



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA

Senescencia e inmunoterapia por inactivación de Stat3 en cáncer

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

Lic. Mara De Martino

Directores de Tesis: Dra. Roxana Schillaci

Dr. Eduardo T. Cánepa

Consejero de estudios: Dra. Edith Kordon

Lugar de Trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental
(IBYME-CONICET)

Buenos Aires, Argentina

2019

Agradecimientos.....	1
Abreviaturas	4
Resumen	7
Abstract	9
Introducción	12
1. CÁNCER	12
1.1 CÁNCER DE MAMA.....	13
1.2. MELANOMA	14
1.3 CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER	15
2. INMUNIDAD TUMORAL	17
2.1 EFECTORES DE LA INMUNIDAD ANTITUMORAL.....	18
2.2 INMUNOTERAPIAS DIRIGIDAS CONTRA EL CÁNCER	25
3 SENESCENCIA CELULAR.....	31
3.1 TIPOS DE SENESCENCIA.....	32
3.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS SENESCENTES	34
3.3. INMUNOVIGILANCIA DE LAS CÉLULAS SENESCENTES	40
4. PROTEINAS TRANSDUCTORAS DE SEÑALES Y ACTIVADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN (STAT).....	42
4.1. SEÑALIZACIÓN DE STAT3 EN CÁNCER	45
4.2 STAT3 EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL.....	46
Hipótesis.....	52
Objetivo	53
Materiales y métodos	55
Líneas celulares.....	55
Animales	55
Tumor C4HD	56
Cultivos primarios de células epiteliales C4HD	56
Transfecciones con ARN de interferencia (siRNA)	57
Evaluación de la enzima β -galactosidasa (β -gal).....	58
<i>Ensayo de Western blot (WB)</i>	58
Inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	60
Colección de medios condicionados (MC)	61

Ensayos de proliferación por incorporación de timidina [³ H]	62
Ensayos de migración.....	62
Experimentos <i>in vivo</i>	63
Inmunización profiláctica contra el tumor C4HD	63
Inmunización terapéutica contra los tumores 4T1 y B16	63
Tratamiento con JSI-124	64
Evaluación de metástasis pulmonares	64
Análisis de poblaciones inmunes.....	64
Citometría de flujo.....	65
Estimulación de linfocitos T <i>in vitro</i>	66
Degranulación de células NK	67
ELISPOT	67
Arreglo de anticuerpos.....	68
ELISA.....	68
Proteómica	68
Preparación de las muestras.....	68
Digestión enzimática.....	69
Procesamiento de datos e identificación de proteínas.....	70
Análisis de datos del TCGA.....	71
Análisis estadístico	71
RESULTADOS	73
Resultados 1	74
1.1 La inhibición de la adicción a Stat3 <i>in vitro</i> induce senescencia celular	74
1.2 La inhibición de Stat3 <i>in vivo</i> induce senescencia en los tumores 4T1 y B16.....	80
Conclusiones parciales 1	83
Resultados 2	84
2.1 Los medios condicionados de células senescentes inducidas por silenciamiento de Stat3 tienen efecto inmunoestimulador <i>in vitro</i>	84
2.2 Los medios condicionados de células senescentes inducidas por el silenciamiento de Stat3 tienen efecto antitumoral <i>in vitro</i>	88
Conclusiones parciales 2	91
Resultados 3	92

3.1 El SASP derivado de células que tienen silenciado Stat3 es un adyuvante para una inmunoterapia celular profiláctica contra cáncer de mama ErbB2+.....	92
3.2 El SASP derivado de células que tienen silenciado Stat3 es un adyuvante para una inmunoterapia celular terapéutica contra cáncer de mama triple negativo	95
3.3 El SASP derivado de células que tienen silenciado Stat3 actúa en forma sinérgica con inhibidores de puntos de control inmunitario contra melanoma	100
Conclusiones parciales 3	109
Resultados 4	110
4.1 Caracterización de las citoquinas y quimioquinas que componen el SASP inducido por silenciamiento de Stat3	110
4.2 Caracterización del SASP inducido por inhibición de Stat3 mediante proteómica cuantitativa.....	117
Conclusiones parciales 4	118
Discusión y conclusiones	118
Anexo	118
Referencias bibliográficas	118

Gracias a mi directora, la Dra. Roxana Schillaci, por ser mucho más que una directora. Gracias por enseñarme y ayudarme tanto, dentro y fuera del laboratorio. Gracias al apoyo y la libertad que me brindaste todos estos años he cumplido sueños que creía inalcanzables. Gracias porque nunca me faltó nada y jamás recibí un no como respuesta, con vos no hay cosas imposibles. Gracias por la dedicación, el amor y la pasión que le pones a todo lo que haces, porque se transmite y contagia y hoy no me imagino haciendo otra cosa. Gracias por ser una excelente persona y directora.

Gracias a mi director, el Dr. Eduardo Cánepa, por su apoyo y ayuda desde un comienzo y por recibirme siempre con una sonrisa.

Gracias a mi consejera de estudios, la Dra. Edith Kordon, por estar siempre dispuesta a atender mis inquietudes.

Gracias a la Dra. Patricia Elizalde por la dedicación y el compromiso para dirigir su excelente grupo. Gracias Patricia por darme un lugar en tu laboratorio.

Gracias a la Universidad Nacional de La Plata y la Universidad de Buenos Aires por brindarme una educación y formación de excelencia.

