través de la observación de cortes histológicos teñidos con H&E. La figura 23 muestra cortes representativos de los tumores de los distintos grupos. Se observó que los tumores proveniente de los animales inmunizados con células C4HD transfectadas con el DN de STAT3 presentan extensas áreas de fibrosis y necrosis acompañado de infiltración linfocitaria (Figura 23). En un área no necrótica, el tumor muestra pocas mitosis (recuadro, H&E, ×400). Además, estos tumores presentan una marcada disminución en el número de mitosis por campo, en comparación con los tumores de los animales inyectados con células C4HD-pcDNA3.1 (10,5 \pm 0,5 vs. 3,8 \pm 0,3, p<0,01) (Figura 23). En los tumores de los ratones inmunizados con células C4HD transfectadas con el vector vacío se observó la estructura de un carcinoma ductal compuesto por pseudolóbulos de células glandulares altamente cohesivas separadas por un escaso estroma vascular (H&E, ×100).



Figura 23. Análisis histopatológico de los tumores C4HD. Se cortaron secciones de tumores C4HD obtenidos de ratones inmunizados (H&E ×100). Las figuras mitóticas se indican con flechas en la imagen con mayor aumento (recuadro, H&E ×400, paneles izquierdos). En los tumores provenientes de ratones inmunizados con C4HD-STAT3Y705F, se observa en la imagen de la izquierda, necrosis, apoptosis e hialinización (H&E, ×100, panel inferior izquierdo) y una a alta infiltración linfocitaria (indicadas con puntas de flecha en el recuadro, H&E, ×400. panel inferior derecho).

Con el objetivo de extender nuestros resultados obtenidos en células C4HD a otros modelos tumorales, evaluamos la eficacia de esta vacuna utilizando el carcinoma mamario murino 4T1. Este modelo se obtuvo a partir de un tumor que surgió de manera espontánea en un ratón de la cepa BALB/cfC3H (Aslakson & Miller 1992). Este tumor es capaz de generar metástasis en diversos órganos, incluyendo pulmón, hígado, cerebro y hueso y tiene la particularidad de tener STAT3 constitutivamente activa (Ling & Arlinghaus, 2005). El tumor 4T1 crece progresivamente y causa una enfermedad letal, inclusive luego de la extirpación del tumor primario. Otra particularidad que presenta es la falta de expresión de receptores hormonales (receptores de estrógenos y PR) y ausencia de expresión de ErbB2. Dado que comparte numerosas características con los carcinomas humanos estadio IV, se ha convertido en los últimos años en un excelente modelo animal. Además, tanto las células 4T1 como las células C4HD son poco inmunogénicas (Aslakson & Miller 1992; Dexter et al. 1978; Schillaci et al., 2006). Para evaluar si la vacuna propuesta es efectiva en este modelo realizamos inmunizaciones siguiendo el protocolo diseñado para las células C4HD pero utilizando la línea 4T1. Para ello, se inyectaron ratones hembra BALB/c tres veces en total, a intervalos de 2 semanas, con 1x10⁶ células 4T1 que habían sido transfectadas durante 48 h con el vector STAT3Y705F (4T1-STAT3Y705F) o con el vector vacío (4T1-pcDNA3.1) e inactivadas por irradiación con 100 Gy de una fuente de ⁶⁰Co. Dos semanas después de la última inmunización, los ratones fueron desafiados con 1x10⁴ células 4T1 salvajes. Monitoreamos el crecimiento tumoral a lo largo del experimento y observamos una marcada inhibición del tamaño tumoral en los ratones inmunizados con células 4T1-STAT3Y705F. A los 33 días post-desafío la inhibición del grupo 4T1-STAT3Y705F fue del 81/ con respecto al grupo 4T1-pcDNA3.1 (Figura 24 A, Tabla 4). En concordancia con la disminución del volumen tumoral, los ratones inmunizados con células 4T1-STAT3Y705F presentaron una disminución en el peso de los tumores al finalizar el experimento (Figura 24 B). Interesantemente, sólo el 50/ de los ratones pertenecientes a este grupo desarrollaron tumor, en comparación con el grupo control en donde observamos tumores en el 87,5/ de los animales (Figura 24 C).



Figura 24. La inmunización con células 4T1 transfectadas con STAT3Y705F induce una respuesta inmune antitumoral contra el tumor salvaje. (A) Se inyectaron s.c. ratones BALB/c (n = 8) con 1×10^6 células 4T1 transfectadas con el vector STAT3Y705F o con el vector vacío pcDNA3.1 e irradiadas (100 Gy) 6, 4 y 2 semanas antes del desafío con 1×10^4 células 4T1 salvajes. Se obtuvieron resultados similares en 4 experimentos. Cada punto representa la media del volumen del tumor de los ratones portadores del tumor (7 tumores ± SEM para los ratones inmunizados con células 4T1-pcDNA3.1 en comparación con 4 tumores ± ES de los ratones inmunizados con células 4T1-STAT3Y705F). *, P <0,05; ***, P <0,001. (B) Peso del tumor al finalizar el experimento, *, p<0,05. (C) Número de ratones libre de tumor después del desafío con células 4T1 de ratones inmunizados. (p<0,01). Los datos fueron evaluados utilizando una curva de supervivencia de Kaplan-Meier y la prueba de log rank.

Tratamiento	Media del volumen	Tasa de crecimiento	 / Inhibición del
	tumoral (mm ³) ± ES	± ES (mm ³ /día)	crecimiento
4T1- pcDNA3.1	594,0 ± 259,0 ^a	$12,9 \pm 1,8^{a}$	81,0 ^c
4T1-STAT3Y705F	112,8 ± 79,8 ^b	$1,9 \pm 0,5^{b}$	

Tabla 4. Vacuna celular profiláctica de células 4T1-STAT3Y705F

Los volúmenes tumorales y el porcentaje de inhibición del tumor de animales inmunizados con células 4T1-STAT3Y705F con respecto a los inmunizados con células 4T1-pcDNA3.1 fueron calculados al día 33 post-desafío. Las tasas de crecimiento se calcularon como las pendientes de las curvas de crecimiento.

^avs^b, *p*<0,01.

^c con respecto a células 4T1-pcDNA3.1, para la inhibición del crecimiento, p<0,001.

Por último, contamos el número de nódulos metastásicos en pulmón y observamos que los pulmones de los ratones pertenecientes al grupo STAT3Y705F presentaban una marcada disminución en el número de colonias metastásicas en comparación al grupo control (Figura 25).



Figura 25. Inhibición del desarrollo de metástasis en ratones inmunizados con células 4T1-STAT3Y705F. Se obtuvieron los pulmones de ratones inmunizados con células 4T1-STAT3Y705F o con células 4T1-pcDNA3.1 al día 33 postdesafío y se contaron el número de colonias tumorales o nódulos metastásicos. Los valores representan la media de colonias metastásicas \pm ES (n = 8), *, p<0,05. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

Nuestros hallazgos indican que la inmunización con células tumorales mamarias que tienen inhibida la activación de STAT3 confiere protección contra el tumor primario, disminuyendo la incidencia de tumores, el volumen tumoral y reduciendo la frecuencia de metástasis espontáneas en pulmón.

3. La inmunización con células C4HD transfectadas con STAT3Y705F no involucra inmunidad de tipo humoral

Nuestros resultados sugieren que la inmunización con células tumorales que tienen inhibida la activación de STAT3 provoca una respuesta inmune contra el tumor parental. Para dilucidar el mecanismo involucrado en dicho efecto antitumoral se estudiaron varios parámetros relacionados con el tipo de respuesta inmune desencadenada. En primer lugar, decidimos evaluar la inmunidad humoral contra el tumor C4HD. Para ello, investigamos mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo la presencia de anticuerpos tipo IgG que fueran capaces de reconocer a las células tumorales C4HD, tanto en suero de ratones inmunizados con células transfectadas con STAT3Y705 como en los controles. Los sueros de los ratones que habían sido sometidos al protocolo de inmunización descripto en detalle previamente se obtuvieron a partir de sangre extraída dos semanas después de la última inmunización. No se detectaron diferencias significativas en los títulos de anticuerpos IgG entre los sueros provenientes de ratones que habían sido inmunizados con células transfectadas con STAT3Y705F y los sueros de los controles, como se puede observar en la figura 26. Estos resultados sugieren que la diferencia en el crecimiento tumoral no está mediada por una respuesta inmune de tipo humoral



Figura 26. *Determinación del título de anticuerpos contra el tumor C4HD.* Los ratones se inmunizaron con células C4HD transfectadas como se describió previamente. Dos semana después de la última inmunización se evaluó la presencia de anticuerpos tipo IgG en los sueros de los ratones inmunizados por inmunofluorescencia indirecta, utilizando como fuente antigénica células C4HD que habían sido cultivadas en presencia de 10 nM de MPA. La determinación se realizó incubando a las células C4HD con los sueros de los ratones inmunizados (dilución 1:50) y luego con un segundo anticuerpo anti-IgG murina conjugado con el fluorocromo Alexa 488 (dilución 1:200). La fluorescencia fue evaluada por citometría de flujo y los resultados se expresaron como intensidad de fluorescencia media (IFM) ± ES para 5 ratones por grupo. Este es un experimento representativo de un total de 2. Las diferencias no resultaron significativas.

4. La inmunización con células C4HD-STAT3Y705F induce inmunidad de tipo celular

Teniendo en cuenta que no se encontraron diferencias en los títulos de los anticuerpos en los sueros de los ratones BALB/c inmunizados con STAT3Y705F, nos preguntamos si la inmunización con células tumorales transfectadas con STAT3Y705F podría estar induciendo una respuesta inmune de tipo celular. Para probar esta hipótesis, primero se evaluó la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH), ensayo habitualmente utilizado para determinar in vivo la presencia de inmunidad de tipo celular. Los ratones se sometieron a tres inyecciones seriadas con 2x10⁶ células C4HD transfectadas con el DN de STAT3 o controles e irradiadas, de manera similar al protocolo original de inmunización. Una semana después de la última dosis los ratones se inyectaron con células C4HD irradiadas, administrándolas subcutáneamente en la almohadilla plantar del miembro trasero izquierdo. Como control se inyectó la almohadilla plantar del miembro trasero derecho con PBS estéril. La respuesta DTH frente a las células tumorales se determinó a las 48 h midiendo con un micrómetro la diferencia de inflamación entre ambas almohadillas plantares. Los resultados se expresaron como un índice de inflamación de la almohadilla plantar (IAP) y se ilustran en la figura 27. Se observó una marcada reactividad DTH en ratones que habían sido inmunizados con células transfectadas con el DN de STAT3 en comparación a los grupos control, lo que indica que la inmunización indujo una respuesta inmune de tipo celular.



Figura 27. Respuesta de hipersensibilidad retardada en los ratones inmunizados. Los ratones se inmunizaron con células C4HD tratadas como se describió previamente. Una semana después de la última dosis los ratones se desafiaron con 3x10⁵ células C4HD tratadas por 48 h con MPA 10 nM e irradiadas, inyectándolas subcutáneamente en la almohadilla plantar del miembro trasero izquierdo. La almohadilla plantar del miembro trasero derecho se inyectó con PBS estéril. La respuesta de hipersensibilidad retardada se determinó a las 48 h. Los resultados se expresaron como un índice de inflamación de la almohadilla plantar (IAP) obtenido al restar el grosor de la almohadilla plantar derecha (basal) al grosor de la almohadilla plantar izquierda. Los resultados se expresaron como la media ± ES del IAP de 5 ratones para cada grupo. Este es un experimento representativo de un total de cuatro. ***, p<0,001

5. La inmunización con células C4HD-STAT3Y705F gatilla una respuesta inmune T-dependiente

Debido a que las evidencias experimentales indican que la respuesta inmune involucrada es de tipo celular, se procedió en segundo lugar a evaluar si el efecto anti-tumoral observado es mediado por los linfocitos T en particular. Para ello, se estudió el efecto de la inmunización sobre el crecimiento del tumor C4HD en ratones *nude* (atímicos). A tal fin, los ratones *nude* se sometieron a tres dosis de inmunización con células C4HD transfectadas e irradiadas siguiendo el mismo protocolo aplicado en los ratones de la cepa BALB/c. Como antes, dos semanas después de la última dosis, se desafiaron los ratones con el tumor C4HD y se inyectaron en el flanco opuesto con MPA de depósito. En la figura 28 se ilustra el crecimiento del tumor C4HD en ratones *nude* inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F o en los grupos controles. La inyección de células C4HD transfectadas *in vitro* con el vector DN de STAT3 no provocó diferencias significativas en el volumen tumoral entre los distintos grupos. Por lo tanto, este resultado demuestra terminantemente que los linfocitos T son esenciales para la respuesta antitumoral observada en ratones BALB/c.



Figura 28. *Efecto de la inmunización sobre el crecimiento del tumor C4HD en ratones nude.* Los ratones *nude*, que habían sido inmunizados con las células C4HD transfectadas con el vector STAT3Y705F o controles, se desafiaron con un fragmento de tumor mamario C4HD. Se monitoreó el crecimiento tumoral por 28 días como se explica en "Materiales y Métodos". Cada punto representa el volumen medio tumoral ± ES para 6 tumores independientes en cada grupo. No hay diferencias significativas en los volúmenes tumorales de los distintos grupos.

6. Las células T CD4⁺ y las células NK están involucradas en la respuesta inmune anti-tumoral inducida por la inmunización con células que expresan STAT3Y705F

Hasta aquí sabemos que la respuesta inmune es de tipo celular, y que los linfocitos T están involucrados en la misma. Ahora nos preguntamos qué población específica de linfocitos está involucrada en dicho efecto anti-tumoral. Para responder esta pregunta, inmunizamos animales según el protocolo descripto anteriormente para las células C4HD y, al momento de desafiar los ratones con el tumor C4HD, depletamos de las distintas poblaciones linfocitarias mediante el uso de anticuerpos específicos contra LT CD8⁺, LT CD4⁺ o contra células NK. Observamos que la depleción de LT CD4⁺ y de células NK anuló el efecto anti-tumoral de la inmunización con células C4HD- STAT3Y705F, mientras que la depleción de LT CD8⁺ no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento tumoral. Como control, los animales fueron inyectados con IgG (Figura 29). Esto implica que tanto los LT CD4⁺ como las células NK son necesarios para inducir la respuesta antitumoral observada.



Figura 29. La inhibición del crecimiento tumoral por la inmunoterapia involucra una respuesta del sistema inmune mediada por células NK y LT CD4⁺. Los ratones fueron inmunizados con células C4HD según se describió previamente y se depletaron de células NK o de LT CD4⁺ o LT CD8⁺ antes del desafío con las células C4HD más el MPA de depósito. Se utilizaron anticuerpos monoclonales para depletar las distintas poblaciones celulares, YTS 191.1 para LT CD4⁺ y el YTS 169.4 para los LT CD8⁺. Para la depleción de células CD8⁺ y CD4⁺ se inyectaron 0,5 mg de anticuerpo los días -1, 0, 1, 2, 9, 16 y 23, considerando 0 el día del desafío con el tumor. Para la depleción de células NK se inyectaron 0,25 mg del anticuerpo anti-asialo-GM1 los días -1, 7, 14 y 21. Los ratones inmunizados con células transfectadas con el vector vacío fueron inyectados con IgG de conejo o de rata como control. Cada punto representa la media del volumen de 5 tumores ± SD. *, p<0,05; **, p<0,01, ***, p<0,001 (C4HD-STAT3Y705F vs.C4HD-pcDNA3.1).

Analizamos mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo las poblaciones celulares presentes en sangre periférica con el objeto de corroborar la depleción de células CD3⁺ CD4⁺, CD3⁺ CD8⁺ o de las células NK (CD3⁻DX5⁺) (Figura 30). La inyección de los anticuerpos específicos para eliminar cada tipo celular fue efectiva, observando una reducción de un 93/ en la población de LT CD8⁺, de un 99/ en los LT CD4⁺ y un 75/ de células NK. Curiosamente, se observó un aumento de células NK en circulación en animales inyectados con la IgG control e inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F, una semana después de desafío tumoral.



Figura 30. *Determinación de la efectividad de la depleción de poblaciones de linfocitos de sangre periférica.* Se inmunizaron ratones con células C4HD según se describió previamente y, al momento del desafío con el tumor, los ratones fueron depletados de células CD4⁺, CD8⁺ y células NK mediante la administración de anticuerpos específicos tal como se describe en la figura 29. Una semana después del desafío con el tumor, obtuvimos las células de sangre periférica por punción de la vena facial y las teñimos con anticuerpos conjugados a fluorocromos anti-CD4, CD3, CD8 y DX5. La fluorescencia se analizó por citometría de flujo. Los resultados presentados corresponden a un ejemplo representativo de cada grupo experimental (n=5).

Por otro lado, en otro experimento, también encontramos aumentada la población de células NK dos semanas luego de la última inmunización en los ganglios linfáticos de ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F en comparación a los ganglios de ratones control (Figura 31).



Figura 31. *Evaluación de las células NK presentes en ganglio linfático.* Obtuvimos ganglios linfáticos de ratones inmunizados con células C4HD dos semanas luego de la última inmunización y evaluamos por citometría de flujo la población de células NK (CD3⁻DX5⁺). Se muestra un promedio del porcentaje de células NK en ganglio de cada grupo experimental. **, p<0,01.

Las DCs son células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales que cumplen una función crítica en la inducción y regulación de la respuesta inmune adaptativa ya que son las únicas capaces de estimular linfocitos T vírgenes e iniciar una respuesta inmune primaria (Mellman et al 2001). Las DCs transitan dos estadios los cuales difieren sustancialmente en su fenotipo y funcionalidad: DCs inmaduras y DCs maduras. En ausencia de procesos inflamatorios y de respuesta inmune, las DCs inmaduras se encuentran recorriendo y censando los tejidos periféricos, el sistema circulatorio sanguíneo y linfático y los órganos linfoides secundarios 2002). Las DCs maduras expresan altos niveles de las moléculas co-estimulatorias CD40, CD80 y CD86 como así también del CMH. Existen numerosas evidencias que indican que las células tumorales pueden secretar factores que inhiben la maduración de células dendríticas (Gabrilovich et al., 1996; Sombroek et al., 2002). Por otro lado, las citoquinas pro-inflamatorias inducen un aumento en la capacidad de estas células para presentar antígenos (Mellman et al. 2001). Wang y colaboradores han demostrado que la exposición de células dendríticas a medios condicionados de células de melanoma murino B16 transfectadas con un dominante negativo de STAT3 (STAT3^β) resulta en una mayor expresión de IL-12, CMH de clase II y CD40 (Wang et al. 2004). Teniendo en cuenta esto, nos interesó evaluar si la inmunización con células de cáncer de mama que sobre-expresan STAT3Y705F podía inducir la maduración in vivo de CDs. Para abordar esto analizamos mediante inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo la expresión de marcadores de activación en CDs provenientes de bazos y de ganglios linfáticos de ratones dos semanas después de la última inmunización (ex vivo). Observamos un aumento en la expresión de CD86 y CMH clase II en las CDs de ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F en comparación con el grupo inmunizado con células C4HD-pcDNA3.1 (Figura 32). Por otra parte, también detectamos un aumento en la expresión de CD86 y de CMH de clase II

en CDs de bazo de ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F después de co-cultivar los esplenocitos con células C4HD tratadas con mitomicina C (*in vitro*) (Figura 32). A diferencia de estos marcadores de maduración de CDs, no pudimos observar cambios en los niveles de expresión de CD40 en los ensayos realizados (Figura 32).



Figura 32. Activación de CDs de bazo y de ganglios linfáticos. Se extrajeron los bazos y ganglios drenantes de los ratones dos semanas después de la última inmunización con células C4HD-STAT3Y705F-C4HD o células C4HD-pcDNA3.1. Mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo se analizó la expresión en membrana plasmática de CD40, CD86, CMH y moléculas de clase II en CDs (CD11c⁺) presentes en bazos y ganglios *ex vivo*. También evaluamos estos marcadores en CDs esplénicas de ratones luego del co-cultivo *in vitro* de esplenocitos con células C4HD tratadas con mitomicina C. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

Contando con la evidencia de que los LT CD4⁺ están involucrados en el efecto antitumoral, nos interesó explorar si la inmunización con células tumorales que no pueden activar a STAT3, induce la diferenciación a células T CD4⁺ de memoria. Estas células se caracterizan por persistir a lo largo de prolongados períodos de tiempo, permitiendo responder rápidamente a una futura exposición al antígeno. Tras el análisis por citometría de flujo se observó que la población T CD4⁺CD44⁺ de memoria se encontraba aumentada significativamente en ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F con respecto a los ratones inmunizados con células C4HD-pcDNA3.1 (Figura 33).



Figura 33. *Análisis de células CD4⁺ de memoria.* Se aislaron esplenocitos dos semanas después de la última inmunización con células C4HD-STAT3Y705F-C4HD o células C4HD-pcDNA3.1 Mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo se determinó la frecuencia de la población de células TCD4⁺ de memoria (CD3⁺CD4⁺CD44⁺), cuyo porcentaje se muestra en el cuadrante superior derecho.

Para poder eliminar a las células tumorales, las células NK deben infiltrar el tejido tumoral para entrar en contacto directo con sus células blanco. Siguiendo esta lógica nos preguntamos si la inmunización con células 4T1-STAT3Y705F modula la composición del microambiente tumoral. Extirpamos los tumores y analizamos mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo cómo están conformadas las poblaciones de células infiltrantes. Observamos que los ratones inmunizados con células 4T1-STAT3Y705F presentaban un mayor porcentaje de células NK y una disminución del porcentaje de linfocitos T regulatorios (Tregs) (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) infiltrantes en comparación con ratones inmunizados con células 4T1-pcDNA3.1 (Figura 34). Esta disminución de linfocitos Tregs favorece la actividad anti-tumoral, ya que estas células intervienen en la modulación negativa de la respuesta inmune, promoviendo la tolerancia inmunológica.



Figura 34. *Infiltración linfocitaria en tumores 4T1 de animales inmunizados.* Se analizó por inmunofluorescencia y citometría de flujo la presencia de distintas poblaciones de linfocitos en tumores 4T1 extirpados de ratones inmunizados con células 4T1 transfectadas como se describió previamente (Figura 24). Se muestra el porcentaje de células NK (CD3⁻DX5⁺) entre los linfocitos totales y la frecuencia de células T regulatorias (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) entre los LT CD4⁺ (números en los cuadrantes superiores izquierdos y derechos respectivamente). *, p<0,05 (n = 5).

En conjunto, estos resultados indican que la inmunización con células que tienen inhibida la activación de STAT3 induce una respuesta anti-tumoral dependiente de linfocitos T CD4⁺ y de células NK, caracterizada por un aumento de células NK en circulación, en ganglios linfáticos e infiltrantes del tumor. Además, sugieren que esta inmunización promueve la maduración de CDs e induce la diferenciación de células T CD4⁺ de memoria, lo que podría mantener dicho efecto antitumoral en el tiempo.

7. La inmunización con células tumorales que expresan una variante dominante negativa de STAT3 es inespecífica

Para determinar la especificidad de la protección impartida por la inyección de células C4HD transfectadas con el vector STAT3Y705F se repitió el protocolo de inmunización utilizado para las células 4T1 pero en lugar de desafiar únicamente a los ratones con el tumor parental (células 4T1), también se los desafió con un fragmento del tumor mamario murino C4HD o con $4x10^5$ células de la línea celular de carcinoma de colon murino CT26. Curiosamente, se observó que la inmunización de ratones con células 4T1-STAT3Y705F protegió tanto contra el desarrollo de los tumores C4HD como CT26. Esto se reflejó por la notable inhibición en el crecimiento de estos tumores en comparación con los ratones que habían sido inmunizados con células 4T1-pcDNA3.1 (Figura 35). Estos resultados sugieren que la memoria inmunológica desarrollada en los ratones inmunizados con células 4T1-STAT3Y705F induce protección cruzada contra otras células singeneicas de tumores de mama, inclusive contra células tumorales de órganos no relacionados (colon).



Figura 35. Crecimiento in vivo del tumor C4HD y de la línea de carcinoma de colon CT26 en ratones BALB/c inmunizados con células 4T1. Los ratones inmunizados con células 4T1 transfectadas con STAT3Y705 o controles fueron desafiados con un fragmento de tumor mamario murino C4HD junto con MPA de depósito (A) o con $4x10^5$ células de cáncer de colon CT26 (B). Cada punto representa la media ± ES del volumen de cinco tumores independientes. Se obtuvieron resultados similares en 2 experimentos. *, p<0,05.

8. Los esplenocitos de ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F proliferan y producen citoquinas en respuesta al antígeno

Para profundizar en los mecanismos inmunológicos observados en los experimentos *in vivo*, decidimos realizar una serie de ensayos *in vitro*. Nuestro objetivo fue evaluar la respuesta de los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados frente al encuentro con las células C4HD. Los ratones fueron sometidos al protocolo original de inmunización y dos semanas

después de la última dosis se sacrificaron, se extrajeron los bazos y se aislaron sus esplenocitos. En primer lugar, quisimos ver la capacidad de estos esplenocitos de proliferar en presencia del antígeno, es decir, de células C4HD. Para ello, realizamos co-cultivos de esplenocitos con o sin células C4HD inactivadas con mitomicina C. Luego de 4 días de cultivo evaluamos la proliferación por incorporación de timidina ³[H] durante 18h. Sólo los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F fueron capaces de proliferar en presencia de C4HD salvajes, en comparación con esplenocitos de los otros grupos (Figura 36). Estos resultados aportaron más evidencias de la existencia de una respuesta de tipo celular.



Figura 36. Proliferación in vitro de esplenocitos de ratones inmunizados, co-cultivados con células C4HD. Los ratones se inmunizaron con células C4HD como se describió previamente. Dos semana después de la última dosis, se aislaron los esplenocitos y se cultivaron durante 5 días en presencia (+) o ausencia (-) de células C4HD tratadas con mitomicina C (50 µg/ml). Los cultivos se incubaron las últimas 16 h con 0,5 µCi timidina ³[H]. Las células se cosecharon y se determinó la cantidad de timidina ³[H] incorporada al ADN como medida de proliferación. Los datos se expresaron como la media de cpm ± ES de 6 ratones independientes. ***, p<0,001.

En segundo lugar, nos propusimos identificar fenotípicamente el tipo de respuesta inducida por la inmunización. Para ello, se evaluó la capacidad de los esplenocitos de liberar citoquinas luego de ser enfrentados a las células tumorales. La liberación de IFN-γ y de IL-2 está asociada a una respuesta tipo 1, mientras que la liberación de IL-10, IL-5 e IL-4 a una respuesta de tipo 2 (Carter & Dutton 1996). Los esplenocitos aislados a partir ratones inmunizados con

células C4HD-STAT3Y705F y con células controles se cultivaron en presencia de células C4HD tratadas con MPA e inactivadas con mitomicina C. Luego del co-cultivo se colectó el sobrenadante y se determinó la cantidad de IFN-y, IL-2, IL-10 e IL-4 liberada al medio por los esplenocitos mediante un ensayo de ELISA. Como se observa en la figura 37, los esplenocitos provenientes de ratones que habían sido inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F liberaron altos niveles de IFN-y al ser enfrentados a células C4HD, lo cual representó un aumento de aproximadamente 3 veces en comparación a los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con células C4HD-pcDNA3.1. Del mismo modo se determinó la liberación del IL-2 e IL-4 al medio y observamos un aumento significativo en su producción por parte de esplenocitos de ratones C4HD-STAT3Y705F en comparación con el control. Para el caso de la IL-4, su nivel fue considerablemente menor al observado para las otras citoquinas (de 3 órdenes de magnitud menor). También evaluamos la producción de IL-10 aunque no se observaron diferencias significativas en su liberación entre los distintos tratamientos (Figura 37). Esto indica que la inmunización con células C4HD transfectadas con un DN de STAT3 induce a los esplenocitos a liberar IFN-y, IL-2 y en menor medida IL-4, lo que podría indicar un perfil de liberación de citoquinas similar al característico de respuestas de tipo 1.



Figura 37. Secreción de citoquinas por los esplenocitos de los ratones inmunizados. Los esplenocitos aislados a partir de los ratones inmunizados con células C4HD se co-cultivaron a una concentración de 4×10^6 células/ml en presencia de 8×10^4 células C4HD tratadas previamente con MPA e inactivadas con mitomicina-C. Después de 48 h se colectó el sobrenadante y se determinó por un ELISA la cantidad de IFN- γ , IL-2, IL-10 e IL-4 secretadas al medio. Cada valor representa la media ± ES de 6 ratones. ***, p<0.001. Este experimento se repitió tres veces.

A continuación nos propusimos determinar cuál era la población de linfocitos provenientes de ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705 responsables de la producción de IFN-γ. Para tal fin realizamos cultivos de esplenocitos en presencia o ausencia de células C4HD y analizamos, mediante citometría de flujo, la producción de IFN-γ intracelular en

LT CD4⁺ y LT CD8⁺ y en células NK en estas condiciones o con el agregado de IL-12. En la figura 38 se observa que los ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F presentan un mayor porcentaje de LT CD4⁺ (Figura 38 A) y de células NK (Figura 38 B) productoras de IFN-γ luego de la activación de los esplenocitos por células C4HD. Por otro lado, no observamos ningún cambio en el porcentaje de LT CD8⁺ IFN-γ⁺ en presencia de células C4HD (dato no mostrado). La estimulación con IL-12 de los esplenocitos procedentes de animales inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F dio como resultado un mayor porcentaje de células NK secretoras de IFN-γ que la observada tras la estimulación de las células provenientes de ratones C4HD-pcDNA3.1 con IL-12 (Figura 38 B). Esto sugiere una posible actividad citotóxica que involucre células NK efectoras y LT CD4⁺.

Α





Figura 38. *Análisis de la producción intracelular de IFN-y por células T CD4⁺ y células NK.* Los esplenocitos de los ratones inmunizados se incubaron durante 18 h en presencia o ausencia de células C4HD. El gráfico de barras que muestra el porcentaje promedio de células productoras de IFN-y de 5 ratones. (A-B) Las células se tiñeron con anticuerpos específicos conjugados con distintos fluorocromos para CD4, CD3, DX5 e IFN-y y se analizaron por citometría de flujo. Los números en los cuadrantes superiores derechos representan el porcentaje de células CD3⁺CD4⁺ positivas para IFN-y (A) o células CD3⁻DX5⁺ positivas para IFN-y (B). También se evaluó el porcentaje de células NK positivo para IFN-y de células tratadas con IL-12 (B). *, p <0,05, **, p < 0,01, ***, p < 0,001,

También quisimos determinar la capacidad que tienen las células que infiltran el tumor de activarse y de producir IFN-γ. Para evaluar la activación, analizamos la expresión de CD69 que es un antígeno de diferenciación expresado poco después de la activación de los linfocitos T y de otras células de origen hematopoyético, incluyendo células NK. El CD69 en los linfocitos T actúa como una molécula co-estimuladora de la proliferación y de la secreción de citoquinas. Mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo analizamos la expresión de este marcador y la producción de IFN-γ intracitoplasmática en LT CD4⁺ y células NK que infiltran el tumor 4T1. Observamos un aumento del número de células NK y de LT CD4⁺ productoras de IFN-γ después de la activación *in vitro* con PMA e ionomicina (Figura 39) de linfocitos presentes en el microambiente tumoral de ratones inmunizados con células 4T1-STAT3Y705F. También observamos mayor expresión de CD69 en estas células (Figura 39). Estos resultados revelan que LT CD4⁺ y células NK que residen en el bazo y en el tumor de animales inmunizados con células de cáncer de mama que expresan STAT3Y705F secretan IFN-γ.



Figura 39. *Expresión de CD69 y producción de IFN-γ en linfocitos infiltrantes del tumor de 4T1.* Se obtuvo una suspensión celular a partir de los tumores provenientes de ratones inmunizados (Figura 24) como se describió en "Materiales y Métodos". La suspensión celular fue cultivada durante 5 h en presencia de PMA 10 ng/ml y de monensina. Analizamos el IFN-γ intracitoplasmático y la expresión de CD69 en células CD3⁺CD4⁺ y CD3⁻DX5⁺ por citometría de flujo. Los datos mostrados se obtuvieron de un *pool* de 5 ratones.

9. Rol de las células NK como efectoras de la citotoxicidad anti-tumoral

Hasta el momento contamos con evidencia *in vivo* de que tanto las células NK como los LT CD4⁺ son partícipes del efecto anti-tumoral inducido por la inmunización con células que tienen inhibida la activación de STAT3. Por otro lado, sabemos que ambos tipos celulares son responsables de la producción de IFN-γ. Ahora nos propusimos dilucidar cuál población celular está mediando la citotoxicidad contra el tumor. En primer lugar decidimos evaluar el potencial citotóxico de los esplenocitos de ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F. Con este fin, co-cultivamos esplenocitos de los distintos grupos experimentales durante 5 días con células C4HD tratadas con mitomicina C y utilizamos estos esplenocitos como células efectoras en un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr. Los esplenocitos provenientes de ratones que habían sido inyectados con células transfectadas con el DN de STAT3 mostraron una fuerte actividad citotóxica (37,9/ de lisis específica) frente a las células C4HD marcadas con ⁵¹Cr (relación 100:1 efector: blanco). Los esplenocitos aislados de los ratones de los grupos controles mostraron una baja citotoxicidad basal (<5/) (Figura 40) al ser enfrentados a células C4HD marcadas con ⁵¹Cr.



Figura 40. Actividad citotóxica in vitro de esplenocitos de ratones inmunizados sobre células C4HD. Los ratones se inmunizaron con células C4HD tratadas como se describe en "Materiales y Métodos". Dos semanas después se aislaron los esplenocitos y se co-cultivaron durante 5 días con células C4HD inactivadas con mitomicina C. Se realizó un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr utilizando como blanco 1x10⁴ células C4HD. Se estudiaron diferentes relaciones efector (esplenocitos): blanco (C4HD). Se muestra el porcentaje de lisis específica media ± ES para 6 ratones independientes. ***p<0,001.

Para identificar dentro de los esplenocitos a la población celular efectora, se realizó un ensayo estándar de liberación de ⁵¹Cr similar al descripto anteriormente, previa depleción selectiva de las poblaciones de LT CD4⁺ o de LT CD8⁺ o de células NK utilizando anticuerpos acoplados a perlas magnéticas. Los esplenocitos depletados de la población de LT CD4⁺ y de LT CD8⁺ (Figura 41 A, barras amarillas y celestes, respectivamente) provenientes de ratones que habían sido inmunizados con células transfectadas con STAT3Y705F retuvieron la capacidad de lisar a las células C4HD, ejerciendo una citotoxicidad de igual magnitud que la determinada con la población de células NK (Figura 41 A, barras violetas), la actividad citotóxica de los esplenocitos cayó a los niveles basales, demostrando que eran las células NK la población con actividad citotóxica sobre las células C4HD. La depleción de la población de LT CD4⁺ o de LT CD8⁺ de los

esplenocitos provenientes de ratones controles, C4HD-pcDNA3.1, no afectó la citotoxicidad basal, siendo esta similar a la obtenida con ambas poblaciones presentes. Finalmente, nos propusimos validar estos resultados mediante una estrategia complementaria, para lo cual purificamos células NK mediante una selección negativa luego de 5 días de co-cultivo de esplenocitos con células C4HD. Utilizamos a la población enriquecida en células NK cómo las células efectoras en un ensayo de citotoxicidad por liberación de ⁵¹Cr y a células YAC-1 o células C4HD como células blanco. Observamos que las células NK enriquecidas a partir de esplenocitos de ratones inmunizados con C4HD-STAT3Y705F fueron eficaces para lisar no sólo a las células YAC-1 (Figura 41 B), sino también a las células C4HD (Figura 41 C). A pesar de estos resultados, no pudimos detectar citotoxicidad contra las células C4HD por parte de células NK purificadas a partir de esplenocitos frescos, es decir, aquellos que no fueron co-cultivados durante 5 días con células C4HD y con el resto de los tipos celulares presentes en el bazo (datos no mostrados). Estos datos sugieren que las células NK adquieren actividad citotóxica después de estar en contacto con los LT CD4⁺ y en presencia de células tumorales.





mitomicina C. Realizamos un ensayo de citotoxicidad utilizando como células efectoras a las NK purificadas y como blanco a las células sensibles a las NK, YAC-1 (B) o a las C4HD (C) marcadas con 51 CrO₄ ${}^{2-}$. **, p<0,01, ***, p<0,001

Teniendo en cuenta que la actividad citotóxica y la capacidad de degranulación de las células NK es clave para la eliminación de células tumorales, decidimos estudiar de manera complementaria al estudio de citotoxicidad, su capacidad de degranulación. Esto puede ser evaluado analizando la expresión del marcador CD107a, que es una molécula asociada a gránulos de granzimas y perforinas que queda expuesta en la superficie cuando estas son liberados (Anfossi 2006). Para ello, realizamos co-cultivos de 18 h de esplenocitos con o sin células C4HD. Posteriormente cosechamos las células y realizamos una marcación con anticuerpos específicos acoplados a distintos fluorocromos con el objeto de determinar el porcentaje de células CD3⁻DX5⁺CD107a⁺. Como se muestra en la figura 42, las células NK de ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F cultivados en presencia de células C4HD muestran mayor expresión en superficie del marcador CD107a que las células NK de ratones inmunizados con células C4HD-pcDNA3.1.



Figura 42. *Degranulación de células NK gatillada por células C4HD.* Los esplenocitos de ratones inmunizados fueron cultivados solos o en presencia de células C4HD tratadas con mitomicina C. Evaluamos la expresión de CD107a en membrana en la población de células NK (CD3⁻DX5⁺). Se muestra el porcentaje de células NK positivas para CD107a de cada grupo experimental (n=5 ratones). Los resultados corresponden a un experimento de un total de tres experimentos independientes (media ± SE). *, p<0,05.

La actividad citotóxica de las células NK esta finamente regulada por la integración de la señalización de receptores activadores e inhibidores de la citotoxicidad (Pegram et al. 2011). Por lo tanto, nos preguntamos sí las células C4HD expresan ligandos, como el RAE-1 y H-60, para el receptor activador NKG2D. Mediante inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo comprobamos la expresión de H-60 y en menor medida de RAE-1 en células C4HD (Figura 43). Asimismo un trabajo previo demuestra que las células 4T1 también expresan estos ligandos de NKG2D (Takaki et al. 2005). Para evaluar si la expresión de H-60 y RAE-1 cambia por el bloqueo de STAT3, transfectamos las células C4HD y las 4T1 con el vector DN de STAT3. No se observó ninguna modulación en la expresión de H-60 o RAE-1 en las células que expresan el DN de STAT3 en comparación con las expresan el vector vacío (datos no mostrados).



Figura 43. *Expresión de H-60 y RAE-1 en células C4HD.* Evaluamos la expresión de H-60 y de RAE-1 en células C4HD mediante citometría de flujo. Los niveles de expresión fueron determinados comparando el nivel de intensidad de fluorescencia (eje-x) de H-60 y de RAE-1 los marcadores (línea sólida) con el control de isotipo (área gris). Los resultados se expresan como la media de la intensidad de fluorescencia (MIF), calculada restando la media de fluorescencia de las células control de isotipo de la fluorescencia media de cada anticuerpo específico.

10. Efecto terapéutico de la inmunización con células tumorales que expresan STAT3Y705F

En células C4HD

Teniendo en cuenta que el protocolo de inmunización profiláctica demostró una gran efectividad en la inhibición del crecimiento tumoral, decidimos desarrollar un protocolo de vacunación terapéutico. Para ello, se desafiaron ratones BALB/c con el tumor C4HD y al día 5 cuando el tumor fue palpable, (tumor de 10 mm³), se los inyectó con 2x10⁶ células C4HD

transfectadas *in vitro* con el vector de expresión de la proteína DN de STAT3 o con el vector vacío e inactivadas por irradiación. La inmunización se repitió en el día 19. Se monitoreó el crecimiento tumoral y se observó a los 38 días post desafío una inhibición del 46,6±9/ en los ratones inmunizados con las células C4HD-DNSTAT3 con respecto al grupo vector vacío (Figura 44 A, tabla 5). La reducción en el volumen tumoral fue acompañado por una disminución en el peso del tumor (Figura 44 B). Mediante un análisis histopatológico de los tumores observamos una disminución del grado histológico (grado II) en los tumores de ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F. Estos tumores presentaron extensas áreas de necrosis y fibrosis con una disminución en el número de mitosis por campo en comparación con los tumores provenientes de ratones inmunizados con células C4HD-pcDNA3.1 (Figura 44 C), los cuales presentaron un grado histológico III con elevado número de figuras mitóticas (Figura 44 C).



Figura 44. *La administración terapéutica de células C4HD-STAT3Y705F induce una respuesta anti-tumoral* (A) Los ratones hembra de la cepa BALB/c fueron desafiados con el tumor C4HD e implantados con MPA de depósito. Cuando el tumor fue palpable, se separaron los ratones en dos grupos (5 ratones por grupo) con igual tamaño

tumoral. Se inmunizaron los ratones con $2x10^6$ células C4HD-STAT3Y705F o pcDNA3.1-C4HD e inactivadas por irradiación (50 Gy). Los ratones fueron inmunizados el día 5 y el día 19 (indicados con flechas). Se monitoreó el crecimiento tumoral a partir de la semana de desafiados los ratones (día 1 de la curva). Este es un experimento representativo de 3 realizados. *, p<0,05 (C4HD-STAT3Y705F vs. C4HD-pcDNA3.1). (B) y (C) En el día 38 se sacrificaron los animales y el tumor fue pesado (B) y luego fijado en formol 10/ e incluido en parafina. Se realizaron cortes histológicos y se tiñeron con H&E (100X) (C). Se observan las figuras mitóticas indicadas con flechas a mayor aumento en los recuadros (400X).

Tabla 5. Vacuna	celular tera	péutica de	células	C4HD-STAT	3Y705F
-----------------	--------------	------------	---------	-----------	--------

Tratamiento	Media del volumen tumoral (mm ³) ± ES	Tasa de crecimiento ± ES (mm ³ /día)	 / Inhibición del crecimiento
C4HD-pcDNA3.1	1025,0 ± 333,4 ^ª	32,4 ± 2,2 ^a	
C4HD-Stat3Y705F	762,3 ± 140,1 ^b	$19,2 \pm 1,2^{b}$	46,6 ^c

Los volúmenes tumorales y el porcentaje de inhibición del tumor de animales inmunizados con C4HD-STAT3Y705F con respecto a animales inmunizados C4HD-pcDNA3.1 fueron calculados al día 38 post-desafío. Las tasas de crecimiento se calcularon como las pendientes de las curvas de crecimiento.

^a vs^b, *p*<0.01.

^c con respecto a células C4HD-pcDNA3.1, para la inhibición del crecimiento, p<0,001,

También examinamos si la inmunización con células C4HD-STAT3Y705F recluta linfocitos en el microambiente tumoral. Mediante un análisis por inmunofluorescencia y citometría de flujo, los linfocitos infiltrantes de tumores inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F presentaban un aumento en el número de células NK en comparación con los ratones del grupo control. También pudimos observar un leve aumento, aunque no significativo, en la infiltración de LT CD4⁺ en el grupo C4HD-STAT3Y705F, mientras que los porcentajes de LT CD8⁺ infiltrantes se mantuvieron similares para ambos grupos (Figura 45).



Figura 45. *Caracterización de las poblaciones linfocitarias infiltrantes del tumor C4HD luego de la inmunización terapéutica.* Analizamos por inmunofluorescencia y citometría de flujo la presencia de distintas poblaciones de linfocitos en tumores C4HD extirpados de ratones inmunizados en forma terapéutica con células C4HD transfectadas como se describió previamente (Figura 43). Se muestra el porcentaje de células NK (CD3⁻DX5⁺), de LT CD4⁺ y de LT CD8⁺ entre los linfocitos totales (números en los cuadrantes superiores izquierdos y derechos respectivamente). **, p<0,01 (n = 5).