Gracias al Instituto Nacional del Cáncer (INC), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), por el apoyo económico recibido durante esta Tesis. Gracias al INC, ANPCyT, CONICET, la Fundación Susan G. Komen for the Cure, al Instituto Henry Moore y a Roemmers por financiar la investigación que dio como resultado esta Tesis.

Gracias a todos los miembros y autoridades del IBYME, por generar un excelente lugar de trabajo y por ser mi segundo hogar durante tantos años.

Gracias al Dr. Eduardo Charreau, por el apoyo constante a nuestro laboratorio.

Gracias a nuestros colaboradores, cuyos aportes han sido fundamentales para este trabajo. Gracias al Dr. Elmer Fernández y al Lic. Darío Rocha, de la Universidad Católica de Córdoba, por sus análisis bioinformáticos y por estar siempre disponibles para responder nuestras dudas. Gracias al Dr. Luis Haro Durand por su colaboración con los ensayos con células

endoteliales. Gracias al Dr. Alfredo Molinolo por su apoyo constante a nuestro laboratorio.

Gracias a la Dra. Eliane Piaggio por recibirme en su laboratorio durante mi pasantía en el Instituto Curie en Francia. Gracias Eliane por la oportunidad que me diste de trabajar con vos y las excelentes personas que forman tu grupo de trabajo. Gracias por estar siempre disponible y seguir colaborando con nuestro trabajo.

Gracias a la Dra. Clothilde Théry por darme un espacio en su laboratorio y sus aportes y consejos al trabajo.

Gracias Mer por todo lo que haces e hiciste por mí. Gracias por escuchar, por entender y por tener siempre la palabra justa. Ha sido un placer conocerte dentro y fuera del laboratorio.

Gracias a absolutamente todos los miembros del IBYME, porque, muchas veces sin saberlo, han hecho posible la realización de esta tesis. Gracias a mi vecina y amiga Stefi por ser mi compañera de trasnoche y porque sos un persona increíble. Espero no olvidarme de nadie, pero gracias a Pau, Guille, Naty, Mati, Nico B., Cintia, Nico D., Eri, Marilú y Ceci por brindarme no solo su compañerismo, sino su amistad. Gracias a mi vecina y amiga Stefi por ser mi compañera de trasnoche y porque sos un persona increíble.

Gracias a los miembros actuales y pasados del laboratorio por su compañía y apoyo durante todos estos años. Gracias a Ceci, Rosalía, Sofi y Santi por hacer del laboratorio un lindo lugar de trabajo. Gracias Viole por todo, porque, como te digo siempre, no sé qué haríamos sin vos. Gracias a Lean y Fran por las horas compartidas dentro y fuera del laboratorio, por su apoyo al trabajo y los consejos personales y profesionales. Gracias Belín, porque para nosotros formas parte del laboratorio, por absolutamente todo, por la ayuda en el laboratorio, pero sobre todo gracias por tu amistad. Gracias Flor M. porque fue un placer haber estado pegadas por la cadera, como decís vos, durante todo el doctorado. Gracias por nunca ser ex miembro del laboratorio, porque seguís ayudándome y siempre estás para escuchar, aconsejar y dar una palabra de aliento como “todo va a estar bien”. Gracias Flor C. y Mau por ser mi cable a tierra, no hay palabras para describir lo que significaron para mí todos estos años. Gracias por ser increíbles personas, compañeros y amigos. Gracias Mau por ser “mi persona”.

Gracias a mis amigas de la facultad, Fla, Meli y Sole, porque a pesar de los años y las distancias, encontramos la forma de seguir juntas y cada vez que nos vemos es como si no hubiera pasado el tiempo. Gracias por todo lo que compartimos, salidas, mates, viajes, asados. Gracias por entender y estar siempre.

Gracias a Juli, Rachel y Emi, esos amigos que conoces en 5 minutos y ya sabes que son para toda la vida. Gracias por estar siempre presentes a pesar de la distancia.

Gracias a mis hermanas del alma, Bere, Flores e Iru. Gracias por los mil años de amistad, por estar siempre presentes y alegrarse o llorar conmigo en los momentos importantes de mi vida. Gracias por apoyarme y acompañarme en todas mis decisiones. Gracias por darme las sobrinas más lindas del mundo. Gracias Dani y Sol por entender y buscar la forma de mantener viva nuestra amistad. Gracias a mis amigos Mica, Flor M., Pablo (primoamigo), Lauti y Marco, por acompañarme y alegrarse por mis logros. Ustedes son mi familia que se elige.

Gracias a mi hermosa familia.

Gracias a mi papá y mi mamá, por guiarme, inspirarme y acompañarme en cada etapa de mi vida. Gracias por darme libertad a la hora de tomar decisiones. Gracias a Mau y Euge, por estar siempre presentes y por toda su ayuda. Pero sobre todo gracias a ustedes 4 por todo el amor y la felicidad que me dan cada vez que los veo. No podría haber hecho esta Tesis sin su compañía.

Gracias a Nahuel, el amor de mi vida, por acompañarme y crecer conmigo. Gracias por enseñarme a ser mejor persona, a ser paciente y a dar sin esperar nada a cambio. Gracias por ayudarme sin medida con todo, incluso en la escritura y en los experimentos de la Tesis. Somos un equipazo. Te amo, te admiro y te respeto muchísimo. Gracias por todo el camino juntos y vamos por más.

¡Muchas gracias a todos!