En células 4T1

Para el caso de las células 4T1, se inyectaron s.c. ratones BALB/c con 1x10⁶ células 4T1 transfectadas *in vitro* con el vector STAT3Y705F o con el vector pcDNA 3.1 e inactivadas por irradiación (100Gy) a los días 4, 11 y 18 post desafío con el tumor 4T1 salvaje Se monitoreó el crecimiento tumoral a lo largo del experimento y observamos una inhibición del 37,5/ en los ratones inmunizados con las células 4T1-STAT3Y705F con respecto al grupo vector vacío a los

34 días post desafío (Figura 46 A, tabla 6). También observamos una disminución en el peso tumoral (Figura 46 B) y en el número de metástasis en pulmón (Figura 46 C). Los estudios histopatológicos de los tumores de los ratones inmunizados con células 4T1-STAT3Y705F mostraron una disminución del grado histológico, con una disminución de la anisocariosis y del número de mitosis por campo en comparación a lo observado en tumores de ratones inyectados con células 4T1-pcDNA3.1 (datos no mostrados).



Figura 46. La administración terapéutica de células 4T1-STAT3Y705F induce una respuesta anti-tumoral. (A) El día 0, los ratones BALB/c (n=8) fueron inoculados con 1×10^4 células 4T1. Los ratones se trataron con 1×10^6 células 4T1-STAT3Y705F irradiadas o células control los días 4, 11 y 18. Se midió el volumen tumoral tres veces por semana. (B) Se pesaron los tumores provenientes de ratones inmunizados con células 4T1-STAT3Y705F o 4T1-pcDNA3.1 al finalizar el experimento, *, p<0,05. (C) Se contaron el número de colonias metastásicas en los pulmones de los ratones desafiados con el tumor 4T1 y posteriormente inmunizados. Los valores representan la media ± ES (n = 8), *, p<0,05. Se obtuvieron resultados similares en 3 experimentos independientes.

Tabla 6. Vacuna celular terapéutica de células 4T1-STAT3Y705F

Tratamiento	Media del volumen tumoral (mm ³) ± ES	Tasa de crecimiento ± ES (mm ³ /día)	 / Inhibición del crecimiento
4T1- pcDNA3.1	522,5 ± 44,1ª	27,3 ± 2,9ª	
4T1-STAT3Y705F	326,6 ± 56,33 ^b	$18,4 \pm 1,4^{b}$	37,5 [°]

Los volúmenes tumorales y el porcentaje de inhibición del tumor de animales inmunizados con células 4T1-STAT3Y705F con respecto a los inmunizados con células 4T1-pcDNA3.1 fueron calculados al día 34 post-desafío. Las tasas de crecimiento se calcularon como las pendientes de las curvas de crecimiento. ^a vs^b, p<0,01.

^c con respecto a células pcDNA3.1-4T1, para la inhibición del crecimiento, p<0,001.</sup>

Estos hallazgos demuestran por primera vez que la inmunización con células que tienen inhibida la activación de STAT3 es capaz de inhibir el crecimiento de tumores primarios ya establecidos, lo que sugiere una potencial aplicación terapéutica de este protocolo de inmunización con células tumorales.

CAPÍTULO III

20

RALES

Inducción de senescencia por inhibición de

STAT3 en células de cáncer de mama

INTRODUCCIÓN (CAPITULO III)

1. SENESCENCIA CELULAR

En los últimos años, los avances realizados en la comprensión de la patología del cáncer han puesto en evidencia el rol de la senescencia como una barrera a la iniciación y progresión tumoral. En 1965, Leonard Hayflick describió por primera vez a la senescencia celular como el proceso en el cuál las células en cultivo dejan de replicarse (Hayflick 1965). Hoy en día se sabe que la senescencia también puede ser inducida en células "jóvenes" por la activación aberrante de un oncogén (senescencia inducida por oncogenes u OIS, del inglés, *oncogene induced senescence*), exposición a fármacos quimioterapéuticos, estrés oxidativo, por pérdida de genes supresores de tumores, como PTEN, RB1, NF1 e INPP4B o bien recientemente se ha descripto que también puede gatillarse por la inactivación de un oncogén necesario para la supervivencia de la célula.

Las células senescentes muestran cambios en la morfología celular, el metabolismo, la estructura de la cromatina y tienen un determinado patrón de expresión génico (Kuilman, et al. 2010). Una característica distintiva de las células senescentes es el aumento en la actividad de la ß-galactosidasa asociada a senescencia (Dimri et al. 1995), un marcador, que en combinación con otros marcadores moleculares permite identificar las células senescentes *in vitro* o *in vivo* (Collado et al. 2005).

1.1. Senescencia replicativa

Ocurre durante la propagación de células humanas en cultivo como consecuencia del acortamiento progresivo de los telómeros, lo que conduce, luego de sucesivas divisiones celulares, a un freno en la replicación (Harley, et al 1990). Cuando los telómeros alcanzan una longitud mínima crítica, la célula censa este acortamiento como una ruptura en la doble hélice en el ADN. Esta ruptura de la doble hélice desencadena una respuesta de daño al ADN (DDR, del

inglés *DNA damage response*) que resulta en la formación de focos de fosforilación de la histona H2AX (γ-H2AX) asociados a senescencia y en la activación de las quinasas ATM y ATR (d'Adda di Fagagna et al. 2003). Estas quinasas, a través de una cascada de señalización molecular, conducen a la activación de varias proteínas involucradas en el ciclo celular, incluyendo a CDC25 (una familia de fosfatasas) y al supresor tumoral p53. En conjunto, estos cambios pueden provocar un paro transitorio en la proliferación, dando lugar a que las células puedan reparar el ADN dañado. Sin embargo, si el daño en el ADN es lo suficientemente extenso o si excede un cierto umbral, las células están destinadas a sufrir apoptosis o senescencia. Al día de hoy no se conocen con exactitud los mecanismos que favorecen la activación de uno u otro programa, pero se sabe que dependen del tipo celular, de la intensidad y de la duración de la señal, así como también de la naturaleza de los daños (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Además de p53, la senescencia replicativa está relacionada con otro supresor tumoral, la proteína Rb y con una proteína inhibidora de quinasas dependientes de ciclinas (CDKI, del inglés, *Cyclin dependent kinase inhibitor*) y de p16INK4a (Kuilman et al. 2010).

1.2. Senescencia celular prematura

Como mencionamos anteriormente, la senescencia puede también ser inducida independientemente del acortamiento de los telómeros por una gran variedad de condiciones. Este tipo de senescencia se ha denominado prematuro, ya que surge antes de la etapa en la que es inducida por la reducción de los telómeros. En los últimos años, se han acumulado evidencias respecto a este tipo de senescencia y su rol en la supresión de tumores. A continuación mencionaremos algunos ejemplos.

1.2.1. Senescencia inducida por oncogenes (OIS)

Se define como el arresto irreversible del ciclo celular en células normales como consecuencia de la sobre-expresión de un oncogén como Ras y Raf (Serrano et al 1997; Zhu et al., 1998). Se cree que la OIS actúa como una barrera a la tumorigénesis, tanto en modelos de
carcinogénesis humanos como murinos (Collado et al., 2005; Serrano et al 1997). En particular, la proliferación exacerbada durante la transformación oncogénica de fibroblastos por activación de una proteína mutante de HRAS, HRAS^{G12V}, gatilla la inducción de un programa de senescencia. Esta replicación excesiva del ADN conduce a la activación de un mecanismo de respuesta al daño al ADN, distinto al inducido por la senescencia replicativa, que resulta en la formación de focos asociados a senescencia en el ADN. Como consecuencia de esto, se activa p53, que tiene un rol muy importante como efector de la OIS, induciendo la transcripción de genes asociados a la senescencia como CDKN1A (que codifica para la proteína CDKI, p21). La OIS no sólo promueve la expresión de p53, sino también la de otros efectores de senescencia como p16INK4A. Es decir, p53 y p16INK4a tienen un rol crítico durante la senescencia replicativa y la OIS. En células de ratón, la inactivación de p53 es suficiente para eludir la senescencia inducida por la activación constitutiva de Ras (Collado et al., 2007; Kamijo et al. 1997; Serrano et al. 1997). En las células humanas, p16INK4a parece jugar un papel más importante que p53, ya que algunas células dependen únicamente de p16INK4a para que se induzca senescencia por activación de un oncogén (Ben-porath & Weinberg 2005). En efecto, los mecanismos de OIS no parecen ser universales para todos los tipos celulares.

1.2.2. Senescencia inducida por inactivación de genes supresores de tumores.

Al igual que lo descripto para la sobreexpresión o mutación de un oncogén, la pérdida de un gen supresor de tumores también puede desencadenar un programa de senescencia en células humanas y de ratón. En particular, la pérdida de genes supresores de tumores, como PTEN, RB1, NF1 e INPP4B (Collado et al. 2005; Shamma et al. 2009) puede inducir rápidamente la activación de un programa de senescencia. La senescencia inducida por la pérdida de PTEN es promovida por mecanismos distintos a los descriptos para OIS ya que se caracteriza por la ausencia de una replicación exacerbada y por la falta de activación de mecanismos de reparación en respuesta al daño al ADN (Alimonti et al. 2010). Al igual que durante la OIS, p53 tiene un rol importante en la senescencia inducida por la inactivación de un gen supresor de tumores. La pérdida de PTEN conduce a una hiperactivación de mTOR, lo que promueve el aumento de la expresión de p53 y el consecuente arresto del ciclo celular.

1.3. Senescencia inducida por inactivación de oncogenes

Las consecuencias de la inactivación de un oncogén en un tumor son muy variadas y dependen del contexto celular. Recientemente se han realizado experimentos utilizando modelos de ratones transgénicos condicionales para explorar las consecuencias de la supresión de los oncogenes MYC, Ras, Braf y BCR-ABL en tumores (Felsher et al. 1999; Hoeflich et al., 2006; Huettner et al. 2000; Jain et al., 2013; Shachaf et al. 2004). La inhibición de estos oncogenes puede conducir a la detención de la proliferación, la apoptosis (Felsher et al. 1999), la diferenciación (Shachaf et al. 2004), la inhibición de la angiogénesis (Giuriato, et al. 2006) y hasta incluso la inducción de senescencia (Wu et al. 2007). En particular, el grupo del Dr. Felsher ha demostrado la importancia de la inducción de senescencia por inactivación de MYC en la eliminación de tumores por inhibición de oncogenes (Wu et al. 2007). Esto fue válido para diversos modelos tumorales, incluyendo linfoma, osteosarcoma y carcinoma hepatocelular, que contaban con la particularidad de haber sido inducidos precisamente por el oncogén MYC. La tumorigénesis mediada por MYC promueve un fenómeno que se conoce como adicción a un oncogén (oncogene addiction) (Felsher 2008), caracterizado por la dependencia de las células tumorales a los oncogenes que ayudaron en el desarrollo del tumor. En este trabajo, Wu y colaboradores demostraron que la inactivación de los mediadores cruciales de la senescencia, como p16INK4a, RB y p53, inhibió la senescencia y la regresión tumoral observada por inactivación de MYC en ratones inmunocompetentes. De esto se concluye que las células deben mantener intactos estas moleculas clave para que los tumores sean sensibles a la senescencia. Probablemente, las células que no puedan expresar éstas proteínas o que presenten mutaciones en las mismas no van a ser capaces de activar un programa de senescencia luego de la inactivación de un oncogén.

Por otro lado, la inactivación de oncogenes también puede inducir senescencia celular en casos en donde el oncogén blanco no es el responsable de la carcinogénesis. Un ejemplo de esto es el carcinoma de pulmón iniciado por KRAS^{G12D}, en donde la inactivación de los tres parálogos de MYC, MYC, MYCL1 y MYCN da como resultado la regresión del tumor por inducción de apoptosis y de senescencia (Soucek et al. 2008). En su conjunto, estos resultados muestran que la inhibición de un oncogén puede gatillar senescencia en tumores ya establecidos, lo que sugiere que esta senescencia por inactivación de un oncogén puede ser un mecanismo general de regresión tumoral luego de la inactivación de oncogenes (Figura 47). Sobre estas evidencias es razonable esperar que las terapias dirigidas contra moléculas necesarias para el crecimiento tumoral den lugar a la inducción de senescencia celular (Collado & Serrano 2010).



Figura 47. *Modelo de inducción de senescencia por inactivación de oncogenes.* La activación de un oncogén en células normales puede activar la respuesta de daño al ADN e inducir senescencia, mediada por el aumento de la expresión de los genes supresores de tumores p53 y RB, de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, p15INK4b, p16INK4a y p21^{CIP}, y una formación de heterocromatina. En células en donde algunos de los mecanismos moleculares que promueven la senescencia se encuentran mutados o ausentes, la activación de un oncogén puede conducir al desarrollo tumoral. Por otro lado, la inactivación de un oncogén en estas células tumorales también puede conducir a la senescencia mediada por los efectores moleculares previamente descriptos para la senescencia por activación de un oncogén. Adaptado de Wu et al., 2007.

2. INMUNOVIGILANCIA DE CÉLULAS SENESCENTES

Como mencionamos anteriormente, la senescencia celular actúa como una potente barrera frente a la tumorigénesis. Las células senescentes no sólo presentan la característica de sufrir la detención del ciclo celular, sino además, se ha encontrado que secretan factores que refuerzan la detención del ciclo, que alteran el microambiente, y que pueden activar la inmunovigilancia. En su conjunto, estos factores secretados conforman lo que se conoce con el nombre de fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, del inglés, senescence associated secretory phenotype), que incluye factores de crecimiento, quimioquinas y citoquinas inflamatorias (Freund, et. al 2010; Mason et al., 2006). Por medio de la secreción de estos factores, las células senescentes pueden comunicarse con su entorno y, por lo tanto influir en el microambiente tisular, promoviendo distintos procesos como la angiogénesis, la diferenciación celular o la proliferación (Hoenicke & Zender 2012). Con respecto al desarrollo del tumor, originalmente se creía que los factores secretados por las células senescentes promovían la proliferación del tumor (Krtolica, et al 2001). Sin embargo, datos más recientes indican que el fenotipo secretor asociado a senescencia puede atraer a células del sistema inmune. Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Lowe y colaboradores en donde la restauración de la expresión de p53 en un modelo de cáncer hepático de ratón provocó la inducción de senescencia celular asociada a una secreción pronunciada de quimioquinas y citoquinas. Estos factores promovieron la infiltración de células inmunes como macrófagos, neutrófilos y células NK que mediaron la eliminación de las células tumorales senescentes (Xue et al. 2007) (Figura 46). Este estudio demostró por vez primera la interacción entre la senescencia celular y el sistema inmune y sugiere que la inducción de senescencia puede ser un estrategia terapéutica para activar una respuesta inmune anti-tumoral (Xue et al. 2007).

Teniendo en cuenta que la inducción de senescencia es un mecanismo que frena la transformación oncogénica, y en base a la interacción existente entre las células senescentes con el sistema inmune, recientemente se ha explorado sí la respuesta inmune contra células pre-cancerosas senescentes tiene relevancia en la supresión de la formación del tumor. Se ha encontrado que las citoquinas y quimioquinas producidas por hepatocitos de ratón senescentes por sobre-expresión de NRAS^{G12V} atraen células de la inmunidad innata y adaptativa, sugiriendo que estos hepatocitos senescentes podían ser eliminados por el sistema inmune (Kang et al., 2011). En este trabajo se demostró efectivamente, que la eliminación de los hepatocitos pre-cancerosos senescentes depende de la inducción de una respuesta inmune adaptativa ya que

en ratones inmunodeficientes y en ratones *knockout* para LT CD4⁺ la eliminación de lo hepatocitos que expresan NRAS^{G12V} fue ineficiente. Más aún, en estos ratones, la expresión de este oncogén condujo al desarrollo de carcinomas hepatocelulares (Kang et al., 2011). A su vez, se encontró que los LT CD4⁺ dependen de los monocitos y de los macrófagos para eliminar eficientemente a los hepatocitos senescentes (figura 48). En otro trabajo se describió que las células NK son fundamentales para eliminar a las células hepáticas estrelladas senescentes y como consiguiente limitar la progresión de la cirrosis hepática (Krizhanovsky et al. 2008) (Figura 48). Esto implica que las respuestas inmunes contra las células senescentes pueden ser muy distintas para cada situación patológica y dependen del contexto de cada enfermedad (Figura 48). En conjunto, estos antecedentes muestran que la senescencia inducida por oncogenes tiene un rol importante en la inducción de respuestas inmunes específicas contra antígenos expresados en las células pre-cancerosas y que las células T CD4⁺ y la inmunidad innata son jugadores clave en la eliminación de estas células impidiendo el desarrollo de cáncer de hígado.



Figura 48. *Representación esquemática de las respuestas inmunes contra las células senescentes en contextos de diferentes enfermedades.* La inducción de senescencia en los carcinomas de hígado activa una respuesta inmune innata que lleva a la eliminación de las células senescentes por los macrófagos, neutrófilos y células NK (izquierda). En contraste, los hepatocitos pre-malignos senescentes, inducidos por la activación aberrante de un oncogén, activan una respuesta mediada por células T CD4⁺ antígeno específicas. En esta respuesta también están involucrados los monocitos y macrófagos (medio). Las células estrelladas hepáticas senescentes son eliminadas por células NK, evento fundamental para limitar la progresión de la fibrosis hepática en hígados dañados crónicamente (derecha). Adaptado de Hoenicke & Zender, 2012.

Por otro lado, también existen trabajos que vinculan la respuesta inmune con la inducción de senescencia por inactivación de un oncogén. Felsher y colaboradores demostraron que la inducción de senescencia celular *in vivo* y la regresión tumoral, en modelos murinos de linfoma de células T o en leucemias de células B, por inactivación de MYC o del oncogén BCR-ABL, respectivamente, requieren de un sistema inmune intacto, más específicamente, de las células T CD4⁺ (Rakhra et al. 2010). En este trabajo demostraron que la inactivación de MYC resulta en un aumento de la expresión de diversas citoquinas y quimioquinas en tumores, como eotaxina-1, IL-5, Rantes, IFN- γ y TNF- α . Todos estos mediadores pro-inflamatorios pueden fomentar una respuesta inmune anti-tumoral. Estos resultados indican que la regresión del tumor por inactivación de un oncogén depende de células del sistema inmune.

3. SENESCENCIA Y STAT3

Hasta la fecha, existen muy pocos trabajos que vinculen a STAT3 y las vías que conducen a la senescencia celular. En particular, estos trabajos son de los últimos años, 2011 y 2012, y fueron publicados al poco tiempo de empezar la nueva línea de investigación que estamos introduciendo en este capítulo. Podemos mencionar entre ellos, al estudio realizado en líneas celulares de cáncer de colon y de pulmón humano, en donde lo autores describen que la inhibición de la vía de señalización de IL-6/STAT3 en células tumorales expuestas a daños en el ADN deteriora el crecimiento de las mismas y favorece la inducción de la senescencia (Yun, et al., 2012). En base a los resultados obtenidos, este estudio sugirió que la IL-6 inhibe la senescencia, y que a su vez, promueve la supervivencia y proliferación de las células tumorales expuestas a daños en el ADN a través de la activación de la vía de señalización de STAT3-JAK1 (Yun, et al., 2012). En otro trabajo, investigando el rol en células de melanoma de Maml1, una proteína co-activadora de las vías de señalización de Notch y Wnt, se encontró que su inhibición resulta en la inducción de senescencia y en un aumento de la producción de IFN-y y de quimioquinas, junto con la disminución de la actividad de STAT3. Por otro lado, interesantemente, en este trabajo muestran que la inhibición en la proliferación in vivo de células de melanoma murino que tienen inhibida la expresión de Maml1 depende en parte de

los LT CD8⁺ y de las células NK, aportando más evidencias sobre la inducción de senescencia y su contribución al aumento de la imnunovigilancia (Kang et al., 2012).

Teniendo en cuenta que: *i*) la senescencia celular es un mecanismo importante de regresión tumoral luego de la inactivación de oncogenes; *ii*) las células senescentes promueven respuestas inmunes mediadas por células de la inmunidad innata, como NK y macrófagos, y de la inmunidad adaptativa como los LT CD4⁺; *iii*) STAT3 es un punto de convergencia de numerosas vías oncogénicas; *iv*) el proceso de senescencia conduce a la secreción de citoquinas pro-inflamatorias al igual que la inactivación de STAT3; *v*) la actividad de STAT3 protege de la inducción de senescencia; y *vi*) la inmunización con células tumorales de mama que tienen bloqueada la activación STAT3 induce una respuesta anti-tumoral NK-CD4⁺ dependiente (Capítulo II). Entonces, nos preguntamos si la inhibición de STAT3 está activando un programa senescencia celular en células de cáncer de mama.

OBJETIVOS (CAPÍTULO III)

Evaluar las consecuencias de la inhibición de STAT3 en la expresión de marcadores moleculares asociados a senescencia celular en células de cáncer de mama

Objetivos específicos:

- Estudiar si el bloqueo de STAT3 a través de la transfección con el vector STAT3Y705F o con siRNA inducen marcadores de senescencia como la actividad de la enzima β-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-gal) y la expresión de las proteínas p16INK4a, p15INK4b y p21^{CIP} en células de cáncer de mama murinas y humanas.
- Estudiar cambios en la estructura de la cromatina por inhibición de STAT3.
- Evaluar posibles mecanismos moleculares involucrados en la inducción de senescencia por inhibición de STAT3.

RESULTADOS (Capítulo III)

1. La inhibición de STAT3 está asociada a un aumento de marcadores de senescencia celular.

Como mencionamos anteriormente, la senescencia celular es un mecanismo importante durante la regresión tumoral por inactivación de oncogenes críticos para el desarrollo y mantenimiento del fenotipo tumoral (Wu et al. 2007). También sabemos que este proceso conduce a la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (Freund, et. al 2010; Mason et al., 2006), por lo tanto, nos preguntamos si además de la inducción de apoptosis (Gritsko et al., 2006; Proietti et al. 2005), la inhibición de STAT3 también podría llevar a la inducción de un programa de senescencia. Para responder esto, evaluamos distintas características asociadas a senescencia en células tumorales que tienen inhibida la actividad de STAT3. La expresión del vector STAT3Y705F en células C4HD y 4T1 resultó en un aumento de la tinción de la β galactosidasa ácida asociada a senescencia (SA-β-Gal) (Figura 49 A). Por otro lado, quisimos corroborar estos resultados utilizando otra estrategia para inhibir a STAT3. Con ese fin, utilizamos la técnica de siRNA: transfectamos células en cultivo con un siRNA específico contra la secuencia de STAT3. Al igual que lo observado para la transfección con el vector STAT3Y705F, la inhibición de STAT3 por siRNA indujo un aumento de SA-β-gal (Figura 49 B). Corroboramos, mediante WB, que la inhibición de STAT3 utilizando siRNA específico contra esta proteína fue de alrededor del 80-90/ en las células C4HD y 4T1 (Figura 50).



Figura 49. *La inhibición de Stat3 induce un aumento de la actividad de SA-6-gal.* (A) Las células C4HD γ 4T1 fueron transfectadas con el vector vacío pcDNA3.1 o con Stat3Y705F. La actividad SA-β-gal se evaluó luego de 48 h de transfección según el protocolo descripto en la sección "Materiales y métodos". Observamos las células en el microscopio y registramos el número de células senescentes de un total de 400 células contadas por tratamiento. Magnificación original 400X. Los datos representan la media ± ES del porcentaje de células SA-β-gal-positivas de duplicados experimentales (**, p<0,01). Se muestra un experimento representativo de un total de 4. (B) Las células C4HD y 4T1 fueron transfectadas con siRNA control o con siRNA contra Stat3 y 72 h luego evaluamos la actividad SA-β-gal. Se procedió de igual manera a lo descripto para (A). (**,p<0,01, ***, p<0,001). Se muestra un experimento representativo de un total de 3.



Figura 50. Análisis de la expresión de STAT3. Las células C4HD y 4T1 fueron transfectadas con siRNA control o siRNA STAT3 durante 48 h. Los niveles proteicos de STAT3 fueron evaluados por WB. Se reveló β -tubulina como control de carga.

Para corroborar que la inactivación de STAT3 resulta en la inducción de un programa de senescencia, analizamos la expresión de otros marcadores moleculares como p15INK4b y p16INK4a. Tras la inactivación *in vitro* de STAT3 por transfección con STAT3Y705F, las células de cáncer de mama C4HD y 4T1 exhibieron una inducción de la expresión de la proteína p15INK4b y p16INK4a como se muestra mediante WB (Figura 51).



Figura 51. La expresión de STAT3Y705F induce la expresión de marcadores moleculares asociados a senescencia celular. Las células C4HD y 4T1 fueron transfectadas con el vector vacío pcDNA3.1 o con STAT3Y705F durante 48 h. Los niveles de expresión de p16INK4a y p15INKb fueron analizados por WB a partir de los extractos proteicos. Se reveló β -tubulina como control de carga.

De manera similar, la inhibición de la expresión de STAT3 por siRNA en células C4HD también produjo un aumento del ARNm de p16INK4a analizado por RT-PCR cuantitativa (Figura 52 A) así como la expresión a nivel proteico (Figura 52 B).



Figura 52. La inhibición de STAT3 por siRNA induce la expresión de marcadores moleculares asociados a senescencia celular. (A) Las células C4HD fueron transfectadas con siRNA Control o siRNA STAT3 durante los tiempos indicados. Se extrajo el ARN y luego de la retrotranscripción, el ADNc se amplificó por PCR en tiempo real. Las veces de inducción de la expresión del ARNm se calcularon dividiendo los números arbitrarios obtenidos para el ARNm de p16INK4a de cada muestra en la PCR cuantitativa por las cantidades obtenidas del control interno GAPDH, estableciendo en 1 el valor de la muestra siRNA Control y determinando las veces de incremento del ARNm relativo a la muestra siRNA Control. Los datos representan la media de tres experimentos independientes ± ES (*, p<0,05). (B) Se determinaron los niveles de expresión de p16INK4a por WB a partir de extractos proteicos de células C4HD transfectadas 48 h con siRNA control o siRNA STAT3. Se reveló β-tubulina como control de carga.

Por lo tanto, la inactivación de STAT3 en las células de cáncer de mama murino C4HD y 4T1 resulta en un aumento de la SA-β-gal y en la inducción de p16INK4a y p15INK4b, todos marcadores moleculares asociados con la senescencia celular.

2. La inactivación de STAT3 produce cambios en la estructura de la cromatina.

La senescencia celular es conocida por estar asociada con cambios globales en la estructura de la cromatina (Narita et al. 2003; R. Zhang et al. 2005). Por lo tanto, examinamos modificaciones de la cromatina asociadas con la senescencia celular en células C4HD *in vitro*, como la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (triMeK9H3). Mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal, encontramos que la transfección de células C4HD con el vector STAT3Y705F o con un siRNA contra

STAT3 promueve un aumento de la triMEK9H3 en comparación con las células control (Figura 53). Por lo tanto, estos resultados indican que la inactivación de STAT3 promueve cambios en las modificaciones post-traduccionales de histonas, específicamente en la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3, modificación que ha sido previamente asociada a un fenotipo senescente.

C4HD



Figura 53. *La inhibición de Stat3 induce cambios en la estructura de la cromatina in vitro.* Evaluamos la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (TriMeK9H3) por inmunofluorescencia seguida de microscopía confocal en células C4HD-pcDNA3.1 o Sat3Y705F o en células trasfectadas con siRNA Control o siRNA STAT3 durante 48 h. TriMeK9H3 fue localizado utilizando un anticuerpo monoclonal de conejo seguido de la incubación con un anticuerpo secundario anti IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (Verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Estas imágenes son representativas de 3 experimentos.

3. La inhibición de la proliferación de cáncer de mama por inactivación de STAT3 depende de la inducción de senescencia celular

La activación del programa de senescencia celular requiere de la función de distintos supresores de tumores, incluyendo a p16INK4a, p53 y Rb entre otros (Chen et al. 2005; Masashi et al. 2003; Schmitt et al. 2002). Por lo tanto quisimos evaluar si la expresión de alguno de estos genes era necesaria para la inducción de senescencia por inhibición de STAT3. Por lo tanto,

evaluamos el efecto de la pérdida de expresión de p16INK4a en células C4HD transfectadas con siRNA contra STAT3. Para ello bloqueamos la expresión de p16INK4a con siRNAs junto con el bloqueo de STAT3. La inhibición en la expresión de p16INK4a y de STAT3 en células C4HD transfectadas con siRNAs contra ambas proteínas se corroboró por WB (Figura 54 A). Pudimos comprobar que las células C4HD que no tienen p16INK4a no pueden efectuar su programa de senescencia, determinada por la actividad de SA-β-gal, gatillado por la falta de STAT3. Por el contrario, luego de la inhibición de STAT3 encontramos actividad SA-β-gal en células que expresan p16INK4a endógena (Figura 54 B).



Figura 54. La pérdida de p16INK4a impide la inducción de SA- β .gal en células que tienen inhibida STAT3. (A) Las células C4HD fueron transfectadas con siRNA control o siRNA STAT3 o siRNA p16INK4a o con la combinación de estos dos últimos siRNA durante 48 h. Los niveles proteicos de STAT3 y de p16INK4a fueron evaluados por WB. Se reveló β -tubulina como control de carga. (B) Se realizó un ensayo de SA- β .gal como se explicó para la figura 47. Los datos representan la media ± ES del porcentaje de células SA- β -gal-positivas de duplicados experimentales (**, p<0,01). Se muestra un experimento representativo de un total de 4.

Acorde a resultados previos de nuestro laboratorio (Proietti et al., 2009; Proietti et al., 2005), la inhibición de STAT3 disminuyó la proliferación *in vitro* de células C4HD creciendo en un medio completo, rico en suero (Figura 55). Sin embargo, la inhibición de la expresión de p16INK4a en estas células bloqueó parcialmente el arresto en el ciclo celular observado por la transfección con siRNAs contra STAT3. Es decir, las células C4HD que no expresan p16INK4a exhibieron una proliferación sostenida, inclusive mayor al control, tras la inactivación de STAT3

(Figura 55). La pérdida de p16INK4a previene la inducción de senescencia celular y la inhibición de la proliferación por inactivación de STAT3.



Figura 55. La pérdida de p16INK4a revierte la inhibición de la proliferación inducida por la inhibición de STAT3. Realizamos un ensayo de proliferación por incorporación de timidina-[³H] en células C4HD transfectadas con siRNA control o siRNA STAT3 o siRNA p16INK4a o con la combinación de estos dos últimos siRNA. Luego 48 h en medio de transfección más 24 h en medio completo se cosecharon las células y se midió la radioactividad incorporada. Los datos se presentan como la media de las cpm ± ES de octuplicados. Las diferencias significativas fueron calculadas contra las células transfectadas con siRNA Control y contra células transfectadas con siRNA Stat3 (***, p<0,001). Se muestra un experimento representativo de tres.

4. La inhibición de STAT3 induce senescencia en células de cáncer de mama humano

Por último, quisimos evaluar si los resultados obtenidos para las células de cáncer de mama de ratón podían extenderse a modelos humanos. Para ello trabajamos con la línea celular humana de cáncer de mama, MDA-MB-231, que tiene activación constitutiva de STAT3 (Cotarla et al., 2004; Dechow et al., 2004; Diaz et al., 2006; Dolled-filhart, et al. 2003; Leslie et al., 2006; Vultur et al., 2004). La línea celular MDA-MB-231 deriva de la efusión pleural de un paciente con cáncer de mama y que no expresa niveles significativos de receptores de estrógeno, de RP ni de ErbB2. Transfectamos células MDA-MB-231 con siRNA contra STAT3 y analizamos la tinción de SA-β-gal. Observamos un aumento en la tinción de SA-β-gal en células MDA-MB-231-siRNASTAT3 en comparación con las células transfectadas con un siRNA control (Figura 56 A). Por otro lado, analizamos la expresión de marcadores moleculares de senescencia

como p21^{CIP}. Observamos un aumento en la expresión de proteína inhibidora de quinasas dependientes de ciclinas p21^{CIP} luego de la inhibición de STAT3 (Figura 56 B). Se ha reportado que las MDA-MB231 no tienen una proteína p16INK4a funcional. En nuestro caso, no pudimos observar expresión de la misma por WB. La inactivación de STAT3 en éstas células por medio de transfección con siRNA de STAT3 inhibe su proliferación (figura 56 C), al igual que lo observado en las MDA-MB-231 utilizando inhibidores farmacológicos de STAT3 (R Garcia et al. 2001; Kotha et al. 2006).





como se explicó para (A) y luego de 48 h se prepararon extractos proteicos y se evaluaron los niveles de expresión de p21^{CIP} y de STAT3 por WB. Se reveló β -tubulina como control de carga. (C) Realizamos un ensayo de proliferación por incorporación de timidina-[³H] en células MDA-MB-231 transfectadas con siRNA control o siRNA STAT3. Los datos se presentan como la media de las cpm ± ES de octuplicados (***, p <0,001). Se muestra un experimento representativo de tres.



DISCUSION (CAPITULO I)

En el presente estudio hemos demostrado que los progestágenos son capaces de inducir la fosforilación STAT3 en el residuo Ser727 y que la vía de señalización c-Src/p42/p44 MAPK está implicada en este evento de fosforilación (figura 57). Además, hemos demostrado que la fosforilación de STAT3 en la Ser727 es necesaria para inducir la expresión de ciclina D1 y promover la proliferación de las células de cáncer mama tanto *in vivo* como *in vitro* (figura 57). Estos resultados contribuyen a comprender más en profundidad los efectos no genómicos de los progestágenos en el crecimiento del cáncer de mama, evidenciando que la fosforilación de STAT3 en Ser727 es un evento esencial.



Figura 57. Modelo de activación de STAT3 inducida por progestágenos. El receptor de progesterona unido a su ligando induce la activación de Src y la consecuente activación de, por un lado la vía de las quinasas MAPK (Boonyaratanakornkit et al. 2001) y por el otro, de las quinasas Jak (Proietti et al, 2005). La activación de Jak conduce a la fosforilación en a tirosina 705 (Proietti et al, 2005) y las MAPKs activadas fosforilan a STAT3 en la serina 727. STAT3 activada por estos efectos rápidos, no genómicos del PR transloca al núcleo donde se une a los sitios GAS del promotor de ciclina D1 y activa su transcripción. Actualmente se encuentran descriptas una amplia variedad de quinasas que participan en la fosforilación de la Ser727 de STAT3 en diversos tipos celulares, incluyendo p42/p44 MAPK, quinasas c-Jun (JNK), la MAPK p38, quinasas PKCε y mTOR (Decker & Kovarik 2000). Recientemente se reveló que la actividad oncogénica de PKCε ocurre a través de la activación de la vía de Raf-1, MEK-1 y MAPK p42/p44 para finalmente fosforilar a STAT3 en el residuo Ser727. Adicionalmente se encontró que la fosforilación de STAT3 en la Ser727 es necesaria para la inducción de la invasión en varios tipos de cáncer humano vía activación de PKCε (Aziz et al. 2007).

Con respecto a la señalización rápida del RP, Auricchio y colaboradores describieron un efecto no genómico de los progestágenos, evidenciando la activación de la vía de señalización c-Src/p21ras/p42/p44 MAPK en la línea celular humana de cáncer de mama T-47D (Ballare et al. 2003, Migliaccio et al. 1998). Más aun, resultados previos de nuestro grupo demostraron que los progestágenos son capaces de inducir la fosforilación de STAT3 en el residuo Tyr705 a través de la activación de la cascada de señalización de c-Src/Jak (Proietti et al. 2005). Estos efectos de los progestágenos sobre las vías de señalización celular en ausencia de efectos transcripcionales dependen del clásico RP. De hecho, la proteína RP humana tiene en el dominio amino terminal (aminoácidos 421 a 428) un motivo poliprolina que media la interacción directa de RP con el dominio SH3 de la quinasa específica de tirosinas c-Src, activándola mediante un mecanismo de desplazamiento del dominio SH3 (Boonyaratanakornkit et al. 2001). También estos autores confirmaron que la activación de c-Src está mediada por el RP exclusivamente en el citosol, apoyando la idea de que sólo RP-B puede estimular a c-Src y no RP-A, que es principalmente nuclear (Boonyaratanakornkit et al. 2007). Notablemente, en nuestros experimentos con células de cáncer de mama humanas, que no expresan RP (T-47D-Y), y en aquellas que expresan la proteína RP-BmPro, carente del motivo poliprolina necesario para la activación de c-Src, comprobamos que el tratamiento con el progestágeno MPA fue incapaz de fosforilar a STAT3 en el residuo Ser727. Interesantemente, hemos encontrado que el MPA induce la activación de p42/p44 MAPK a través de c-Src en células C4HD. Se sabe que el RP de ratón carece del motivo de poliprolina, pero sin embargo, hemos demostrado en un trabajo previo del grupo que el MPA también induce la activación de c-Src en células murinas C4HD (Proietti et al. 2005).

Además, recientemente, en otro trabajo, hemos descripto la importancia de la fosforilación del RP en Ser294, tanto en células humanas como de ratón, en la regulación de c-Src en respuesta a heregulina (Proietti et al. 2009). Teniendo en cuenta que el MPA induce la fosforilación de RP en el residuo Ser294 (Lange et al., 2000), la activación de este receptor podría a su vez inducir la activación de c-Src en ratón, de manera independiente al motivo poliprolina.

La evidencia aquí proporcionada sugiere una conexión directa entre la vía de transducción de señales formada por c-Src/p42/p44 MAPK y la fosforilación de STAT3 en el residuo Ser727. En primer lugar, el tratamiento de las células con U0126, inhibidor de la vía p42/p44 MAPK, suprimió la capacidad del MPA de fosforilar a STAT3 en el residuo Ser727. Por otro lado, la inhibición de c-Src por medio de los inhibidores farmacológicos PP2 y dasatinib, impidió la activación de p42/p44 MAPK y en consecuencia, la fosforilación de STAT3 en Ser727 inducida por MPA. Por último, el ensayo de fosforilación *in vitro* demostró que las p42/p44 MAPK activadas por MPA pueden fosforilar a STAT3 en el residuo Ser727. En conjunto, todas estas evidencias sugieren fuertemente que el MPA desencadena una cascada de señalización que conduce a la activación secuencial de c-Src y p42/p44 MAPK, promoviendo la fosforilación de STAT3 en el residuo Ser727, tanto en células de cáncer de mama humanas como de ratón.

Hay varios informes que proponen que la finalidad biológica de la fosforilación de STAT3 en Ser727, es alcanzar una máxima activación transcripcional de STAT3 (Decker & Kovarik 2000, Wen et al. 1995). En esta línea, Shen y colaboradores observaron y describieron una marcada reducción en la actividad transcripcional de STAT3 *in vivo* cuando las células expresan la mutante STAT3S727A (Shen et al., 2004). El mecanismo por el cual STAT3S727A actúa como dominante negativo radica en su capacidad de formar heterodímeros con la proteína endógena, lo que resulta en la formación de un homodímero inactivo y como consecuencia, en una pobre activación transcripcional (Bromberg et al., 1998). Nuestros resultados indican que la presencia de la proteína mutante STAT3S727A suprimió la actividad transcripcional del reportero m67 y del promotor del gen de ciclina D1. Además, los ensayos de ChIP realizados en células transfectadas con STAT3S727A, demuestran claramente que la fosforilación de STAT3 en el residuo Ser727 es necesaria para el reclutamiento de STAT3 a los sitios GAS del promotor de ciclina D1. En un principio se creía que el aumento de la transcripción por la fosforilación en serina podía ser explicado por una influencia positiva de la fosforilación de la serina en la fosforilación de la tirosina de STAT3. Sin embargo, hasta el momento, la información disponible no acompaña esta posibilidad. Al igual que para STAT1, pareciera que la fosforilación de la tirosina de STAT3 no se ve aumentada por la fosforilación en Ser727 (Decker & Kovarik 2000). Por otro lado, se ha observado recientemente en leucemias linfocíticas crónicas que la fosforilación de STAT3 en Ser727 es capaz de mediar su activación transcripcional independientemente de la fosforilación pueden, en principio, estar desacoplados. Esta hipótesis, a su vez, también está apoyada por estudios que muestran la fosforilación de serina por estímulos que no causan la fosforilación de la tirosina de STAT3 (Ceresa & Pessin 1996; Gotoh et al. 1996; Kovarik et al. 1998; Kuroki & O'Flaherty 1999; Lim & Cao 1999; Ng & Cantrell 1997). Todos estos datos sugieren que los efectos de la fosforilación de STAT3 en Ser727 en gran medida dependen del tipo celular, de la clase de estímulo extracelular, y del estado de activación de la célula en estudio.

Es ampliamente conocido que la expresión de ciclina D1 es necesaria para la carcinogénesis mamaria (Yu et al. 2001). A lo largo del capítulo I de esta Tesis hemos demostrado que la inducción de ciclina D1 por progestágenos depende de la cascada de señalización compuestas por c-Src/ p42/p44 MAPK /pSTAT3Ser727. Además, encontramos que este evento de fosforilación es esencial para la proliferación de células de cáncer de mama, tanto *in vitro* como *in vivo*, inducida por progestágenos. Estos hallazgos no sólo profundizan nuestro conocimiento acerca de la biología del cáncer, sino también permiten proponer nuevos abordajes terapéuticos dirigidos contra las vías de señalización mediadas por p42/p44 MAPK, como lo es el inhibidor de MEK AZD6244 que actualmente se encuentra en ensayos clínicos en fase II para varios tumores malignos (O'Neil et al. 2011; Patel & Kim 2012).

Nuestros datos obtenidos del estudio de una cohorte de pacientes con cáncer de mama demuestran, por primera vez, que existe una asociación entre los niveles aumentados de pSTAT3Ser727 y la expresión de RP en carcinomas de mama ductales invasivos. De hecho, se observó que el 81/ de los tumores RP positivos también acumulan pSTAT3Ser727 en el núcleo,

aportando más sustento al número cada vez mayor de evidencias que muestran la activación de STAT3 en muestras de cáncer de mama (Dolled-Filhart et al. 2003, Sato et al. 2011). Adicionalmente nuestros datos sugieren que la fosforilación de STAT3 en el residuo Ser727, puede ser atribuida a la presencia de RP, y por lo tanto a la acción de la progesterona en pacientes con cáncer de mama. Estos resultados junto con los datos que demuestran que la fosforilación en Ser727 de STAT3 es necesaria para su activación transcripcional refuerzan la teoría de que la fosforilación en Ser727 conduce a una fuerte actividad transcripcional de STAT3 a través su asociación con coactivadores (Schuringa et al., 2001) y en consecuencia, esto promueve la oncogénesis del cáncer de mama. Alternativamente, la expresión de pSTAT3Ser727 en tejido de cáncer de mama también puede representar una activación persistente de los miembros de la familia MAPK, que son en parte, las quinasas responsables de la fosforilación de STAT3 en serina 727 (David et al., 1995; Gee et al., 2001). En otro trabajo evaluaron por inmunohistoquímica los niveles de pSTAT3Ser727 en carcinomas de mama ductales, y observaron un marcado aumento en la tinción en comparación con los tejidos de mama no cancerígenos (Yeh et al. 2006). En este trabajo estudiaron una cohorte de 68 carcinomas mamarios ductales infiltrantes, y encontraron una correlación positiva entre el nivel de pSTAT3Ser727 y el estadio tumoral y su tamaño. La expresión de pSTAT3Ser727 presentó también una correlación negativa con la expresión del receptor de estrógenos, y ninguna correlación con el RP (Yeh et al. 2006). En este trabajo consideraron como positivo a todas aquellas muestras que presentaban un 50/ más de expresión de pSTAT3Ser727 en el tejido de cáncer de mama que en el tejido de mama normal. Si bien nosotros no encontramos una correlación significativa entre la expresión del receptor de estrógenos y pSTAT3Ser737 y si entre pSTAT3Ser727 y el RP, cabe destacar que nuestro análisis fue completamente distinto. Las diferencias entre ambos trabajos puede deberse al uso de distintas técnicas de detección (inmunohistoquímica vs inmunofluorescencia), al uso de anticuerpos diferentes (policional vs monoclonal), al tipo de estatificación y también a las diferentes cohortes (cohorte de pacientes de China vs. Argentina).