- ACK: del inglés ammonium-chloride-potassium (cloruro de amonio-potasio)
- ANOVA: del inglés, *Analysis of Variance* (Análisis de la varianza).
- Bcl-2: del inglés, *B-cell lymphoma 2* (Linfoma de células B 2).
- CAR: del inglés, *Chimeric antigen receptor* (Receptor de antígeno quimérico).
- CCL: del inglés, *CC chemokine ligands* (ligandos de quimioquinas CC).
- CD: del inglés, *Cluster of Differentiation* (Grupo de diferenciación).
- CDK: del inglés, *cyclin dependent kinase* (quinasas dependientes de ciclinas).
- CDKi: del inglés, *cyclin dependent kinase inhibitor* (inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas).
- cGAS: del inglés, *cyclic GMP-AMP synthase* (sintetasa de GMP–AMP cíclico).
- CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.
- CMSP: células mononucleares de sangre periférica.
- CPA: célula presentadora de antígeno.
- CPM: cuentas por minuto.
- CTLA-4: del inglés, *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos).
- CXCL: del inglés, *chemokine (CXC motif) ligand* (ligandos de quimioquinas con motivos CXC).
- DDIS: del inglés, DNA damage induced senescence (senescencia inducida por daño al ADN).
- DDR: del inglés, *DNA damage response* (respuesta de daño al ADN).
- DMEM/F12: del inglés, *Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12*
- EEM: error estándar de la media.
- ELISA: del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas).
- ELISPOT: del inglés, *enzyme-linked immunospot* (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos).
- FasL: del inglés, *Fas Ligand* (Ligando de Fas).
- FDA: del inglés, *US Food and Drug Administration* (Administración de alimentos y medicamentos).
- FOXP3: del inglés, *Forkhead box P3*.
- GM-CSF: del inglés, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos).
- h: hora/s.
- HMGB-1: del inglés, *High Mobility Group Box 1*.
- HUVEC: del inglés, human umbilical vein endothelial cells (células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano).
- IFN: Interferón.
- IL: interleuquina.
- IRF3: del inglés, *interferon regulatory factor 3* (factor regulador del interferón 3).

iTRAQ: del inglés, *isobaric tags for relative and absolute quantitation* (etiquetas isobáricas para cuantificación absoluta y relativa).

Jak: del inglés, *Janus kinase* (Janus quinasa).

LIF: del inglés, *leukemia inhibitor factor* (factor inhibidor de leucemia).

MAPKs: del inglés, *mitogen-activated protein kinases* (proteínas quinasas activadas por mitógenos).

MC: medio condicionado.

MDSC: del inglés, *myeloid derived suppressor cell* (célula supresora mieloide).

min: minuto/s.

MMP: del inglés, *matrix metalloproteinases* (metaloproteinasas de matriz).

MPA: del inglés, *medroxyprogesterone acetate* (acetato de medroxiprogesterona).

NCI: del inglés, National Cancer Institute (Instituto Nacional del Cáncer)

NF- κ B: del inglés, *nuclear factor κ B* (factor nuclear κ B).

NK: del inglés, *natural killer* (asesinas naturales).

NRG2D: del inglés, *Natural-killer group 2, member D* (receptor de asesinas naturales del grupo 2, miembro D).

n.s.: no significativo.

OCT: del inglés, *optimal cutting temperature compound* (compuesto de temperatura óptima de corte)

OIS: del inglés, *oncogene induced senescence* (senescencia inducida por oncogenes).

OIIS: del inglés, *oncogene inhibition induced senescence* (senescencia inducida por inhibición de oncogenes).

OVA: ovoalbúmina.

pb: pares de bases.

PBS: del inglés *phosphate buffered saline* (buffer fosfato salino).

PCR: del inglés, polimerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa).

PD-1: del inglés, *Programed Cell Death Protein 1* (Proteína de muerte celular programada 1).

PD-L1: del inglés, *PD-1 Ligand 1* (Ligando 1 de PD-1).

PIAS: del inglés, *protein inhibitor of activated Stat* (proteína inhibidora de Stats activadas).

RPMI: del inglés, *Roswell Park Memorial Institute medium*

SA- β -Gal: del inglés, *senescence associated β -galactosidase* (galactosidasa asociada a senescencia).

SAB: seroalbúmina bovina.

SASP: del inglés, *senescence associated secretory phenotype* (fenotipo secretor asociado 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.

siRNA: del inglés, *small interfering RNA* (RNA corto de interferencia).

SOCS: del inglés, *suppressor of cytokine signaling* (proteína supresora de la señalización de citoquinas).

Stat: del inglés, *signal transducer and activator of transcription* (transductor de señales y activador de la transcripción).

STING: del inglés, *stimulator of interferón genes* (estimulador de genes de IFN).

TCR: del inglés, *T-cell receptor* (Receptor de las células T).

TCGA: del inglés, *The Cancer Genome Atlas* (Atlas del Genoma del Cáncer).

TGF β : del inglés, *transforming growth factor β* (Factor de crecimiento transformante β).

Th: del inglés, *T helper* (T colaborador).

TNF α : del inglés, *Tumor Necrosis Factor α* (Factor de necrosis tumoral α).

Treg: T reguladores.

VEGF: del inglés, *Vascular-endotelial growth factor* (Factor de crecimiento vascular-endotelial).

WB: del inglés, *Western Blot*.

Senescencia e inmunoterapia por inactivación de Stat3 en cáncer

La proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción 3 (Stat3) se encuentra frecuentemente activada en diversos tipos de cánceres, incluyendo el de mama y melanoma, donde conduce la proliferación, supervivencia e invasión de las células tumorales y a la vez suprime la inmunidad antitumoral. En esta Tesis demostramos que el silenciamiento de Stat3 en células tumorales induce senescencia celular por un mecanismo poco descrito, denominado senescencia inducida por inactivación de oncogenes. Dicha senescencia ocurre solo en células tumorales murinas y humanas que poseen activación constitutiva de Stat3, indicando que son adictas a este oncogén. Una característica de las células senescentes es que, a pesar de que no proliferan, se encuentran metabólicamente activas y desarrollan un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP). En función de las características celulares, del inductor de senescencia y del microambiente, el SASP puede promover o suprimir el desarrollo de tumores. Observamos que el SASP, inducido por silenciamiento de Stat3 (SASP-siStat3), tiene la capacidad de modular la activación y diferenciación de linfocitos T, de inhibir la migración y proliferación de células tumorales y no poseer actividad angiogénica *in vitro*. Además, comprobamos que la administración del SASP-siStat3, junto con células tumorales irradiadas en ratones portadores de tumor, induce una respuesta inmune antitumoral contra cáncer de mama y melanoma. Asimismo, la administración simultánea de esta inmunoterapia con un anticuerpo dirigido al punto de control inmunológico PD-1, produce un efecto antitumoral sinérgico contra melanoma. El efecto sinérgico se debe a que la inmunoterapia basada en el SASP-siStat3 activa linfocitos T CD4⁺ y células NK, mientras que el anticuerpo anti-PD-1 activa linfocitos T CD8⁺. La caracterización del SASP-siStat3, mediante arreglos de anticuerpos y proteómica cuantitativa, reveló que su composición difiere del SASP asociado a otros tipos de senescencia que suelen tener efector protumorales. Además, identificamos que la quimioquina CXC 10 (CXCL10), los ligandos de quimioquinas 2 y 5 (CCL2 y CCL5) y la interleuquina 15 (IL-15) son mediadores importantes de la actividad

inmunoestimuladora del SASP-siStat3. En esta Tesis, nos valimos del efecto paracrino que se produce por la senescencia inducida por inhibición de Stat3 para promover una respuesta inmune antitumoral y diseñar una inmunoterapia. Nuestros resultados resaltan la importancia de clasificar a los tumores de acuerdo a sus niveles de activación de Stat3, puesto que dichos pacientes podrían beneficiarse con una terapia dirigida a Stat3 junto con quimio/radioterapia o inhibidores de puntos de control inmunológicos.

Palabras clave: Stat3, senescencia, inmunoterapia.

Senescence and immunotherapy mediated by Stat3 inactivation in cancer

Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) is a signaling convergence node of multiple oncogenic pathways and is frequently activated in various types of cancers, including breast cancer and melanoma. Persistent activation of Stat3 leads to proliferation, survival and invasion of tumor cells, while suppressing the antitumor immunity. In this thesis we demonstrated that blockade of Stat3 induces cellular senescence by a mechanism called senescence induced by oncogene inactivation. Senescence induction occurs only in murine and human tumor cells that exhibit constitutive activation of Stat3, indicating that they are addicted to this oncogene. Depending on the characteristic of cell type, senescence-induced insult and microenvironment, the SASP can either promote or suppress the development of tumors. We observed that the SASP induced by Stat3 silencing (SASP-siStat3), has the ability to modulate the activation and differentiation of T lymphocytes, to inhibit the migration and proliferation of tumor cells and to not promote angiogenesis *in vitro*. Administration of SASP-siStat3 together with irradiated cells in tumor-bearing mice induces an anti-tumor immune response against breast cancer and melanoma. In addition, simultaneous administration of this immunotherapy with an antibody against the immune checkpoint, PD-1, produces a synergistic antitumor effect against melanoma. The synergistic effect is due to the fact that the immunotherapy based on SASP-siStat3 activates CD4⁺ T lymphocytes and NK cells, while the anti-PD-1 antibody activates CD8⁺ T lymphocytes. The characterization of SASP-siStat3 by protein antibody arrays and quantitative proteomics revealed that its composition differs from SASP associated with other types of senescence that usually promote tumorigenesis. In addition, we identified that C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10), C-C Motif Chemokine Ligand 2 and 5 (CCL2 and CCL5) and interleukin 15 (IL-15) are important mediators of the immunostimulatory activity of SASP-siStat3. In this thesis, we take advantage of the paracrine effect emerged upon senescence induced by Stat3 inhibition, to promote an antitumor immune response and design an immunotherapy. Our findings highlight the potential benefit of patient`s

stratification according to tumor Stat3 activation, to selectively undergo a Stat3-blocking protocol along with chemo/radiotherapy or immune checkpoint inhibitor treatment.

Key words: Stat3, senescence, immunotherapy.