Por otro lado, existen diversos estudios sobre la fosforilación de STAT3 en la tirosina 705 en muestras de cáncer de mama. Sin embargo, los datos hasta el momento son bastante contradictorios en cuanto al valor pronóstico de STAT3 en cáncer de mama (Dolled-filhart et al. 2003; Sato et al., 2011; Sheen-Chen et al., 2008). En el trabajo de Dolled-Filhart y colaboradores detectaron un modesto valor pronóstico favorable para la localización nuclear de Stat3 fosforilada en la tirosina en tumores de cáncer de mama. En dicho trabajo, no encontraron relación significativa entre pSTAT3Tyr705 y la expresión de receptores hormonales. En el estudio de Sato y colaboradores, al igual que en el de Yamashita y colaboradores no detectaron ningún valor pronóstico de STAT3 (Sato et al. 2011; Yamashita et al. 2006). Cabe señalar que todas estas diferencias pueden ser debido a una combinación del análisis de datos de distintas STAT3 (total vs. fosforilada en Tyr705), así como las diferencias en cohortes de pacientes y la duración del seguimiento clínico. Es también importante destacar que existe la posibilidad de que STAT3 tenga valor pronóstico en ciertos subgrupos moleculares de cáncer de mama y es por esto que es importante distinguir entre cada grupo.

En conclusión, los resultados revelan que la progesterona, a través de una cascada de señalización independiente de los efectos genómicos, es capaz de fosforilar a STAT3 en la Ser727 conduciendo a la inducción de ciclina D1 y la concomitante activación del crecimiento del cáncer de mama *in vivo*.

DISCUSIÓN (CAPITULO II)

Uno de los aspectos más interesantes de STAT3 como blanco en la terapia contra el cáncer, es que el efecto antitumoral observado al bloquear la expresión de STAT3, utilizando distintas estrategias, involucra también una respuesta inmune del huésped (Molavi et al., 2008; Niu et al., 1999; Yu, et al. 2007). En el presente trabajo demostramos que la inyección seriada de células de cáncer de mama, C4HD y 4T1, transfectadas in vitro con un vector DN de STAT3, STAT3Y705F, impartió una protección inmunológica ante el desafío in vivo con el tumor parental. Nuestros resultados demuestran que la inhibición de la activación de STAT3 produce un cambio en el fenotipo tumoral, ya que las células pasan de un estado promotor de la tumorigénesis y de la tolerancia inmunológica a un fenotipo inflamatorio que puede ser aprovechado con éxito en una inmunoterapia contra el cáncer de mama, ya sea en forma profiláctica o terapéutica. Nuestros estudios en las células de cáncer de mama C4HD, en donde la activación de STAT3 es inducida por MPA, y en células 4T1, que presentan activación constitutiva de STAT3, muestran que la inmunización con células transfectadas con un DNSTAT3 resulta en la inhibición del crecimiento tumoral y en la prevención de metástasis. Además, hemos demostrado que los ratones inmunizados con células 4T1-STAT3Y705F desarrollaron una respuesta inmune antitumoral que proporciona protección cruzada contra otros cánceres de mama singeneicos, como las células C4HD, y contra las células de carcinoma de colon CT26.

Este trabajo es el primer reporte experimental demostrando que la inhibición del crecimiento de un tumor de mama puede ser logrado mediante la activación del sistema inmune administrando como inmunógeno a las células tumorales que tienen inhibida la activación de STAT3.

Como mencionamos en la introducción de esta Tesis, la activación de STAT3 está finamente controlada en células normales, debido a que es necesario prever su hiperactivación para mantener la homeostasis del sistema inmune. En contraste, en células tumorales STAT3 se encuentra constitutivamente activa, lo que resulta en una respuesta inmune defectuosa y conduce a que las células tumorales logren evadir al sistema inmune. En concordancia con los informes anteriores en melanoma, carcinoma de colon, sarcoma y linfoma B difuso de células grandes (Nefedova et al., 2005; Scuto et al., 2011; Wang et al., 2004), nuestros resultados muestran que el bloqueo de la señalización de STAT3 en células de cáncer de mama, mediante la transfección con el vector STAT3Y705F o por el tratamiento con el inhibidor farmacológico JSI-124, induce un aumento en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF α , IFN-y, IL-6, IL-5, así como de quimioquinas, incluyendo IP-10 y RANTES. Por lo tanto, la transfección con un vector DNSTAT3 convierte a la célula tumoral en una célula que tiene potencialmente la capacidad de neutralizar las señales inmunosupresoras creando un microambiente favorable para el reconocimiento por parte del sistema inmune. Wang y colaboradores demostraron que el sobrenadante de fibroblastos 3T3 transformados con v-Src que expresan una proteína DNSTAT3 induce la maduración de CDs (Tianhong Wang et al. 2004). Además, la inhibición de la señalización de STAT3 en CDs por tratamiento con el inhibidor farmacológico JSI-124 dio lugar a la maduración de estas células en presencia de factores derivados del tumor (Nefedova et al., 2005). En línea con esta evidencia, en esta Tesis hemos demostrado que las CDs de ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F co-cultivadas con células C4HD tuvieron un aumento de la expresión la molécula co-estimulatoria CD86 y de la molécula CMH de clase II, ambos marcadores de maduración de CDs. Es importante destacar que las células tumorales transfectadas con el vector DNSTAT3 o tratados con JSI-124 liberan TNF- α e IFN-y, que pueden actuar sinérgicamente para inducir en células T CD4⁺ una señalización que promueve la síntesis de quimioquinas antiangiogénicas y por lo tanto previene de la vascularización tumoral, y de la consecuente proliferación de células tumorales y de las múltiples etapas de la carcinogénesis (Müller-Hermelink et al. 2008). Además, las células tumorales que tienen inhibida la actividad de STAT3 producen RANTES, quimioquina implicada en la migración de células T y en el reclutamiento de células NK a los tumores (Wendel et al. 2008), e IP-10, que es un quimioatractante para células NK y células T activadas (Arenberg et al. 1996).

Previamente, se ha descripto que la transfección con el vector STAT3Y705F, tiene una alta eficacia en la inducción de la regresión del melanoma de ratón B16 a pesar de la baja eficiencia de transfección *in vivo* (sólo el 10-15/ de las células tumorales fueron transfectadas con este vector) (Guilian Niu et al. 1999). Esto llevó a elaborar y comprobar la hipótesis del

efecto *bystander*, que infiere que las células que sí están transfectadas producen factores solubles que conducen a la inducción de apoptosis y el arresto del ciclo celular de las células vecinas no transfectadas (Niu et al., 2001). Desde entonces se han encontrado numerosos factores, como factores pro-angiogénicos, que son blanco de STAT3 y que en su ausencia no se expresan, que influyen en el efecto *bystander* referido anteriormente. También se ha adjudicado a este efecto la regulación de la respuesta inflamatoria e inmune del microambiente tumoral. Es por esto, que pese a que la eficiencia de transfección no sea del 100/, se puede especular que la inhibición de STAT3 en las células transfectadas afecta a las vecinas, modificándolas de todos modos.

A través de experimentos de depleción selectiva de células del sistema inmune, se encontró que tanto la falta de LT CD4⁺ como de células NK, pero no de LT CD8⁺, impidieron el efecto anti-tumoral observado por la inmunización de ratones BALB/c con células transfectadas con STAT3Y705F. Además, también hemos determinado que sólo las células NK de ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F tienen la capacidad de lisar las células C4HD salvajes. También observamos un fuerte incremento en la secreción de IFN-γ en esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F luego del co-cultivo con células C4HD. Respecto a este punto, encontramos que los LT CD4⁺ y las células NK son la principal fuente de IFN-γ.

En contraste, la inmunización de ratones *nude*, que carecen de linfocitos T, no produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral. Nuestros datos también revelan la generación de células T CD4⁺ de memoria y la activación de CDs por inmunización con células de cáncer de mama que expresan STAT3Y705F. Tomados en su conjunto, los resultados presentados aquí apoyan la noción de que los LT CD4⁺ activados probablemente por las CDs, son necesarios para la respuesta inmune anti-tumoral inducida por la inmunización con células de cáncer de mama STAT3Y705F. En particular, las células NK son las efectoras de la citotoxicidad contra el tumor, y su acción depende de la activación de LT CD4⁺ colaboradoras. Por otro lado, comprobamos que estos LT CD4⁺ tienen expresión de marcadores de células de memoria, con lo cual podemos suponer que en ellos reside el reconocimiento del tumor en la administración profiláctica.

Hasta el momento, el rol fundamental de los LT CD4⁺ en la inducción de una respuesta primaria y de memoria eficaz de los LT CD8⁺ ha sido extensamente estudiado (Wiesel & Oxenius 2012). Sin embargo, actualmente existen numerosos trabajos que dan cuenta de la relación existente entre las células NK y los LT CD4⁺, tanto para la inducción de respuestas contra patógenos, como de respuestas anti-tumorales. Un estudio in vitro reveló que las células NK humanas CD56⁺ presentes en ganglios linfáticos pueden ser activadas por la IL-2 derivada de células T (Fehniger et al. 2003). Estas células NK activadas por IL-2 producen altos niveles de IFN-y, capaz de influenciar en el desarrollo de una respuesta inmune antígeno específica. Esto demuesta el rol de las células NK como inmunoreguladores innatos de la respuesta inmune adapativa primaria. Por otro lado, se demostró que la comunicación entre las células T y las células NK humanas se requiere para mediar la respuesta contra la influenza y contra el Plasmodium falciparum dependiente de las células NK productoras de IFN-y (He et al. 2004; Horowitz et al. 2010). En un modelo de ratón de infección in vivo con Leishmania major, Bihl y colaboradores demostraron que los LT CD4+ antígeno específicos eran necesarios para la activación de células NK (Bihl et al. 2010). En estudios recientes también se abordó la importancia de la comunicación entre LT y células NK en modelos de cáncer. Estos estudios revelaron que el control del crecimiento tumoral mediado por células T CD4⁺ requiere la presencia de células NK (Perez-Diez et al. 2007) y que las células T CD4⁺ son necesarias para la producción de IFN-y por parte de las células NK (Li et al., 2007). Por otro lado, Ni y colaboradores observaron que la protección contra el crecimiento tumoral inducida por la inyección de células NK pre-activadas con IL-12, IL-15 e IL-18 depende de la presencia de células CD4⁺ (Ni et al., 2012). En este trabajo, encontraron presencia simultánea de células NK y de LT CD4+ en el tejido tumoral, sugiriendo que su interacción podía ocurrir dentro de los tumores. También demuestran la importancia de la IL-2 y de las células T CD4⁺ para la expansión y la actividad antitumoral de las células NK pre-activadas (Ni et al. 2012). Todavía no se encuentran completamente caracterizadas las moléculas involucradas en el diálogo entre LT CD4⁺ y NK durante las respuestas anti-tumorales. En nuestro caso, observamos un aumento en la producción de IL-2 en co-cultivos de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con células C4HD-STAT3Y705F con células C4HD salvajes. Esta citoquina podría ser en nuestro caso

una de las moléculas que interviene en el diálogo cruzado entre LT CD4⁺ y NK al igual que lo descripto para otras situaciones (Fehniger et al. 2003; Ni et al. 2012).

La diferencia crucial entre los LT CD8⁺ y los LT CD4⁺ es la forma en que reconocen los antígenos a través de dos vías separadas de procesamiento de antígeno. Los LT CD8⁺ reconocen, predominantemente, los antígenos endógenos, aquellos antígenos intracelulares que son presentados por moléculas del CMH de clase I, que están ubicuamente expresadas por la mayoría de los tejidos normales y cancerosos. El reconocimiento directo de los antígenos en el contexto del CMH de clase I por los LT CD8⁺ citotóxicas resulta atractivo. Sin embargo, las células tumorales son poco confiables en cuanto a su capacidad como presentadoras de antígeno. En muchos casos, carecen de la activación de moléculas co-estimulatorias y tienen genomas inestables que son propensos a perder moléculas clave necesarias para el procesamiento y presentación de antígenos [15, 16].

La actividad citotóxica de las células NK está finamente regulada por la integración de señales de receptores inhibitorios y activadores (Pegram et al., 2011). El receptor activador NKG2D es de particular interés ya que se une a varias glicoproteínas de la superficie celular, incluyendo en ratón la proteína RAE-1 y H-60 (Diefenbach, et al 2001). En esta Tesis mostramos que las células C4HD expresan RAE-1 y H-60, y en estudios previos se ha demostrado la expresión de estos antígenos en células 4T1 (Takaki et al. 2005), lo que indica que ambas líneas celulares son capaces de ser blanco de células NK, conduciendo a la eliminación del tumor.

La inmunoterapia contra el cáncer de mama que planteamos en este trabajo puede resultar una vacuna tumoral muy atractiva, práctica y genérica precisamente por el hecho de que confiere protección cruzada contra otros cánceres de mama y contra otro tipo de cáncer, en este caso, colon. En la bibliografía se pueden encontrar algunos trabajos, en donde el uso de diversas estrategias de inmunización induce una respuesta inmune que proporciona protección cruzada. A continuación, enumeraremos algunos ejemplos: i) la administración de células CT26 de carcinoma de colon que sobre-expresan IL-12 en ratones produce el rechazo del tumor de cáncer de mama murino, LM3, a través de la participación de LT CD8⁺ citotóxicos (Adris et al. 2000); ii) la inmunización con células madre embrionarias humanas irradiadas promueve la producción de IFN-γ en células T CD4⁺ y el rechazo del tumor CT26 (Li et al. 2009); iii) la

inmunización de ratones con una biblioteca de ADNc de tejido normal de próstata humano, expresado a partir de vectores virales altamente inmunogénicos, genera una respuesta dependiente de células T CD4⁺ y células Th17 que rechaza el establecimiento de tumores de próstata en ratón (Kottke, T. et al. 2011); iv) la inmunización con células irradiadas 4T1 cotransfectadas con Flt3L y p53 inhibe el crecimiento de otra línea celular de cáncer de mama y muestra un aumento de linfocitos secretores de IFN-γ e IL-4 (Sang et al. 2005). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se evaluó la participación *in vivo* de células NK. Nuestros resultados sostienen que el efecto antitumoral inducido por la inmunización con células de cáncer que expresan la proteína DNSTAT3 requiere de las células NK como efectoras de la citotoxicidad contra el tumor, pero también de los LT CD4⁺, lo que sugiere la existencia de antígenos tumorales compartidos por los diferentes tipos de células tumorales con los que trabajamos que podrían servir de objetivo en esta terapia y de este modo validar la protección cruzada observada.

Los experimentos utilizando células 4T1 como modelo de cáncer de mama metastásico mostraron que la inmunización con células 4T1 transfectadas con STAT3Y705F inhibe el crecimiento tumoral y reduce el número de metástasis en pulmón. Curiosamente, se encontró una disminución en el número de células Treg y un aumento en las células NK que infiltran tumores 4T1 creciendo en ratones inmunizados con células 4T1-STAT3Y705F en comparación con animales inmunizados con células 4T1-pcDNA3.1. Esta correlación inversa entre Tregs y las células NK es apoyada por los hallazgos de Olkhanud y col., que demostraron que las Tregs son necesarias para la metástasis de pulmón de las células 4T1 y que la protección contra la metástasis reside en la población de células NK (Olkhanud et al. 2009). Por otro lado, el aumento del número de células NK intratumorales correlaciona frecuentemente con un mejor pronóstico en los pacientes con cáncer (Coca et al. 1997; Villegas et al. 2002) y también con mejor sobrevida en ratones (Wendel et al. 2008).

Por otro lado, demostramos que la inmunización con células de cáncer de mama que expresan la proteína DNSTAT3 también resultó eficaz en un protocolo de administración terapéutica. Observamos que los tumores provenientes de ratones inmunizados con células transfectadas con el vector STAT3Y705F tenían un menor tamaño tumoral y un menor grado histológico que los de los ratones inmunizados con células pcDNA3.1. En un estudio de seguimiento de pacientes con cáncer de mama durante 10 años mostró que el tamaño del tumor, el compromiso ganglionar y el grado histológico del tumor son los factores pronósticos más importantes para la supervivencia a largo plazo (Soerjomataram et al., 2008). Estos mismos factores son considerados predictores del establecimiento de metástasis a distancia (Rabbani & Mazar, 2007). Esto resalta la importancia del hallazgo de que la inmunización con células que tienen inhibida la activación de STAT3 disminuye el grado tumoral, el crecimiento tumoral y las metástasis, ya que se tratan de los indicadores pronósticos más importantes en cáncer de mama.

Actualmente el estudio de STAT3 como blanco para el desarrollo de una inmunoterapia contra el cáncer continúa siendo explorado mediante la utilización de múltiples estrategias. Entre estos enfoques podemos encontrar trabajos en donde bloquean in vivo a STAT3 por deleción genética en células tumorales o en células del sistema inmune o por la administración de inhibidores farmacológicos (Floriddia, et al., 2011; Kortylewski et al., 2005; Liu et al., 2011; Wang et al., 2004). Sin embargo, las tasas de éxito en la estimulación de la respuesta inmune anti-tumoral de estas estrategias son variables, y hasta el momento la aplicación clínica de estos enfoques está limitada al diseño de mecanismos que hagan posible la inhibición in vivo específica del objetivo. En relación a esto, recientemente se ha desarrollado otra estrategia basada en el bloqueo in vivo de STAT3 en células del sistema inmune mediante el uso de siRNAs contra STAT3 conjugados a secuencias CpG de activación de receptores tipo toll (TLR). De esta manera, se inhibe la expresión de STAT3 en células de sistema inmune y esto potencia su actividad contra el tumor (Kortylewski et al. 2009, 2010). Sin embargo, uno de los principales problemas de las terapias basadas en el bloqueo sistémico de STAT3 es la aparición de manifestaciones autoinmunes. La inhibición de STAT3 durante períodos de tiempo prolongados, de más de un mes, puede producir una sobre-activación del sistema inmune, que conduce a fenómenos como la colitis autoinmune, según se informó previamente (Alonzi et al. 2004; Welte et al. 2003). Nuestra estrategia anti-tumoral, al no estar basada en el bloqueo sistémico de STAT3 mediante moléculas inhibitorias, no presenta este tipo de problemas. En nuestro

caso, se induce una respuesta contra células tumorales, que no mostró ningún efecto adverso en otros órganos.

En nuestro estudio proporcionamos el primer informe del uso de una vacuna de células tumorales enteras que tienen inactivación de STAT3. Este enfoque tiene la ventaja de que el inmunógeno no es un único antígeno sino toda la gama de antígenos expresados por las células tumorales presentados al organismo en el contexto de un microambiente inmuno-estimulatorio compuesto por múltiples citoquinas y quimioquinas pro-inflamatoria. Esto permite la generación de una respuesta inmune anti-tumoral eficaz para inhibir el desarrollo y crecimiento tumoral. Existen numerosas evidencias previas del uso de vacunas celulares contra tumores sólidos. En nuestro laboratorio, se desarrolló una inmunoterapia basada en la inoculación de células tumorales C4HD que tienen inhibida la expresión del receptor de factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-IR) (Schillaci et al., 2006). En este trabajo demostraron que la inmunización con células C4HD tratadas con un oligonucleótido antisentido para el IGF-IR indujo una inhibición significativa del crecimiento del tumor C4HD con respecto a los tumores de los grupos controles. En este caso, el efecto antitumoral resultó ser específico para el tumor C4HD, pues no se observó protección cuando se desafió con otros tumores mamarios singeneicos. A diferencia de lo observado en esta Tesis, la respuesta anti-tumoral observada en este trabajo dependía de los LT CD8⁺. Por otro lado, este tipo de estrategias ya han sido probadas en pacientes con cáncer, inclusive algunos ya han superado las pruebas de fase III y otras, como sipuleucel-T, ya han sido aprobadas por la FDA. Se han realizado ensayos clínicos con vacunas basadas en la administración de células tumorales autólogas o heterólogas junto con adyuvantes, como el caso de GVAX (Cell Genesys), que consiste en la modificación genética de cualquier célula tumoral, autóloga o alogénica, para expresar GM-CSF (Ercolini et al. 2005; Betty Li et al. 2009) o de Canvaxin (CancerVax) que se trata de una vacuna contra el melanoma basada en la inyección de células de tres líneas celulares de melanoma irradiadas junto a BCG (Hsueh et al. 1999; Morton et al. 1992). Sin embargo, hasta el momento existe una larga lista de ensayos clínicos de vacunas celulares sin obtener los resultados esperados. Los estudios preclínicos sugieren que las inmunoterapias tienen mayor probabilidad de éxito cuando la carga de la enfermedad es baja y los mecanismos de tolerancia inmune son menos pronunciados. Sin

embargo, los actuales ensayos clínicos de fase III de vacunas contra el melanoma que han resultado negativos fueron realizados en pacientes con melanoma avanzado. A pesar de estos resultados negativos de los estudios realizados con vacunas celulares, hoy en día se propone que cada plataforma individual de vacunación y su estrategia tiene que ser evaluada en su mérito científico propio.

En particular, nuestra propuesta es que frente a un paciente oncológico dado, se podría, luego de extirpar quirúrgicamente el tumor primario, cultivar in vitro a las células tumorales tratarlas con un inhibidor farmacológico de la activación de STAT3, irradiarlas y vacunar al paciente con sus propias células modificadas. De este modo se podría inhibir la formación de metástasis o la recurrencia tumoral, beneficiando a los pacientes con una inmunoterapia antitumoral específicamente diseñada. El esfuerzo de la inmunoterapia en gran medida, está basado en aumentar la inmunogenicidad tumoral. Por muchos motivos, que ya hemos enumerado y otros que se desconocen, el tumor escapa al ataque del sistema inmune o bien es susceptible en un principio, pero luego del primer reconocimiento y ataque se hace resistente, al seleccionarse aquellos clones capaces de no ser reconocidos. El mayor logro de la inmunoterapia será entender los mecanismos por los cuales los tumores se vuelven refractarios al sistema inmune, para modular luego dichos procesos y lograr que el tumor vuelva a ser reconocido y que el sistema inmune, en consecuencia, lo destruya. La óptima estrategia inmunoterapéutica consistiría en lograr tres cosas simultáneamente: proveer una señal que active al sistema inmune; eliminar los factores inhibitorios y evitar la propagación de los fenotipos inmuno-resistentes. Al respecto, los avances en el conocimiento del mecanismo de acción de las respuestas inmunitarias celulares antitumorales están permitiendo el desarrollo de nuevas generaciones de vacunas antitumorales. El paso clave ha sido el reconocimiento de la necesidad de que células profesionales presentadoras de antígeno sean las que presenten los antígenos tumorales al sistema inmunitario. Estos avances permitirán llevar a la práctica clínica potentes tratamientos de estimulación de la respuesta celular antitumoral para la prevención de recidivas o el tratamiento primario del cáncer. Para optimizar la respuesta terapéutica de los protocolos de fortalecimiento del reconocimiento antigénico, se está tendiendo a combinar a las vacunas contra el cáncer con otras terapias convencionales. Sin embargo, aún es necesario desarrollar un conocimiento más profundo para determinar la modalidad óptima del uso de las vacunas contra el cáncer en combinación, por ejemplo, con la quimioterapia, o la radiación. Otro punto en el que habrá que avanzar es en el uso de nuevos adyuvantes, los cuales son indispensables para quebrar la tolerancia de los antígenos propios del tumor y vencer a la inmuno-supresión inducida por el tumor. Con el correr de las investigaciones, hemos comenzado a disecar a la respuesta inmune antitumoral y debemos, sin embargo, seguir aprendiendo a correlacionar estos nuevos resultados con la clínica.