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

Las enfermedades neoplásicas (de neoplasia: crecimiento nuevo no controlado de tejido) son un conjunto de patologías que poseen características muy diferentes entre sí, mostrando una dinámica y agresividad variada de acuerdo al origen histológico de cada tipo de cáncer y a cada individuo. Sin embargo, todos los tipos de cánceres tienen una característica común: células propias del organismo pierden el control de los mecanismos que regulan la división celular y por lo tanto proliferan excesivamente y pueden invadir otros tejidos. Esta división celular sin control puede formar masas sólidas llamadas tumores. Adicionalmente, las células tumorales pueden desprenderse del tumor original o primario, y formar tumores secundarios en nuevos tejidos, lo cual se conoce como metástasis, siendo ésta la principal causa de muerte en pacientes con cáncer (National Cancer Institute, USA, <https://www.cancer.gov/>; Organización Mundial de la Salud, <http://www.who.int/es/>)

La genética de un individuo puede predisponer para ciertos tipos de cánceres; sin embargo, es la interacción entre el genoma y factores ambientales lo que finalmente puede llevar a una célula a transformarse en cancerígena. Finalmente la manifestación del cáncer dependerá además de la interacción de las células tumorales con el sistema inmune del individuo. Existen más de 100 tipos de cánceres, cada uno con características muy diferentes entre sí. Usualmente se clasifican en base al órgano, tejido o célula a partir del cual se han originado. Los carcinomas son el tipo de cáncer maligno más común y se origina en células epiteliales, apareciendo en órganos tales como mama, colon y pulmón. Los sarcomas se originan en huesos y tejidos blandos como músculo y grasa, como así también en vasos sanguíneos y linfáticos. Los melanomas surgen en la piel a partir de los melanocitos o en otros tejidos pigmentados como en los ojos. Entre los tipos de cáncer malignos que no forman tumores sólidos se encuentran las leucemias, en las cuales las células cancerosas son leucocitos generados en médula ósea, los linfomas, que comienzan en linfocitos T o B, y el mieloma múltiple, en el cual las células cancerígenas son células plasmáticas que suelen localizarse en los huesos (National Cancer Institute, USA. <https://www.cancer.gov/>).

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. La Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta. En nuestro país el cáncer de mama es el de mayor incidencia, con 18.700 nuevos casos al año (que corresponden a un 18% del total de cánceres y 36% del total en mujeres), seguido del cáncer colorectal, de pulmón y próstata, siendo este último el de mayor incidencia en hombres (20,4% del total). En cuanto a la mortalidad, los tumores registran el 20% del total de defunciones que se producen por año, siendo el cáncer de pulmón el de mayor índice de mortalidad en hombres y el cáncer de mama en mujeres (GLOBOCAN, 2012 <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>; Instituto Nacional del Cáncer, Argentina <http://msal.gov.ar/inc/>). En particular, en esta Tesis nos centramos en el estudio del cáncer de mama y melanoma, que se describen con detalle a continuación.

1.1 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, Argentina, <http://msal.gov.ar/inc/>). Por su parte, el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (NCI, del inglés *National Cancer Institute*) estima que a una de cada ocho mujeres que viva hasta los 85 años se le diagnosticará cáncer de mama durante su vida.

El diagnóstico del cáncer de mama se lleva a cabo por estudios histopatológicos que incluyen la determinación en la biopsia del tumor del paciente de los receptores de estrógeno y progesterona y la sobreexpresión del receptor tirosina quinasa ErbB2/HER2 en la membrana de las células tumorales por inmunohistoquímica. Eventualmente también se realiza la determinación de la amplificación génica del *her2* por hibridización *in situ* con fluorescencia o con cromógenos. También los cánceres se clasifican en

estadios clínicos de I a IV teniendo en cuenta el tamaño tumoral, compromiso ganglionar y metástasis a distancia (National Cancer Institute, USA. <https://www.cancer.gov/>). 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 histopatológico y el estadio clínico, se siguen distintos tratamientos como cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal o terapias dirigidas contra blancos específicos.

Los tumores con sobreexpresión/amplificación del ErbB-2, llamados ErbB-2⁺, afectan al 15-20% de los pacientes con cáncer de mama y son tratados con trastuzumab, anticuerpo monoclonal anti ErbB-2, como primera línea junto con quimioterapia. Sin embargo, hasta el 42% de los pacientes tratados con trastuzumab en neoadyuvancia y el 27% de los pacientes tratados con trastuzumab en adyuvancia experimentan progresión de la enfermedad (Gianni et al., 2014; Perez et al., 2014). El otro tipo de cáncer de mama con baja sobrevida se conoce como cáncer de mama triple negativo y refiere a un subgrupo de tumores (15-20%) que no expresa niveles clínicamente significativos de receptores de estrógeno y progesterona, y carecen de sobreexpresión/amplificación del ErbB-2. Comparado con otros tipos de cánceres de mama, el cáncer de mama triple negativo afecta a mujeres más jóvenes, tiene peor pronóstico (sobrevida libre de enfermedad de 40-60% a 5 años) y el tratamiento se ve limitado a quimioterapia (Maxmen, 2012). Particularmente, los subtipos de cáncer de mama ErbB2⁺ y triple negativo, tienen un peor pronóstico en comparación con los subtipos que expresan recetores hormonales, llamados luminal A y B (Perou et al., 2000; Wallden et al., 2015). Por eso es importante conocer los mecanismos que promueven la proliferación tumoral de estos subtipos más agresivos, e investigar terapias innovadoras para poder ofrecer alternativas terapéuticas a los pacientes afectados con estos tipos de tumores.

1.2. MELANOMA

El melanoma es un tipo de cáncer de piel muy agresivo del cual se reportan alrededor de 200.000 nuevos casos al año en el mundo y alrededor

de 46.000 muertes. El 85% de los casos se reportan en países desarrollados, donde el melanoma está en el 6º lugar de los cánceres más frecuentemente diagnosticados (Erdmann et al., 2013). La remoción quirúrgica del melanoma temprano lleva a altas tasas de cura, mientras que los melanomas avanzados tienen un comportamiento muy agresivo con presencia de metástasis y con resistencia intrínseca a quimioterapia. La supervivencia a 5 años de los estadios III y IV rondan entre 10-50%. Sin embargo existen tratamientos dirigidos al genotipo que presenta el melanoma, que resultan en una respuesta parcial. Aproximadamente el 50% de los melanomas tienen mutaciones activadoras de BRAF que producen la activación constitutiva y sostenida de la vía de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK, del inglés *mitogen-activated protein kinases*) y promueven la supervivencia y proliferación de las células tumorales (Ascierto et al., 2012; Hall & Kudchadkar, 2014). Mientras que la inhibición selectiva de esta vía ofrece un enfoque de medicina de precisión para tratar el melanoma, la introducción de la inmunoterapia ha mejorado drásticamente la supervivencia de estos pacientes, independientemente del estado de BRAF. El tratamiento con inhibidores del punto de control inmunitario (descritos en detalle más adelante en esta Tesis) mejora el resultado clínico en pacientes con melanoma avanzado, pero una fracción muy baja de los pacientes se benefician con dicha terapia (Sharma et al., 2017). Consecuentemente, tanto la búsqueda de biomarcadores que identifican con precisión a los pacientes que pueden beneficiarse de la inmunoterapia como los enfoques para aumentar la eficacia de la misma siguen siendo áreas importantes de investigación.

1.3 CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER

A pesar de que los distintos tipos de cáncer son muy diferentes entre sí, existen ciertas características de las células tumorales que suelen ser comunes a todos los tipos (Hanahan & Weinberg, 2011). En la Figura 1, se representan las 10 características del cáncer (*hallmarks of cancer*) acordadas en el año 2011. Probablemente la más conocida de ellas es la **señalización sostenida de la proliferación** (Hanahan & Weinberg, 2011). En las células tumorales los mecanismos moleculares que controlan la proliferación celular se encuentran desregulados. Para proliferar de forma exacerbada las células tumorales deben

ser capaces de promover la **evasión de supresores de crecimiento**. Estos mecanismos dependen de los “genes supresores de tumores”, como por ejemplo el gen que codifica a la proteína TP53, el cual es el gen más frecuentemente mutado en cáncer. Por otro lado, las células tumorales pueden ser muy **resistentes a la muerte celular** debido al incremento de la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 (Hanahan & Weinberg, 2011). Asimismo, un alto número de divisiones celulares puede llevar a un acortamiento crítico de sus telómeros, lo cual resulta en la activación de la maquinaria de reparación de ADN y el arresto del ciclo celular. Sin embargo, en las células tumorales una elevada expresión de la enzima telomerasa les permite mantener la longitud de los telómeros y así asegurar su **inmortalidad replicativa** (Blasco, 2005). Además de adquirir todas estas características distintivas que les permiten proliferar indefinidamente, las células cancerígenas promueven la **inducción de angiogénesis**, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos para irrigar y nutrir al tejido tumoral. Las células tumorales también suelen **reprogramar su metabolismo energético** para poder adaptarse a las condiciones que exigentes que se generan en el microambiente tumoral, centrándose en la glicólisis por sobre la fosforilación oxidativa. Por último, como se mencionó anteriormente, los tumores malignos son capaces de **invadir y metastatizar** otros tejidos. Para ello, las células tumorales pierden sus uniones adherentes y producen enzimas que degradan la matriz extracelular, lo cual les permite abandonar el tumor primario e ingresar al torrente sanguíneo o a los vasos linfáticos. Todas estas características clásicas del cáncer son adquiridas a través de **inestabilidad genómica y mutaciones**, que permiten su dominancia en el tejido de origen. Por otro lado, los tumores también pueden producir **inflamación promovida por el tumor**, que favorece el proceso de tumorigénesis (Grivennikov et al., 2010). Asimismo, los tumores adquieren ventajas que les permiten **evadir el ataque del sistema inmune**, escapando a su destrucción y creciendo hasta el punto de resultar perjudiciales para el paciente (Schreiber et al., 2011). A continuación, describiremos en mayor detalle la interacción entre el tumor y el sistema inmune, para entender este proceso.



Figura 1. Características del cáncer (*Hallmarks of cancer*). Hanahan y Weinberg sugieren que la mayoría de los tumores han adquirido el mismo conjunto de capacidades funcionales durante su desarrollo, aunque a través de distintas estrategias. Adaptado de Hanahan & Weinberg, Cell 2011.

2. INMUNIDAD TUMORAL

Como una breve introducción, se considera clásicamente que el sistema inmune está compuesto por los sistemas innato y adaptativo, aunque esto es una simplificación, ya que ambos tienen funciones superpuestas y están íntimamente relacionados. El sistema inmune innato incluye a las células dendríticas, células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killer*), macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos. Las células inmunes innatas no requieren estimulación previa por antígenos y actúan como primera línea de defensa contra antígenos extraños. El sistema inmune adaptativo incluye a los linfocitos B, linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺ y requiere la presentación de antígenos por parte de las células presentadoras de antígeno (CPA) para su activación. El sistema inmunitario adaptativo genera linfocitos T y B específicos de antígeno.