En conclusión, hemos demostrado, por primera vez, que es posible inhibir el crecimiento de un tumor mamario induciendo una respuesta inmune protectora al inyectar repetidas veces células tumorales que no pueden activar STAT3. Nuestros resultados, demostrando que la inmunización tiene un efecto antitumoral y la caracterización de las poblaciones celulares responsables de dicho efecto, tienen potencial aplicación en la clínica.

DISCUSIÓN (CAPÍTULO III)

En el presente trabajo proporcionamos la primera evidencia de que la inhibición de STAT3 induce un programa de senescencia en células tumorales. Observamos luego de la inactivación de STAT3 por transfección con STAT3Y705F o por inhibición con siRNA, varias características moleculares asociadas a senescencia, incluyendo una elevada actividad de SA-βgal, un aumento en la expresión de los inhibidores de ciclo celular p15INK4b y p16INK4a, y cambios característicos en la estructura de la cromatina, como el aumento de la metilación de la lisina 9 de la histona H3. Además, nuestros resultados demuestran que la senescencia de células C4HD requiere de la expresión de p16INK4a, ya que su inhibición en células que tienen inactivación de STAT3 disminuye la actividad SA-β-gal. Por otro lado, ya ha sido extensamente descripto el requerimiento de STAT3 para la proliferación de células de cáncer de mama (Garcia et al. 2001; Proietti et al. 2005). Interesantemente, la senescencia celular resultó un mecanismo importante en la inhibición de la proliferación de células de cáncer de mama C4HD luego de la inhibición del oncogén STAT3, ya que demostramos que la pérdida de la expresión de p16INK4a restaura la proliferación celular in vitro de células transfectadas con siRNA contra STAT3 o con STAT3Y705F. En base al requerimiento de la proteína p16INK4a para la inducción de senescencia y para la inhibición de la proliferación por inactivación de STAT3, podemos sugerir, que al menos en las células C4HD, la supresión de STAT3 activa un programa de senescencia celular a través de mecanismos similares a los observados para la inducción de senescencia por activación de un oncogén (Braig et al. 2005; Chen et al. 2005; Collado et al. 2005). De tal manera, sería interesante poder estudiar en el futuro, si los otros genes supresores de tumores, p53 y Rb, involucrados también en OIS, tienen algún rol en nuestro modelo de inducción de senescencia por inactivación de STAT3. En particular, este estudio sería de especial interés ya que STAT3 inhibe de manera directa la expresión de p53 mediante su unión al promotor de este gen y la represión de su transcripción (Niu et al. 2005). Se conoce, por lo tanto, que la inactivación de STAT3 puede permitir el restablecimiento de la función de p53 en aquellos tumores en los cuales no se encuentra mutada. Es por esto, que habría que evaluar si su

restablecimiento por la inhibición del factor de transcripción que reprime su expresión puede promover la inducción de senescencia.

Los resultados obtenidos en este trabajo son acordes a lo observado por el grupo del Dr. Felsher, que demostró por primera vez que la inactivación de un oncogén, en este caso MYC, en células de linfoma, osteosarcoma y en carcinomas hepatocelulares induce senescencia celular, conduciendo a una disminución del crecimiento tumoral (Wu et al. 2007). Estudios posteriores de este grupo demostraron que los LT CD4⁺ juegan un papel central en la regresión del tumor y en la inducción de senescencia luego de la inactivación de MYC. Las células CD4⁺ no son las únicas relevantes en este trabajo, ya que encontraron que otros efectores inmunes del huésped, como los macrófagos, las células NK, los mastocitos y las células B, pueden contribuir con la respuesta anti-tumoral. En efecto, en este trabajo proponen que es posible que las células T CD4⁺ estén mediando en parte la regresión del tumor mediante el reclutamiento de estas poblaciones efectoras. Esta función coordinadora de los LT CD4⁺ los convierte en un componente importante del mecanismo de regresión por la inactivación de oncogenes. Otra de las características interesantes de este trabajo, es la descripción de un fenotipo secretor caracterizado por la expresión de IFN-y, TNF- α y de IL-5, que se asemeja a lo observado en nuestro trabajo luego de la inactivación de STAT3 (Capitulo II). Por otro lado, también se sabe que la activación de STAT3 modula la expresión de MYC en la glándula mamaria, y que este hecho es fundamental para la transformación mediada por c-Src de estas células (Bowman et al. 2001). Con respecto a esto, en nuestro laboratorio se confirmó que STAT3 es requerida para la conocida expresión de MYC inducida por progestágenos en células de cáncer de mama (Rivas et al. 2012; Sutherland 1991). Todas estas evidencias, y sumado a nuestros resultados de que la vacuna de células tumorales que tienen inactivada la función de STAT3 induce una respuesta inmune anti-tumoral mediada por células TCD4⁺, avalan nuestras observaciones sobre la inducción de senescencia por inactivación de STAT3.

Recientemente se sugirió que la inactivación de un oncogén puede alterar el equilibrio de las vías pro- y antiapoptoticas permitiendo la inducción de apoptosis en tumores (Sharma et al. 2006). En particular, es ampliamente conocido que la inhibición de la activación de STAT3 conduce a la apoptosis de células tumorales en diversos modelos de cáncer, como por ejemplo,
en células cáncer de mama humano (Garcia et al. 2001), en mieloma (Catlett-Falcone et al. 1999) y en melanoma entre otros (Niu et al. 1999). En nuestro grupo hemos demostrado previamente que la inhibición de la señalización de STAT3 induce apoptosis en células C4HD (Proietti et al. 2005), pero, sin embargo, también encontramos que la inmunización con células C4HD apoptóticas por irradiación con UV no fue capaz de desencadenar una respuesta inmune anti-tumoral (Schillaci et al., 2006). En cambio en este trabajo hemos demostrado que las células C4HD y 4T1 que tienen inhibida la activación de STAT3 pueden activar senescencia celular. Por lo tanto, la inactivación de STAT3 puede resultar en la inducción de distintos programas celulares, que conducen desde la detención de la proliferación por senescencia hasta la muerte de la célula por apoptosis. Se describió para los tumores hematopoyéticos que la inactivación de MYC resulta en un arresto inicial de la proliferación, acompañado de diferenciación y senescencia, que conduce finalmente a una total eliminación por apoptosis (Felsher et al. 1999). Por otro lado, la activación de la quinasa del punto de control 2 (Chk2), que cumple un rol en la regulación del daño al DNA, resulta en la detención del ciclo celular por la inducción dual de senescencia y de apoptosis en células de cáncer humanas (Hela y DLD1). Sin embargo, hasta el momento no han sido dilucidados los mecanismos que favorecen la activación de un programa de apoptosis o de senescencia, pero se sabe que dependen del tipo celular, de la intensidad y de la duración de la señal, así como también de la naturaleza de los daños (d'Adda di Fagagna 2008). Por lo tanto, el destino celular depende de la combinación de numerosos factores intrínsecos y extrínsecos y es por esto que puede ser extremadamente variable, incluso dentro de un mismo tipo celular.

También es conocido que STAT3 tiene un rol en la inmortalización de células tumorales, mediante la inducción de la telomerasa humana (hTERT) (Konnikova et al., 2005), por lo que es razonable que su inactivación resulte en senescencia.

Hasta el momento, existen numerosos reportes que indican que la supresión de STAT3 tiene consecuencias específicas en diferentes tipos de tumores. Aquí, mostramos por primera vez que la inactivación de STAT3 en distintas líneas de cáncer de mama promueve la senescencia celular. Nuestros resultados suman nuevas evidencias a los obtenidos por del grupo del Dr. Felsher, y avalan la hipótesis de que la inducción de senescencia puede ser un mecanismo más de regresión tumoral por inhibición de un oncogén. Si bien sabemos que la inhibición del crecimiento tumoral por inactivación de un oncogén puede estar regulada por numerosos mecanismos intrínsecos de las células y por mecanismos dependientes del entorno celular, como la inhibición de la angiogénesis, en nuestro trabajo postulamos a la senescencia como un nuevo mecanismo intrínseco de las células tumorales gatillado por la inhibición de STAT3 en células de cáncer de mama.

Por otro lado, nosotros observamos que la inmunización con células tumorales que tienen inhibida la activación de STAT3 induce una respuesta inmune anti-tumoral. Como mencionamos previamente en la introducción del capítulo III, las células senescentes secretan factores inmunomoduladores que pueden activar la inmunovigilancia. Por medio de su fenotipo secretor asociado a senescencia, estas células pueden comunicarse con su entorno y, por lo tanto influir en el microambiente tisular, atrayendo por ejemplo células del sistema inmune. El laboratorio del Dr. Lowe demostró que la restauración de la expresión de p53 en un modelo de cáncer hepático de ratón induce senescencia celular y regresión tumoral. Esta eliminación de las células tumorales fue llevada a cabo por células del sistema inmune, como macrófagos, neutrófilos y células NK (Xue et al. 2007). También se ha explorado el rol de la senescencia en la eliminación de hepatocitos pre-cancerosos y se ha comprobado que la inducción de senescencia en estas células es importante para promover una inmunovigilancia de células T CD4⁺ eficiente y por consiguiente la supresión de la formación de tumores en el hígado. Si bien los datos experimentales hasta el momento se limitan al hígado, actualmente se ha comenzado a especular que la senescencia puede tener un rol general en la "fase de eliminación" de la inmunovigilancia de tumores, según lo postulado por Schreiber y Smyth (Schreiber et al., 2011). Esta etapa descripta en la teoría de la inmunoedición de tumores describe una fase temprana en donde los tumores incipientes se detectan mediante la interacción de células del sistema inmune innato y adaptativo (Schreiber et al. 2011). Por otro lado, estudios recientes sugieren que las respuestas inmunes contra las células senescentes no se limitan sólo al cáncer o células precancerosas, sino también a patologías no cancerosas. Se ha demostrado que durante el daño hepático crónico y el desarrollo de fibrosis, un tipo especial de células hepáticas, las células estrelladas, sufren senescencia y por lo tanto limitan la progresión de la

fibrosis. Curiosamente, la restricción de la progresión de la fibrosis fue dependiente de la eliminación de las células estrelladas senescentes por acción de las células NK (Krizhanovsky et al. 2008). En resumen, existe una creciente evidencia de que el control de las células senescentes determina la aparición del cáncer y progresión del cáncer, el daño tisular y el envejecimiento, y se ha demostrado que las respuestas inmunes contra las células senescentes tienen un papel importante en el cáncer así como también en patologías no cancerosas.

Recientemente se publicó un trabajo en donde desarrollaron una inmunoterapia basada en la preparación *in vitro* de células senescentes, por tratamiento con el inhibidor veliparb, que actúa inhibiendo la función de reparación de ADN de la polimerasa poli(ADP-ribosa), junto con radiación ionizante y en su posterior inyección en ratones portadores de melanoma. La inmunización con estas células tumorales senescentes, productoras de citoquinas inmunoestimuladores resultó eficaz en la inducción de una respuesta inmune anti-tumoral mediada por linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (Meng et al. 2012).

En base a estos antecedentes, nuestros resultados sugieren que la senescencia inducida por inhibición de STAT3 en las células de cáncer de mama de ratón 4T1 y C4HD puede estar involucrada en la respuesta inmune inmune anti-tumoral que observamos cuando inyectamos estas células en ratones a modo de una vacuna celular. Nosotros postulamos que: 1) las células tumorales senescentes secretan factores inmunomoduladores que pueden reclutar células del sistema inmune al sitio de inmunización y promover la activación y maduración de CDs; 2) las CDs maduras pueden interaccionar con LTh vírgenes en ganglios linfáticos permitiendo la inducción de una respuesta inmune celular y la generación de células T CD4⁺ de memoria; y 3) las células T CD4⁺ pueden promover mediante la secreción de citoquinas Th1 (IL-2 e IFN-γ) la activación de células NK lo que conduce a su citotoxicidad contra el tumor salvaje (Figura 58).



Figura 58. *Esquema representativo de la inducción de una respuesta anti-tumoral por inmunización con células tumorales que tienen inhibida la activación de STAT3.* Las células tumorales senescentes que sobre-expresan STATY705F, y por lo tanto tienen disminuida la activación de STAT3, secretan factores inmunomoduladores que pueden reclutar células del sistema inmune al sitio de inmunización y promover la activación y maduración de CDs. Las CDs maduras pueden interaccionar con LTh vírgenes permitiendo la inducción de una respuesta inmune celular y la generación de células T de memoria. En presencia de las células tumorales salvajes, las células T CD4⁺ pueden promover mediante la secreción de citoquinas Th1 (IL-2 e IFN-γ) la activación y su consecuente aumento de citotoxicidad de células NK.

En conclusión, hemos demostrado que la inhibición de la señalización de STAT3 en células de cáncer de mama resulta en un inmunógeno eficaz capaz de activar el sistema de inmunovigilancia e inhibir el crecimiento del cáncer de mama y sus metástasis. La inducción de senescencia celular después de la inactivación STAT3 es un nuevo hallazgo que abre nuevas estrategias para la investigación y aplicación clínica de las inmunoterapias en cáncer



Tabla A. Características clinicopatológicas de los pacientes

Característica	Nº pacientes	/
Número total de pacientes	39	
Edad (años) Media DE Rango	55 12.3 32-78	
Menopausia Premenopáusica Postmenopáusica No documentado	14 23 2	38 62
Tamaño del tumor T1 T2 T3 T4 No documentado	19 17 1 0 2	51 46 3 0
Estadio de compromiso de nódulos linfáticos Negativo Positivo No documentado	22 15 2	59 41
Metástasis a distancia M0 M1 No documentado Sitio de localización de las metástasis Hueso	37 1 1	97 3
Estadio clínico I II III IV	15 14 7 3	38 36 18 8
Grado tumoral 1 2 3 No documentado	3 19 14 3	8 53 39
Receptores hormonales RE+ RP+ ^a RE+ RP- RE- RP+ RE- RP- No documentado	27 4 0 4 4	78 11 0 11

^aRE: Receptor de estrógenos. RP: Receptor de Progesterona.

CALL CIENCIAS EXACTAS REFERENCIAS

FACULTAD

· DE ·

DAD

- Adris, Soraya et al. 2000. "Mice Vaccination with Interleukin 12-transduced Colon Cancer Cells Potentiates Rejection of Syngeneic Non-Organ-related Tumor Cells Mice Vaccination with Interleukin 12-transduced Colon Cancer Cells Potentiates." *Cancer Research* 6696–6703.
- Alimonti, Andrea et al. 2010. "A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis." *The Journal of Clinical Investigation* 120(3):681–693.
- Alonzi, Tonino et al. 2004. "Induced somatic inactivation of STAT3 in mice triggers the development of a fulminant form of enterocolitis." *Cytokine* 26(2):45–56.
- Alvarez, James V et al. 2005. "Identification of a Genetic Signature of Activated Signal Transducer and Activator of Transcription 3 in Human Tumors." *Cancer Research* 65(12):5054–5062.
- Anfossi, N. 2006. "Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class." *Immunity* 25:33–42.
- Apter, D, M Reinilä, and R. Vihko. 1989. "Some endocrine characteristics of early menarche, a risk factor for breast cancer, are preserved into adulthood." *Int J Cancer* 44(5):783–7.
- Apter, D, and R Vihko. 1983. "Early menarche, a risk factor for breast cancer, indicates early onset of ovulatory cycles." *J Clin Endocrinol Metab* 57(1):82–6.
- Arenberg, Douglas A et al. 1996. "Interferon-y-inducible Protein 10 (IP-10) Is an Angiostatic Factor That Inhibits Human Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) Tumorigenesis and Spontaneous Metastases." J. Exp-. Med 184:981–992.
- Arnold, A, and A Papanikolaou. 2005. "Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(18):4215–24.
- Aslakson, CJ, and F R Miller. 1992. "Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a Mouse Mammary Tumor." *Cancer Research* 52:1399–1405.
- Aziz, Moammir H et al. 2007. "Protein kinase Cepsilon interacts with signal transducers and activators of transcription 3 (Stat3), phosphorylates Stat3Ser727, and regulates its constitutive activation in prostate cancer." *Cancer research* 67(18):8828–38.
- Balañá, M E et al. 2001. "Activation of ErbB-2 via a hierarchical interaction between ErbB-2 and type I insulin-like growth factor receptor in mammary tumor cells." *Oncogene* 20(1):34–47.
- Ballaré, Cecilia et al. 2003. "Two Domains of the Progesterone Receptor Interact with the Estrogen Receptor and Are Required for Progesterone Activation of the c-Src/Erk Pathway in Mammalian Cells." *Molecular and Cellular Biology* 23(6):1994–2008.

- Barry, Michele, and R Chris Bleackley. 2002. "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death." *Nature reviews. Immunology* 2(6):401–9.
- Beato, M, S Chávez, and M Truss. 1996. "Transcriptional regulation by steroid hormones." *Steroids* 61(4):240–51.
- Béguelin, Wendy et al. 2010a. "Progesterone receptor induces ErbB-2 nuclear translocation to promote breast cancer growth via a novel transcriptional effect: ErbB-2 function as a coactivator of Stat3." *Molecular and cellular biology* 30(23):5456–72.
- Béguelin, Wendy et al. 2010b. "Progesterone receptor induces ErbB-2 nuclear translocation to promote breast cancer growth via a novel transcriptional effect: ErbB-2 function as a coactivator of Stat3." *Molecular and cellular biology* 30(23):5456–72.
- Ben-porath, Ittai, and Robert A Weinberg. 2005. "The signals and pathways activating cellular senescence." *The international Journal of Biochemistry and Cell Biology* 37:961–976.
- Beral, V. 2003. "Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study." *Lancet,* 362,:419–4.
- Bernstein, JL, R Lapinski, C Lynch, T Holford, and WD Thompson. 2002. "Factors influencing mortality among young women with second primary breast carcinoma." *Cancer.* 95(10):2051–8.
- Bernstein, L, and RK. Ross. 1993. "Endogenous hormones and breast cancer risk." *Epidemiol Rev.* 15(1):48–65.
- Bihl, Franck et al. 2010. "Primed antigen-specific CD4+ T cells are required for NK cell activation in vivo upon Leishmania major infection." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185(4):2174–81.
- Boonyaratanakornkit, V et al. 2001. "Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases." *Molecular cell* 8(2):269–80.
- Boonyaratanakornkit, Viroj et al. 2007. "The role of extranuclear signaling actions of progesterone receptor in mediating progesterone regulation of gene expression and the cell cycle." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 21(2):359–75.
- Bowman, T et al. 2001. "Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGFinduced mitogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(13):7319–24.

Bowman, T, and R Jove. 1999. "STAT Proteins and Cancer." *Cancer Control*. 6:615–619.

- Braig, Melanie et al. 2005. "Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development." 436(August).
- Broeke, Leon T Van Den, Emily Daschbach, K Elaine, Gerda Andringa, and Jay A Berzofsky. 2003. "Dendritic Cell-Induced Activation of Adaptive and Innate Antitumor Immunity."

- Bromberg, J. 2000. "Signal transducers and activators of transcription as regulators of growth, apoptosis and breast development." *Breast cancer research : BCR* 2(2):86–90.
- Bromberg, J, and J E Darnell. 2000. "The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function." *Oncogene* 19(21):2468–73.

Bromberg, J F et al. 1999. "Stat3 as an oncogene." Cell 98(3):295-303.

- Bromberg, J F, C M Horvath, D Besser, W W Lathem, and J E Darnell. 1998. "Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src." *Molecular and cellular biology* 18(5):2553–8.
- Bromberg, Jacqueline. 2002. "JAK-STAT signaling in human disease Stat proteins and oncogenesis." J. *Clin. Invest.* 109(9):1139–1142.
- Bryceson, Y.T., H. March, G Ljunggren, and E Long. 2006. "Activation, coactivation, and costimulation of resting human natur al killer cells." *Immunol Rev* 214::73–91.
- Buettner, Ralf, Linda B Mora, and Richard Jove. 2002. "Activated STAT Signaling in Human Tumors Provides Novel Molecular Targets for Therapeutic Intervention." *Clinical Cancer Research* 8(4):945–954.
- Burdelya, Lyudmila et al. 2005. "Stat3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects." *Journal of immunology* 174(7):3925–31.

Burnet, F M. 1957. "Cancer – a biological approach." Br Med J 1:841.

- Buser, Adam C et al. 2007. "Progesterone receptor repression of prolactin/signal transducer and activator of transcription 5-mediated transcription of the beta-casein gene in mammary epithelial cells." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 21(1):106–25.
- Caldenhoven, E et al. 1996. "STAT3beta, a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription." J Biol Chem 271:13221–7.
- Carnevale, Romina P et al. 2007. "Progestin effects on breast cancer cell proliferation, proteases activation, and in vivo development of metastatic phenotype all depend on progesterone receptor capacity to activate cytoplasmic signaling pathways." *Molecular endocrinology* 21(6):1335–58.
- Carter, L L, and R W Dutton. 1996. "Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets." *Current opinion in immunology* 8(3):336–42.
- Catlett-Falcone, R et al. 1999. "Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells." *Immunity* 10(1):105–15.
- Ceresa, Brian P, and Jeffrey E Pessin. 1996. "Insulin Stimulates the Serine Phosphorylation of the Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT3) Isoform." *Journal of Biological Chemistry* 271(21):12121–12124.