Para explicar la interacción entre las células tumorales y el sistema inmune, se ha desarrollado una teoría que se denomina “inmunoección del cáncer” (Dunn et al., 2004). Un experimento clave demostró que tumores

inducidos en ratones inmunodeficientes eran más inmunogénicos que aquellos generados en ratones inmunocompetentes, indicando que los animales que poseían un sistema inmune intacto eliminaban aquellos clones de células tumorales altamente antigénicos (Shankaran et al., 2001). La teoría postula tres etapas diferentes de la respuesta inmune contra los tumores: eliminación, equilibrio y escape. Durante la etapa de **eliminación** el sistema inmune se encarga de detectar focos de células tumorales y destruirlos a través de mecanismos que incluyen a la inmunidad innata y adaptativa. Algunas variantes de células tumorales que han sobrevivido a la eliminación pueden entrar en la etapa de **equilibrio**. En esta fase la inmunidad adaptativa y el foco neoplásico entran en un balance dinámico que puede durar años, en el cual la respuesta inmune contiene a las células tumorales pero sin lograr erradicarlas (Schreiber et al., 2011). La presión selectiva a la que son sometidas las células cancerígenas puede también favorecer la generación de mutantes que de alguna forma son capaces de evadir el reconocimiento y la destrucción por parte del sistema inmune. En este caso el foco neoplásico avanza a la tercera etapa conocida como **escape**. En esta fase, las células cancerígenas que han logrado evadir al sistema inmune emergen como un tumor detectable y en crecimiento progresivo. El escape puede ocurrir a través de diferentes mecanismos que en general involucran la pérdida de inmunogenicidad por parte de las células cancerígenas y/o la generación de un microambiente inmunosupresor (Schreiber et al., 2011).

2.1 EFECTORES DE LA INMUNIDAD ANTITUMORAL

Células de la inmunidad innata

Uno de los mecanismos efectores antitumorales más efectivos de la respuesta inmune innata es la activación de las células NK. Estas células inducen la muerte de las células blanco por apoptosis mediante dos tipos de mecanismos. En el primero, las células NK 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 accede al citosol de la célula blanco y activa al sistema de caspasas que induce la muerte por apoptosis (Barry & Bleackley, 2002). CD107a es una molécula asociada a gránulos de granzimas y perforinas que queda expuesta en la superficie cuando estos son liberados y se utiliza como un marcador de degranulación (Anfossi et al., 2006). 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 NK 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 conduce a la apoptosis de la célula blanco. Por otro lado, las células NK pueden lisar células tumorales o células infectadas con virus que no expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I (Cooper et al., 2001). Para identificar a la célula blanco, las células NK poseen diferentes tipos de receptores con función de reconocimiento de moléculas en las células blanco y en consecuencia se activa la maquinaria citolítica y/o secretora de estas células. A su vez, existe otro tipo de receptores en las células NK 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. 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 inmunoregulatorio, ya que promueven la activación de células dendríticas y su producción de citoquinas proinflamatorias, lo que en definitiva estimula respuestas de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Cooper et al., 2004; Moretta, 2002; Newman & Riley, 2007; Ziblat et al., 2017). 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 antitumoral y destruir células transformadas.

Las células innatas como los macrófagos y neutrófilos pueden poseer tanto funciones protumorales como antitumorales. Bajo la influencia de IFN γ y TNF α los macrófagos y neutrófilos pueden adoptar los fenotipos antitumorales M1 y N1, respectivamente (Biswas & Mantovani, 2010; Grivennikov et al., 2010). Los macrófagos M1 pueden eliminar células tumorales mediante fagocitosis y son una fuente importante de IL-12, la cual promueve la diferenciación de linfocitos T CD8 $^{+}$ citotóxicos y linfocitos T CD4 $^{+}$ Th1 (Biswas & Mantovani, 2010; Grivennikov et al., 2010; Mosser & Edwards, 2008). En cuanto a los eosinófilos, un elevado infiltrado de estas células generalmente también se asocia a un efecto protector frente al cáncer (Reichman et al., 2016).

Linfocitos T

Los linfocitos T CD4 $^{+}$ reconocen típicamente péptidos presentados por las moléculas del CMH clase II. Estas células desempeñan un papel central en el inicio y el mantenimiento de las respuestas inmunitarias adaptativas. Los linfocitos T CD4 $^{+}$ pueden tener una amplia variedad de funciones efectoras y se los denomina T “helper” (Th) o “colaboradores”. Se ha demostrado que colaboran con los linfocitos B en la producción de anticuerpos, facilitando el cambio de isotipo y la maduración de la afinidad (Claman et al., 1966; Lanzavecchia, 1985). De forma similar, se demostró que los linfocitos T CD4 $^{+}$ colaboran con la activación, expansión de linfocitos T CD8 $^{+}$ y generación de células de memoria (Cassell & Forman, 1988; Janssen et al., 2003). Los linfocitos T CD4 $^{+}$ se pueden distinguir según las citoquinas que producen en linfocitos Th1, Th2 o Th17 o también se pueden distinguir por su capacidad para regular negativamente la función de otras células (linfocitos Treg) (Mosmann & Coffman, 1989; Sakaguchi et al., 2001). Las células T se diferencian hacia un perfil Th1 cuando las células dendríticas producen IL-12 en ausencia de IL-4 o citoquinas inmunosupresoras (Sallusto, 2016; Zhu et al., 2010). Los linfocitos Th1 se caracterizan por ser células productoras de IFN- γ , IL-2 y linfotóxina- β y son esenciales en la activación de una respuesta inmune mediada por células fagocíticas. Por el contrario, en la diferenciación hacia un