- Chen, Zhenbang et al. 2005. "Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Ptendeficient tumorigenesis." *Nature* 436:725–730.
- Chlebowski, RT, JA Kim, and NF. Col. 2003. "Estrogen deficiency symptom management in breast cancer survivors in the changing context of menopausal hormone therapy." *Semin Oncol.* 30(6):776–88.
- Chung, E. Uchida, T.C. Grammer, J. Blenis. 1997. "STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and independent pathways negatively modulates its tyrosine STAT3 Serine Phosphorylation by ERK-Dependent and -Independent Pathways Negatively Modulates Its Tyrosine Phosphorylation." *Molecular and cellular biology* 17(11):6508–6516.
- Cicatiello, Luigi et al. 2004. "Estrogens and Progesterone Promote Persistent CCND1 Gene Activation during G 1 by Inducing Transcriptional Derepression via c- Jun / c- Fos / Estrogen Receptor (Progesterone Receptor) Complex Assembly to a Distal Regulatory Element and Recruitment of Cy." *Molecular and cellular biology* 24:7260–7274.
- Clark-Lewis, I, J S Sanghera, and S L Pelech. 1991. "Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase." *Journal of Biological Chemistry* 266(23):15180–15184.
- Coca, S et al. 1997. "The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma." *Cancer* 79:2320–8.
- Collado, Manuel et al. 2005. "Tumour biology: senescence in premalignant tumours." *Nature* 436(7051):642.
- Collado, Manuel, Maria A Blasco, and Manuel Serrano. 2007. "Review Cellular Senescence in Cancer and Aging." *Cancer* 223–233.
- Collado, Manuel, and Manuel Serrano. 2010. "Senescence in tumours: evidence from mice and humans." *Nature reviews. Cancer* 10(1):51–7.
- Cooper, M. 2004. "NK cell and DC interactions." *Trends in Immunology* 25(1):47–52.
- Cooper, Megan A, Todd A Fehniger, and Michael A Caligiuri. 2001. "The biology of human natural killercell subsets." *Trends in Immunology* 22(11):633–640.
- Corthay, Alexandre et al. 2005. "Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells." Immunity 22(3):371–83.
- Cotarla, I et al. 2004. "Stat5a is tyrosine phosphorylated and nuclear localized in a high proportion of human breast cancers." Int J Cancer 108(5):665–71.

Coussens, LM, and Z Werb. 2002. "Inflammation and cancer." *Nature* 420:860–867.

d'Adda di Fagagna, F et al. 2003. "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." *Nature* 426(November):194–198.

- d'Adda di Fagagna, F. 2008. "Living on a break : cellular senescence as a DNA-damage response." *Nature reviews. Cancer* 8:512–522.
- Darnell, J E, I M Kerr, and G R Stark. 1994. "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." *Science (New York, N.Y.)* 264(5164):1415–21.
- David, Michael et al. 1995. "Requirement for MAP kinase (ERK2) activity in interferon alpha- and interferon beta-stimulated gene expression through STAT proteins." *Scienc* 269:1721–23.
- Dechow, Tobias N et al. 2004. "Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(29):10602–7.
- Decker, T, and P Kovarik. 2000. "Serine phosphorylation of STATs." Oncogene 19(21):2628–37.
- Dexter, Daniel L et al. 1978. "Heterogeneity of Tumor Cells from a Single Mouse Mammary Tumor." *Cancer Research* 38(10):3174–3181.
- Diaz, Nills et al. 2006. "Activation of Stat3 in Primary Tumors from High-Risk Breast Cancer Patients Is Associated with Elevated Levels of Activated Src and Survivin Expression." *Clinical Cancer Research* 12(1):20–28.
- Diefenbach, Andreas, Eric R Jensen, Amanda M Jamieson, and David H Raulet. 2001. "Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity." *letters to nature* 1604(1991):165–171.
- Dighe, Anand S, Elizabeth Richards, Lloyd J Old, and Robert D Schreiber. 1994. "Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFNγ receptors." *Immunity* 1(6):447–456.
- Dimri, G P et al. 1995. "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(20):9363–7.
- Dolled-filhart, Marisa, Robert L Camp, Diane P Kowalski, Bradley L Smith, and David L Rimm. 2003. "Tissue Microarray Analysis of Signal Transducers and Activators of Transcription 3 (Stat3) and Phospho-Stat3 (Tyr705) in Node-negative Breast Cancer Shows Nuclear Localization Is Associated with a Better Prognosis." *Clinical Cancer Research* 3:594–600.
- Dudley, Mark E et al. 2008. "Adoptive Cell Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Evaluation of Intensive Myeloablative Chemoradiation Preparative Regimens." *Journal of clinical oncology* 26(32):5233–5239.
- Dunn, Gavin P, Lloyd J Old, and Robert D Schreiber. 2004. "The three Es of cancer immunoediting." Annual review of immunology 22(4):329–60.
- Ehrlich, P., and Jetzigen. 1909. "Ueber den Geneeskd Stand der Karzinom-forschung." Ned Tijdschr Geneeskd 273:1 pp.

- Ercolini, Anne M et al. 2005. "Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response." *The Journal of experimental medicine* 201(10):1591–602.
- Von Euw, Erika M et al. 2008. "A phase I clinical study of vaccination of melanoma patients with dendritic cells loaded with allogeneic apoptotic/necrotic melanoma cells. Analysis of toxicity and immune response to the vaccine and of IL-10 -1082 promoter genotype as predictor of diseas." *Journal of translational medicine* 6:6.
- Ewen, Mark E, and Justin Lamb. 2004. "The activities of cyclin D1 that drive tumorigenesis." *Trends in molecular medicine* 10(4):158–62.
- Fainboim, L, and JR Geffner. 2005. *Introducción a la Inmunología Humana*. 5 edn. Editorial Médica Panamericana.
- Faivre, E, A Skildum, L Pierson-Mullany, and CA Lange. 2005. "Integration of progesteronereceptor mediated rapid signaling and nuclear actions in breast cancer cellmodels: role of mitogen-activated protein kinases and cell cycle regulators." *Steroids* 70:418–426.
- Faivre, Emily J, Andrea R Daniel, Christopher J Hillard, and Carol a Lange. 2008. "Progesterone receptor rapid signaling mediates serine 345 phosphorylation and tethering to specificity protein 1 transcription factors." *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 22(4):823–37.
- Faivre, Emily J, and Carol a Lange. 2007. "Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells." *Molecular and cellular biology* 27(2):466–80.
- Fehniger, Todd a et al. 2003. "CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity." *Blood* 101(8):3052–7.
- Felsher, Dean W. 2008. "Oncogene addiction versus oncogene amnesia: perhaps more than just a bad habit?" *Cancer research* 68(9):3081–6; discussion 3086.
- Felsher, Dean W, J Michael Bishop, and Division Hematology-oncology. 1999. "Reversible Tumorigenesis by MYC in Hematopoietic Lineages." *Molecular cell* 4:199–207.
- Floriddia, Elisa, Tuan Nguyen, and Simone Di Giovanni. 2011. "Chromatin Immunoprecipitation from Dorsal Root Ganglia Tissue following Axonal Injury." *Journal of visualized experiments : JoVE* (53):10–11.
- Freund, Adam, Arturo V. Orjalo1, Pierre-Yves Desprez, and Judith Campisi. 2010. "Inflammatory Networks during Cellular Senescence: Causes and Consequences." *Trends Mol Med.* 16(5):238–246.
- Fujiwara, Hiromi, and Masahiro Fukuzawa. 1984. "The role of tumor-specific LYT-1+2- T cells in eradicating tumor cells in vivo." *The Journal of Immunology* 133(3):1671–1676.

- Fukada, T et al. 1996. "Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis." *Immunity* 5(5):449–60.
- Gabrilovich, and Carbone DP. DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D. 1996. "Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells." *Nature Medicine* 2:1096–1103.
- Garcia, R et al. 2001. "Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells." *Oncogene* 20(20):2499–513.
- Garland, S.M. et al. 2007. "Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases." *The New England journal of medicine* 356(19):1928–43.
- Gee, Julia M.W., John F.R. Robertson, Ian O. Ellis, and Robert I. Nicholson. 2001. "PHOSPHORYLATION OF ERK1 / 2 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE IS ASSOCIATED WITH POOR RESPONSE TO ANTI-HORMONAL THERAPY AND." Int J Cancer 95:247–254.
- Giuriato, S, S Ryeom, and AC Fan. 2006. ". Sustained regression of tumors upon MYC inactivation requires p53 or thrombospondin-1 to reverse the angiogenic switch." *Proc Natl Acad Sci USA* 103:16266–71.
- Goh, K C, S J Haque, and B R Williams. 1999. "p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons." *The EMBO journal* 18(20):5601–8.
- Gotoh, A et al. 1996. "Steel factor induces serine phosphorylation of Stat3 in human growth factordependent myeloid cell lines." *Blood* 88(1):138–145.
- Grillo, Mary et al. 2006. "Validation of cyclin D1/CDK4 as an anticancer drug target in MCF-7 breast cancer cells: Effect of regulated overexpression of cyclin D1 and siRNA-mediated inhibition of endogenous cyclin D1 and CDK4 expression." *Breast cancer research and treatment* 95(2):185–94.
- Gritsko, T. et al. 2006. "Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells." *Clin. Cancer Res.* 12:11–19.
- Guermonprez, Pierre, Jenny Valladeau, Laurence Zitvogel, Clotilde Théry, and Sebastian Amigorena. 2002. "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." *Annual review of immunology* 20:621–67.
- Hagan, Christy R, Andrea R Daniel, Gwen E Dressing, and Carol a Lange. 2012. "Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity." *Molecular and cellular endocrinology* 357(1-2):43–9.
- Harley, C. B, B Futcher, and Greider C. 1990. "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." *Nature* 345:458–460.

Haslam, SZ, JR Osuch, AM Raafat, and LJ. Hofseth. 2002. "Postmenopausal hormone replacement therapy: effects on normal mammary gland in humans and in a mouse postmenopausal model." J Mammary Gland Biol Neoplasia 7(1):93–105.

Hayflick, L. 1965. "The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains." *Exp Cell Res* 37:614–36.

- Hazan-Halevy, Inbal et al. 2010. "STAT3 is constitutively phosphorylated on serine 727 residues, binds DNA, and activates transcription in CLL cells." *Blood* 115(14):2852–63.
- He, Xiao-Song et al. 2004. "T cell–dependent production of IFN-γ by NK cells in response to influenza A virus." *The Journal of Clinical Investigation* 114(12):1812–1819.
- Henderson, B E, and H S Feigelson. 2000. "Hormonal carcinogenesis." Carcinogenesis 21(3):427–33.
- Hinz, Sebastian et al. 2000. "Bcl-X L protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAILreceptor-mediated apoptosis." Oncogene 19:5477–5486.
- Hoeflich, Klaus P et al. 2006. "Oncogenic BRAF is required for tumor growth and maintenance in melanoma models." *Cancer research* 66(2):999–1006.
- Hoenicke, Lisa, and Lars Zender. 2012. "Immune surveillance of senescent cells--biological significance in cancer- and non-cancer pathologies." *Carcinogenesis* 33(6):1123–6.
- Hofseth, L J et al. 1999. "Hormone replacement therapy with estrogen or estrogen plus medroxyprogesterone acetate is associated with increased epithelial proliferation in the normal postmenopausal breast." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84(12):4559–65.
- Hopp, T. a. 2004. "Breast Cancer Patients with Progesterone Receptor PR-A-Rich Tumors Have Poorer Disease-Free Survival Rates." *Clinical Cancer Research* 10(8):2751–2760.
- Horowitz, Amir et al. 2010. "Cross-Talk between T Cells and NK Cells Generates Rapid Effector Responses to Plasmodium falciparum-Infected Erythrocytes." *The Journal of Immunology* 184(11):6043–6052.
- Hsiao, J-R et al. 2003. "Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is present in the majority of nasopharyngeal carcinoma and correlates with better prognosis." *British journal of cancer* 89(2):344–9.
- Hsieh, Fu-Chuan, Gong Cheng, and Jiayuh Lin. 2005. "Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human breast cancer." *Biochemical and biophysical research communications* 335(2):292–9.
- Hsueh, E C et al. 1999. "Active specific immunotherapy with polyvalent melanoma cell vaccine for patients with in-transit melanoma metastases." *Cancer* 85(10):2160–9.
- Huettner, Claudia S, Pu Zhang, Richard A Van Etten, and Daniel G Tenen. 2000. "Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR ABL1." *Nature genetics* 24:57–60.

- Hung, K et al. 1998. "The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response." *The Journal of Experimental Medicine* 188(12):2357–68.
- Ismail, Preeti M et al. 2003. "Progesterone involvement in breast development and tumorigenesis—as revealed by progesterone receptor 'knockout' and 'knockin' mouse models." *Steroids* 68(10-13):779–787.
- Jacobsen, Britta M, Jennifer K Richer, Stephanie a Schittone, and Kathryn B Horwitz. 2002. "New human breast cancer cells to study progesterone receptor isoform ratio effects and ligand-independent gene regulation." *The Journal of biological chemistry* 277(31):27793–800.
- Jain, Meenakshi et al. 2002. "Sustained Loss of a Neoplastic Phenotype by Brief Inactivation of MYC." Science 102:102–104.
- Jain, Zhang, Kee, Li, Cao. 1999. "Protein Kinase C δ Associates with and Phosphorylates Stat3 in an Interleukin-6-dependent Manner.pdf." *The Journal of biological chemistry* 274:24392–24400.
- Janeway, C. 2005. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 6th editio. Garland Sciences.
- Janeway, CA, and R Medzhitov. 2002. "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol 20:197–216.
- Kamijo, Takehiko et al. 1997. "Tumor Suppression at the Mouse INK4a Locus Mediated by the Alternative Reading Frame Product p19 ARF." *Cell* 91:649–659.
- Kang, Shijun et al. 2013. "A knockdown of Maml1 that results in melanoma cell senescence promotes an innate and adaptive immune response." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 62:183–190.
- Kang, Tae-Won et al. 2011. "Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development." *Nature* 479(7374):547–51.
- Kaplan, Mark H, Carla Daniel, Ulrike Schindler, and Michael J Grusby. 1998. "Stat Proteins Control Lymphocyte Proliferation by Regulating p27Kip1 Expression." *Molecular and Cellular Biology* 18(4):1996–2003.
- Kennedy, Richard, and Esteban Celis. 2008. "Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses." *Immunological reviews* 222:129–44.
- Kenter, Gemma G et al. 2009. "Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia." *The New England journal of medicine* 361(19):1838–47.
- Keydar, I, and L et al. Chen. 1979. "Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin." *Eur J Cancer* 15:659–70.
- Khong, Hung T, and Nicholas P Restifo. 2002. "Natural selection of tumor variants in the generation of ' tumor escape' phenotypes." *Nature immunology* 3(11):999–1005.

- King, R.J., L. William, and McGuire. 1993. "Memorial Symposium. Estrogen and progestin effects in human breast carcinogenesis." *Breast Cancer Res.Treat.* 27:3–15.
- Kiuchi, N et al. 1999. "STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene." *The Journal of Experimental Medicine* 189(1):63–73.
- Konnikova, Liza, Marina C Simeone, Matthew M Kruger, Maciej Kotecki, and Brent H Cochran. 2005. "Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in human cancer and primary cells." *Cancer research* 65(15):6516–20.
- Korn, Thomas, Estelle Bettelli, Mohamed Oukka, and Vijay K Kuchroo. 2009. "IL-17 and Th17 Cells." Annu. Rev. Immunol. 27:485–517.
- Kortylewski, Marcin et al. 2005. "Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity." *Nature Medicine* 11(12):1314–21.
- Kortylewski, Marcin et al. 2009. "In vivo delivery of siRNA to immune cells by conjugation to a TLR9 agonist enhances antitumor immune responses." *Nature Biotechnology* 27(10):925–32.
- Kortylewski, Marcin et al. 2010. "TLR agonist-Stat3 siRNA conjugaes: cell-specific gene silencing and enhance antitumor immune responses." *Nature Biotechnology* 27(10):925–932.
- Kotha, Anupama et al. 2006. "Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein." *Molecular cancer therapeutics* 5(3):621–9.
- Kottke, T., F. et al. 2011. "Broad antigenic coverage induced by vaccination with virus-based cDNA libraries cures established tumors." *Nat.Med.* 17:854–859.
- Kovarik, P, D Stoiber, M Novy, and T Decker. 1998. "Stat1 combines signals derived from IFN-gamma and LPS receptors during macrophage activation." *The EMBO journal* 17(13):3660–8.
- Krizhanovsky, Valery et al. 2008. "Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis." *Cell* 134:657–667.
- Krtolica, a, S Parrinello, S Lockett, P Y Desprez, and J Campisi. 2001. "Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(21):12072–7.
- Kuilman, Thomas, Chrysiis Michaloglou, Wolter J Mooi, and Daniel S Peeper. 2010. "The essence of senescence." *Genes & development* 24(22):2463–79.
- Kuroki, Mitsuyuki, and Joseph T. O'Flaherty. 1999. "neutrophils stimulated by chemotactic factors and cytokines." *Biochemical Journal* 696:691–695.

- Labriola, Leticia et al. 2003. "Heregulin Induces Transcriptional Activation of the Progesterone Receptor by a Mechanism That Requires Functional ErbB-2 and Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Breast Cancer Cells." 23(3):1095–1111.
- Lacreusette, Aline, Isabelle Barbieux, Jean-michel Nguyen, and Marie-christine Pandolfino. 2009. "Defective activations of STAT3 Ser727 and PKC isoforms lead to oncostatin M resistance in metastatic melanoma cells." *Journal of Pathology* 217(November 2008):665–676.
- Lanari, C., and A et al. Molinolo. 1986. "Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice." *Cancer Lett* 33:215–23.
- Lange, C a, T Shen, and K B Horwitz. 2000. "Phosphorylation of human progesterone receptors at serine-294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26S proteasome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(3):1032–7.
- Lange, C. A., and K Richer. 1998. "Convergence of progesterone and epidermal growth factor signaling in breast cancer. Potentiation of mitogen-activated protein kinase pathways." J Biol Chem 273(47):31308–16.
- Lange, Carol A, Jennifer K Richer, and Kathryn B Horwitz. 1999. "Hypothesis : Progesterone Primes Breast Cancer Cells for Cross-Talk with Proliferative or Antiproliferative Signals." *Molecular endocrinology* 13(6):829–836.
- Lange, Carol a. 2004. "Making Sense of Cross-Talk between Steroid Hormone Receptors and Intracellular Signaling Pathways: Who Will Have the Last Word?" *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 18(2):269–278.
- Lauritzsen, GF, and B Bogen. 1993. "The role of idiotype-specific, CD4+ T cells in tumor resistance against major histocompatibility complex class II molecule negative plasmacytoma cells." *Cell immunol* 148:177–188.
- Le, DT, DM Pardoll, and E Jaffee. 2011. "Cellular Vaccine Approaches." *Cancer Journal, The* 16(4):304–310.
- Lee, Heehyoung et al. 2009. "Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors." *Cancer cell* 15(4):283–93.
- Leonhardt, Susan a., Viroj Boonyaratanakornkit, and Dean P. Edwards. 2003. "Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms." *Steroids* 68(10-13):761–770.
- Leslie, Kenneth et al. 2006. "Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3." *Cancer research* 66(5):2544–52.
- Li, Betty et al. 2009. "Anti–Programmed Death-1 Synergizes with Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor–Secreting Tumor Cell Immunotherapy Providing Therapeutic Benefit to Mice with Established Tumors." *Clinical Cancer Research* 15(5):1623–1634.

- Li, Xiaotao et al. 2003. "Progesterone and Glucocorticoid Receptors Recruit Distinct Coactivator Complexes and Promote Distinct Patterns of Local Chromatin Modification." *Molecular and cellular biology* 23(11):3763–3773.
- Li, Yi, Hui Zeng, Ren-He Xu, Bei Liu, and Zihai Li. 2009. "Vaccination with human pluripotent stem cells generates a broad spectrum of immunological and clinical responses against colon cancer." *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27(12):3103–11.
- Li, Zhiguang et al. 2007. "Cross-talk between T cells and innate immune cells is crucial for IFN-gammadependent tumor rejection." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179(3):1568–76.
- Lim, C P, and X Cao. 1999. "Serine phosphorylation and negative regulation of Stat3 by JNK." *The Journal* of biological chemistry 274(43):31055–61.
- Ling, Xiaoyang, and Ralph B Arlinghaus. 2005. "Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice." *Cancer research* 65(7):2532–6.
- Liu, Lucy et al. 2011. "6-Bromoindirubin-3'-oxime inhibits JAK/STAT3 signaling and induces apoptosis of human melanoma cells." *Cancer research* 71(11):3972–9.
- Liu, Tongyun, and Thomas F Ogle. 2002. "Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Is Expressed in the Decidualized Mesometrium of Pregnancy and Associates with the Progesterone Receptor Through Protein-Protein Interactions." *Biology of Reproduction* 67(1):114–118.
- Lydon, J.P., L. Sivaraman, and O.M. Conneely. 2000. "A reappraisal of progesterone action in the mammary gland." *J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia* 5:325–338.
- Magnusson, C et al. 1999. "Breast-cancer risk following long-term oestrogen- and oestrogen-progestinreplacement therapy." Int J Cancer. 81(3):339–44.
- Mason, Douglas X et al. 2006. "Defined genetic events associated with the spontaneous in vitro transformation of EIA/Ras-expressing human IMR90 fibroblasts." *Carcinogenesis* 27(2):350–9.
- Maxmen, Amy. 2012. "The hard facts." Nature 485(7400):S50-1.
- Mcgeachy, Mandy J, and Daniel J Cua. 2008. "Review Th17 Cell Differentiation : The Long and Winding Road." 17(April).
- Mellman, Ira, Ralph M Steinman, and New Haven. 2001. "Dendritic Cells : Specialized and Regulated Antigen Minireview." 106:255–258.
- Meng, Yuru et al. 2012. "Radiation-inducible immunotherapy for cancer: senescent tumor cells as a cancer vaccine." *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 20(5):1046–55.
- Migliaccio, a et al. 1998. "Activation of the Src/p21ras/Erk pathway by progesterone receptor via crosstalk with estrogen receptor." *The EMBO journal* 17(7):2008–18.

- De Miguel, F, SO Lee, SA Onate, and AC Gao. 2003. "Stat3 enhances transactivation of steroid hormone receptors." *Nucl Recept* 1:3.
- Molavi, Ommoleila et al. 2008. "Synergistic antitumor effects of CpG oligodeoxynucleotide and STAT3 inhibitory agent JSI-124 in a mouse melanoma tumor model." *Immunology and cell biology* 86(6):506–14.
- Monjazeb, Arta M, Hui-Hua Hsiao, Gail D Sckisel, and William J Murphy. 2012. "The role of antigenspecific and non-specific immunotherapy in the treatment of cancer." *Journal of immunotoxicology* 9(3):248–58.
- Moore, M R, J L Conover, and K M Franks. 2000. "Progestin effects on long-term growth, death, and BclxL in breast cancer cells." *Biochemical and biophysical research communications* 277(3):650–4.
- Mora, Linda B et al. 2002. "Constitutive Activation of Stat3 in Human Prostate Tumors and Cell Lines : Direct Inhibition of Stat3 Signaling Induces Apoptosis of Prostate Cancer Cells." *Cancer research* 62:6659–6666.
- Moretta, Alessandro. 2002. "Natural killer cells and dendritic cells: redezvous in abused tissues." *Nature reviews. Immunology* 2:957–964.
- Morton, D L et al. 1992. "Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine." *Annals of surgery* 216(4):463–82.
- Mote, PA, Bartow S, Tran N, and Clarke CL. 2002. "Loss of co-ordinate expression of progesterone receptors A and B is an early event in breast carcinogenesis." *Breast Cancer Res Treat.* 72:163–72.
- Mulac-Jericevic, Biserka, John P Lydon, Francesco J DeMayo, and Orla M Conneely. 2003. "Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(17):9744–9.
- Müller-Hermelink, Nele et al. 2008. "TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis." *Cancer cell* 13(6):507–18.
- Muranski, Pawel, and Nicholas P Restifo. 2009. "Adoptive immunotherapy of cancer using CD4 + T cells." *Current opinion in immunology* 21:200–208.
- Musgrove, EA et al. 1993. "Growth factor, steroid, and steroid antagonist regulation of cyclin geneexpression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycleprogression." *Mol Cell Biol* 13:3577–3587.
- Musgrove, Elizabeth, Christine Lee, and Robert L Sutherland. 1991. "Progestins both stimulate and inhibit breast cancer cell cycle progression while increasing Progestins Both Stimulate and Inhibit Breast Cancer Cell Cycle Progression while Increasing Expression of Transforming Growth Factor alpha, Epidermal Growth recept." *Molecular and cellular biology* 11:5032–5043.

- Nagpal, Jatin K, Rajakishore Mishra, and Bibhu R Das. 2002. "Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis." *Cancer* 94(9):2393–400.
- Narita, Masashi et al. 2003. "Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence." *Cell* 113:703–716.
- Nefedova, Yulia, Pingyan Cheng, et al. 2005. "Activation of dendritic cells via inhibition of Jak2/STAT3 signaling." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175(7):4338–46.
- Nefedova, Yulia, Srinivas Nagaraj, et al. 2005. "Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway." *Cancer research* 65(20):9525–35.
- Ng, Julian, and Doreen Cantrell. 1997. "STAT3 Is a Serine Kinase Target in T Lymphocytes." *The Journal of biological chemistry* 272(39):24542–24549.
- Ni, J., M. Miller, A. Stojanovic, N. Garbi, and A. Cerwenka. 2012. "Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors." *Journal of Experimental Medicine*.
- Nishimura, T et al. 1999. "Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo." *The Journal of experimental medicine* 190(5):617–27.
- Nishimura, T et al. 2000. "The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology." *Cancer Chemother Pharmacol* 46:52–61.
- Niu, Guilian et al. 1999. "Gene Therapy with Dominant-negative Stat3 Suppresses Growth of the Murine Melanoma B16 Tumor in Vivo Advances in Brief Gene Therapy with Dominant-negative Stat3 Suppresses Growth of the Murine." *Cancer research* (59):5059–5063.
- Niu, Guilian et al. 2002. "Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth." Oncogene 21(46):7001–10.
- Niu, Guilian et al. 2005. "Role of Stat3 in Regulating p53 Expression and Function." *Molecular and cellular biology* 25(17):7432–7440.
- Niu, Guilian, Kenneth H Shain, and Mei Huang. 2001. "Overexpression of a Dominant-Negative Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Variant in Tumor Cells Leads to Production of SolubleFactors That Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest." *Cancer research* 61:3276–3280.
- O'Garra, A, and N Arai. 2000. "The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation." *Trends Cell Biol* 10:542–550.
- O'Neil, BH et al. 2011. "Phase II study of the mitogen-activated protein kinase 1/2 inhibitor selumetinib in patients with advanced hepatocellular carcinoma." *J.Clin.Oncol.* 29:2350–2356.

- Olayioye, M a, I Beuvink, K Horsch, J M Daly, and N E Hynes. 1999. "ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases." *The Journal of biological chemistry* 274(24):17209–18.
- Olkhanud, Purevdorj B et al. 2009. "Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells." *Cancer research* 69(14):5996–6004.
- Onishi, M et al. 1996. "Identification of an oncogenic form of the thrombopoietin receptor MPL using retrovirus-mediated gene transfer." *Blood* 88(4):1399–1406.
- Page, DL, IO Ellis, and CW Elston. 1995. "Histologic grading of breast cancer. Let's do it." *Am.J.Clin.Pathol.* 103:123–124.
- Pandis, N., and S et al. Heim. 1992. "Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer." *Genes Chromosomes Cancer* 5:14–20.
- Patel, SP, and KB Kim. 2012. "Selumetinib (AZD6244; ARRY-142886) in the treatment of metastatic melanoma." *Expert.Opin.Investig.Drugs* 21:531–539.
- Peggs, Karl S, Sergio A Quezada, Cynthia A Chambers, Alan J Korman, and James P Allison. 2009. "Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti – CTLA-4 antibodies." J. Exp. Med. 206(8):1717–1725.
- Pegram, H. J., D. M. Andrews, M. J. Smyth, P. K. Darcy, and M. H. Kershaw. 2011. "Activating and inhibitory receptors of natural killer cells." *Immunol. Cell Biol.* (89):216–224.
- Perez-Diez, Ainhoa et al. 2007. "CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells." *Blood* 109(12):5346–54.
- Pike, M C, and R K Ross. 2000. "Progestins and menopause: epidemiological studies of risks of endometrial and breast cancer." *Steroids* 65(10-11):659–64.
- Pike, M C, and D V Spicer. 2000. "Hormonal contraception and chemoprevention of female cancers." *Endocrine-related cancer* 7(2):73–83.
- Prat, A, and J Baselga. 2008. "The role of hormonal therapy in the management of hormonal receptorpositive breast cancer with co-expression of HER2." *Nat Clin Pract Oncol* 5:531–542.
- Proietti, Cecilia et al. 2005. "Progestins Induce Transcriptional Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (Stat3) via a Jak- and Src-Dependent Mechanism in Breast Cancer Cells." *Molecular and cellular biology* 25(12):4826–4840.
- Proietti, Cecilia J et al. 2009. "Activation of Stat3 by heregulin/ErbB-2 through the co-option of progesterone receptor signaling drives breast cancer growth." *Molecular and cellular biology* 29(5):1249–65.

- Proietti, Cecilia J et al. 2011. "Novel role of signal transducer and activator of transcription 3 as a progesterone receptor coactivator in breast cancer." *Steroids* 76(4):381–92.
- Qin, Haiyan R et al. 2008. "Activation of signal transducer and activator of transcription 3 through a phosphomimetic serine 727 promotes prostate tumorigenesis independent of tyrosine 705 phosphorylation." *Cancer research* 68(19):7736–41.
- Qiu, Ming, and Carol a. Lange. 2003. "MAP kinases couple multiple functions of human progesterone receptors: degradation, transcriptional synergy, and nuclear association." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 85(2-5):147–157.
- Quelle, D E et al. 1993. "Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts." *Genes & Development* 7(8):1559–1571.
- Rabbani, S. A., and A. P. Mazar.+. 2007. ". Evaluating distant metastases in breast cancer: from biology to outcomes." *Cancer Metastasis Rev* 26:663–674.
- Rabinovich, Gabriel a, Dmitry Gabrilovich, and Eduardo M Sotomayor. 2007. "Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells." *Annual review of immunology* 25:267–96.
- Rakhra, Kavya et al. 2010. "CD4 + T Cells Contribute to the Remodeling of the Microenvironment Required for Sustained Tumor Regression upon Oncogene Inactivation." *Cancer cell* 18:485–498.
- Real, Pedro J et al. 2002. "Resistance to chemotherapy via Stat3-dependent overexpression of Bcl-2 in metastatic breast cancer cells." *Oncogene* 21(50):7611–8.
- Ren, Zhiyong, and Timothy S Schaefer. 2002. "ErbB-2 activates Stat3 alpha in a Src- and JAK2-dependent manner." *The Journal of biological chemistry* 277(41):38486–93.
- Ribas, Antoni et al. 2005. "Antitumor Activity in Melanoma and Anti-Self Responses in a Phase I Trial With the Anti-Cytotoxic T Lymphocyte – Associated Antigen 4 Monoclonal." *Journal of clinical oncology* 23(35).
- Richer, J.K. et al. 1998. "Convergence of progesterone with growth factor and cytokine signaling in breast cancer. Progesterone receptors regulate signal transducers and activators of transcription expression and activity." *J Biol.Chem.* 273:31317–31326.
- Richer, Jennifer K et al. 2002. "Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells." *The Journal of biological chemistry* 277(7):5209–18.
- Rivas, Martin a et al. 2012. "Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progestin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development." *Breast cancer research : BCR* 14(3):R77.

Rowan, Brian G, and Bert W O Malley. 2000. "Progesterone receptor coactivators." *Steroids* 65:545–549.

- Salatino, M et al. 2006. "Progestin-induced caveolin-1 expression mediates breast cancer cell proliferation." Oncogene 25(59):7723–39.
- Salatino, Mariana et al. 2004. "Inhibition of in vivo breast cancer growth by antisense oligodeoxynucleotides to type I insulin-like growth factor receptor mRNA involves inactivation of ErbBs, PI-3K/Akt and p42/p44 MAPK signaling pathways but not modulation of progesterone receptor acti." *Oncogene* 23(30):5161–74.
- Salatino, Mariana et al. 2008. "Galectin-1 as a potential therapeutic target in autoimmune disorders and cancer." *Expert Opinion on Biological Therapy* 8:45–57.
- Sang, Hongxun et al. 2005. "Murine mammary adenocarcinoma cells transfected with p53 and/or Flt3L induce antitumor immune responses." *Cancer gene therapy* 12(4):427–37.
- Sartorius, Carol A et al. 1994. "New T47D Breast Cancer Cell Lines for the Independent Study of Progesterone B- and A-Receptors: Only Antiprogestin-occupied B-Receptors Are Switched to Transcriptional Agonists by cAMP." *Cancer Research* 54(14):3868–3877.
- Sasse, J et al. 1997. "Mutational analysis of acute-phase response factor / Stat3 activation and dimerization." *Molecular and cellular biology* 17(8):4677–4686.
- Sato, Eiichi et al. 2005. "Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:18538–18543.
- Sato, T et al. 2011. "Signal transducer and activator of transcription-3 and breast cancer prognosis." *Am.J.Cancer Res.* 1:347–355.
- Schillaci, Roxana, Mariana Salatino, Juliana Cassataro, Cecilia J Proietti, Guillermo H Giambartolomei, A Rivas, et al. 2006. "Immunization with Murine Breast Cancer Cells Treated with Antisense Oligodeoxynucleotides to Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor Induced an Antitumoral Effect Mediated by a CD8 Response Involving Fas/Fas Ligand Cytotoxic Pathway." 80(12).
- Schillaci, Roxana, Mariana Salatino, Juliana Cassataro, Cecilia J Proietti, Guillermo H Giambartolomei, Martín a Rivas, et al. 2006. "Immunization with murine breast cancer cells treated with antisense oligodeoxynucleotides to type I insulin-like growth factor receptor induced an antitumoral effect mediated by a CD8+ response involving Fas/Fas ligand cytotoxic pathway." Journal of immunology 176(6):3426–37.
- Schillaci, Roxana et al. 2012. "Clinical relevance of ErbB-2/HER2 nuclear expression in breast cancer." BMC cancer 12(1):74.
- Schmitt, Clemens A et al. 2002. "A Senescence Program Controlled by p53 and p16 INK4a Contributes to the Outcome of Cancer Therapy." *Cell* 109:335–346.
- Schreiber, Robert D, Lloyd J Old, and Mark J Smyth. 2011. "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." *Science* 331(6024):1565–70.

- Schuringa, J J, H Schepers, E Vellenga, and W Kruijer. 2001. "Ser727-dependent transcriptional activation by association of p300 with STAT3 upon IL-6 stimulation." *FEBS letters* 495(1-2):71–6.
- Scott, Andrew M, James P Allison, and Jedd D Wolchok. 2012. "Monoclonal antibodies in cancer therapy." *Cancer immunity* 12(May):14.
- Scuto, Anna et al. 2011. "STAT3 inhibition is a therapeutic strategy for ABC-like diffuse large B-cell lymphoma." *Cancer research* 71(9):3182–8.
- Serrano, Manuel, Athena W Lin, Mila E Mccurrach, David Beach, and Scott W Lowe. 1997. "Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16 INK4a." *Cell* 88:593–602.
- Shachaf, Catherine M, Andrew M Kopelman, and Constadina Arvanitis. 2004. "MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer." *Nature* 431:1112–1117.
- Shamma, Awad et al. 2009. "Article Rb Regulates DNA Damage Response and Cellular Senescence through E2F-Dependent Suppression of N-Ras Isoprenylation." *Cancer Cell* 15(4):255–269.
- Sharma, Sreenath V et al. 2006. "A common signaling cascade may underlie 'addiction' to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes." *Cancer cell* 10(5):425–35.
- Sheen-Chen, Shyr-Ming, Chao-Cheng Huang, Rei-Ping Tang, Fong-Fu Chou, and Hock-Liew Eng. 2008. "Prognostic Value of Signal Transducers and Activators of Transcription 3 in Breast Cancer Prognostic Value of Signal Transducers and Activators of Transcription 3 in Breast Cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17:2286–2290.
- Shen, Tianjie, Kathryn B Horwitz, and Carol A Lange. 2001. "Transcriptional Hyperactivity of Human Progesterone Receptors Is Coupled to Their Ligand-Dependent Down-Regulation by Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Phosphorylation of Serine 294." Molecular and cellular biology 21:6122–6131.
- Shen, Yuhong et al. 2004. "Essential Role of STAT3 in Postnatal Survival and Growth Revealed by Mice Lacking STAT3 Serine 727 Phosphorylation Essential Role of STAT3 in Postnatal Survival and Growth Revealed by Mice Lacking STAT3 Serine 727 Phosphorylation." *Molecular and cellular biology* 24:407–419.
- Shuai, K. 2000. "Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins." Oncogene 19(21):2638–44.
- Siddiquee, Khandaker et al. 2007. "Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(18):7391–6.
- Silva, C.M. 2004. "Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis." *Oncogene* 23:8017–8023.

- Silvennoinen, O., C. Schindler, J. Schlessinger, and D.E. Levy. 1993. "Ras-independent growth factor signaling by transcription factor tyrosine phosphorylation." *Science* 261:1736–1739.
- Singletary, SE et al. 2002. "Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer." J.Clin.Oncol. 20:3628–3636.
- Skildum, Andrew, Emily Faivre, and Carol A Lange. 2005. "Progesterone Receptors Induce Cell Cycle Progression via Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases." *Molecular Endocrinology* 19(2):327–339.
- Soerjomataram, Isabelle, Marieke W J Louwman, Jacques G Ribot, Jan a Roukema, and Jan Willem W Coebergh. 2008. "An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer." *Breast cancer research and treatment* 107(3):309–30.
- Sombroek, Claudia C et al. 2002. "Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation." *Journal of immunology* 168(9):4333–43.
- Soucek, Laura et al. 2008. "Modelling Myc inhibition as a cancer therapy." Nature 455(7213):679-83.
- Steinman, L. 2007. "A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage." *Nat Med* 13:139–145.
- Stoecklin, E, M Wissler, D Schaetzle, E Pfitzner, and B Groner. 1999. "Interactions in the transcriptional regulation exerted by Stat5 and by members of the steroid hormone receptor family." *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 69(1-6):195–204.
- Street, Shayna E A, Joseph A Trapani, Duncan Macgregor, and Mark J Smyth. 2002. "Suppression of Lymphoma and Epithelial Malignancies Effected by Interferon." J. Exp. Med. 196(1):129–134.
- Sutherland, RL, and EA Musgrove. 2004. "Cyclins and breast cancer." J Mammary Gland Biol Neoplasia 9:95–104.
- Sutherland, RL, OW Prall, CK Watts, and EA Musgrove. 1998. "Estrogen and progestin regulation of cell cycle progression." J Mammary Gland Biol Neoplasia 3:63–72.
- Taga, T, and T Kishimoto. 1997. "Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines." Annual review of immunology 15:797–819.
- Takahashi, Hidenobu et al. 2006. "FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes." *Clin. Cancer Res.* 12:3265–3271.
- Takaki, Rayna et al. 2005. "IL-21 enhances tumor rejection through a NKG2D-dependent mechanism." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) 175(4):2167–73.

- Takeda, K et al. 1999. "Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils." *Immunity* 10(1):39–49.
- Takeda, T et al. 1998. "Crosstalk between the interleukin-6 (IL-6)-JAK-STAT and the glucocorticoidnuclear receptor pathway: synergistic activation of IL-6 response element by IL-6 and glucocorticoid." *The Journal of endocrinology* 159(2):323–30.
- Thomas I. 1959. "Delayed hypersensitivity in health and disease. In cellular and humoral aspects of the hypersensitive states." (ed) Horber Harper 529.
- Trichopoulos, D, B MacMahon, and P Cole. 1972. "Menopause and breast cancer risk." J Natl Cancer Inst 48(3):605–13.
- Turkson, James et al. 1998. "Stat3 Activation by Src Induces Specific Gene Regulation and Is Required for Cell Transformation Stat3 Activation by Src Induces Specific Gene Regulation and Is Required for Cell Transformation." *Molecular and cellular biology* 18:2545–2552.
- Turkson, James et al. 1999. "Requirement for Ras / Rac1-Mediated p38 and c-Jun N-Terminal Kinase Signaling in Stat3 Transcriptional Activity Induced by the Src Oncoprotein Requirement for Ras / Rac1-Mediated p38 and c-Jun N-Terminal Kinase Signaling in Stat3 Transcriptional Activity." *Molecular and cellular biology* 19:7519–7528.
- Villegas, Francisco R et al. 2002. "Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer." *Lung Cancer* 35(1):23–28.
- Vultur, Adina et al. 2004. "Cell-to-cell adhesion modulates Stat3 activity in normal and breast carcinoma cells." *Oncogene* 23(15):2600–16.
- Wang, TC et al. 1994. "Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice." *Nature* 369:669–671.
- Wang, Tianhong et al. 2004. "Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells." *Nature medicine* 10(1):48–54.
- Watson, CJ. 2001. "Stat transcription factors in mammary gland development and tumorigenesis." J Mammary Gland Biol Neoplasia 6(11):115–27.
- Weaver, CT, LE Harrington, PR Mangan, M Gavrieli, and KM Murphy. 2006. "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." *Immunity* 24:677–688.
- Weber, Jeffrey S et al. 2008. "Phase I / II Study of Ipilimumab for Patients With Metastatic Melanoma." Journal of clinical oncology 26(36):5950–5956.
- Welte, Thomas et al. 2003. "STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(4):1879–84.

- Wen, Z, and J E Darnell. 1997. "Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3." *Nucleic acids research* 25(11):2062–7.
- Wen, Z, Z Zhong, and J E Darnell. 1995. "Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation." *Cell* 82(2):241–50.
- Wendel, Marco, Ioanna E Galani, Elisabeth Suri-Payer, and Adelheid Cerwenka. 2008. "Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands." *Cancer research* 68(20):8437–45.
- Wiesel, Melanie, and Annette Oxenius. 2012. "From crucial to negligible: Functional CD8+T-cell responses and their dependence on CD4+T-cell help." *European Journal of Immunology* 42(5):1080–1088.
- Wu, Chi-Hwa et al. 2007. "Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104(32):13028–33.
- Xue, Wen et al. 2007. "Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas." *Nature* 445(7128):656–60.
- Yamashita, H et al. 2006. "Stat5 expression predicts response to endocrine therapy and improves survival in estrogen receptor-positive breast cancer." *Endocrine-related cancer* 13:885–893.
- Yeh, Yao-Tsung et al. 2006. "STAT3 ser727 phosphorylation and its association with negative estrogen receptor status in breast infiltrating ductal carcinoma." *International journal of cancer. Journal international du cancer* 118(12):2943–7.
- Yokogami, K, S Wakisaka, J Avruch, and S a Reeves. 2000. "Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR." *Current biology : CB* 10(1):47–50.
- Yu, Hua, and Richard Jove. 2004. "The STATs of cancer--new molecular targets come of age." *Nature reviews. Cancer* 4(2):97–105.
- Yu, Hua, Marcin Kortylewski, and Drew Pardoll. 2007a. "Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment." *Nature reviews. Immunology* 7(1):41–51.
- Yu, Hua, Marcin Kortylewski, and Drew Pardoll. 2007b. "Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment." *Nature reviews. Immunology* 7(1):41–51.
- Yu, Q, Y Geng, and P Sicinski. 2001. "Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation." *Nature* 411:1017–1021.

- Yun, Un Jung, Sang Eun Park, Yong Sam Jo, Jungbin Kim, and Deug Y Shin. 2012. "DNA damage induces the IL-6/STAT3 signaling pathway, which has anti-senescence and growth-promoting functions in human tumors." *Cancer letters* 323(2):155–60.
- Zhang, Rugang et al. 2005. "Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA." *Developmental cell* 8(1):19–30.
- Zhang, Y, G Liu, and Z Dong. 2001. "MSK1 and JNKs mediate phosphorylation of STAT3 in UVA-irradiated mouse epidermal JB6 cells." *The Journal of biological chemistry* 276(45):42534–42.
- Zhang, Z, S Jones, J S Hagood, N L Fuentes, and G M Fuller. 1997. "STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling." *The Journal of biological chemistry* 272(49):30607–10.
- Zhu, Jiyue, Douglas Woods, Martin Mcmahon, and J Michael Bishop. 1998. "Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf." *Genes & Development* 2997–3007.
- Zou, Weiping. 2006. "Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy." *Nature reviews. Immunology* 6(4):295–307.