perfil Th2 es importante la presencia de IL-4 y ausencia de IL-12. Este perfil es característico de la respuesta a helmintos y alérgenos. Por último, los linfocitos Th17 se caracterizan por producir IL-17 (Steinman, 2007) y los factores claves involucrados en la generación de dichas células son TGF- β e IL-6, mientras que IL-23 es responsable de la estabilización y mantenimiento de las células. El perfil Th17 depende de factores de transcripción como Stat3 y ROR γ t (Korn et al., 2009). Las células Th17 actúan en infecciones por hongos y bacterias extracelulares y son las responsables de perpetuar procesos autoinmunes e inflamatorios crónicos (McGeachy & Cua, 2008).

Los linfocitos Th1 pueden promover la respuesta antitumoral mediando la activación de linfocitos T CD8⁺ como se mencionó previamente. Además, se ha demostrado que los linfocitos Th1, mediante la producción de IFN- γ pueden desencadenar una respuesta antitumoral mediada por macrófagos (Haabeth et al., 2011). Por otro lado, los linfocitos Th1 ayudan a reclutar células NK y macrófagos a los tumores, que favorecen la eliminación de los mismos (Corthay et al., 2005; Nishimura et al., 1999). Además, son capaces de producir grandes cantidades de IL-2, lo cual potencia la proliferación y la capacidad citotóxica de linfocitos T CD8⁺ (Luckheeram et al., 2012). El rol de los linfocitos Th17 en el cáncer depende del contexto (Bailey et al., 2014). La IL-17 producida por estas células, puede activar linfocitos T CD8⁺ pero al mismo tiempo promover la angiogénesis.

Los linfocitos T CD8⁺ reconocen típicamente péptidos presentados por las moléculas de CMH clase I. Dado que la mayoría de las células tumorales expresan moléculas de CMH clase I, se cree que el mecanismo que predomina en el rechazo tumoral es la citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8⁺ (Hadrup et al., 2013). Sin embargo, como se describió anteriormente, los linfocitos T CD4⁺ tienen un rol muy importante en la inmunidad antitumoral. Los linfocitos T CD8⁺ ejercen su acción citotóxica a través de los mecanismos mencionados para las células NK, es decir la citotoxicidad mediada por perforinas y granzimas y expresión de ligandos de muerte celular. Luego de su activación, los linfocitos T pueden adoptar distintos fenotipos. Los linfocitos T efectores se caracterizan por la pérdida de la expresión de las moléculas CD62L y CCR7, las cuales son esenciales para migrar hacia órganos linfoides secundarios. Por otro lado, aumentan la expresión de CD44 y LFA-1, moléculas de adhesión que

les permiten ingresar a tejidos inflamados (Zhang & Bevan, 2011). Los linfocitos T efectores son una población de células con alto potencial citotóxico y capacidad de producir citoquinas inflamatorias. Se caracterizan por una elevada expresión de CD44 y baja expresión de CD62L. Son las principales encargadas de la destrucción de células infectadas o tumorales. Una vez que finaliza la respuesta, las células efectoras pueden persistir dando lugar a células de memoria que permanecen luego durante años. Se caracterizan por una elevada expresión de CD44 y CD62L, molécula de superficie que vuelve a expresarse y que les permite migrar a órganos linfoides. Estas células son capaces de dividirse periódicamente, gracias a la estimulación por IL-15 e IL-7 (Cieri et al., 2013).

Ciclo de la inmunidad frente al cáncer

Las células dendríticas son componentes fundamentales de la respuesta inmune antitumoral ya que son las encargadas de promover la activación de la inmunidad adaptativa frente a antígenos tumorales. Junto a otras células del sistema inmune participan en un proceso conocido como el ciclo de la inmunidad frente al cáncer (Figura 2), el cual consta de siete etapas clásicas (Chen & Mellman, 2013). La primera etapa involucra la muerte inmunogénica de una célula tumoral, lo cual favorece la liberación de antígenos tumorales y patrones moleculares asociados a peligro (DAMP, del inglés *danger associated molecular patterns*) como la proteína de alta movilidad del grupo de caja 1 (HMGB-1, del inglés *high mobility group box 1 protein*). En esta etapa, la muerte de la célula tumoral puede darse por la administración de un tratamiento como quimioterapia o radioterapia, o la acción de células citotóxicas como los linfocitos T CD8⁺ y las células NK, en colaboración con los linfocitos T CD4⁺. Los antígenos solubles liberados por células tumorales son transportados a los ganglios linfáticos a través de los vasos linfáticos. Estos antígenos pueden ser capturados por células dendríticas residentes en el ganglio a través de endocitosis, mientras que células dendríticas residentes de tejidos capturan antígenos directamente en el microambiente tumoral y luego migran a los ganglios. En la segunda etapa, las células dendríticas procesan los antígenos generando péptidos que se presentan en su superficie asociados a moléculas del CMH clase I, y que pueden ser reconocidos por el receptor de

célula T (TCR, del inglés *T cell receptor*) de linfocitos T CD8⁺ presentes en los ganglios linfáticos. En la tercera etapa la interacción CMH clase I-péptido/TCR constituye la primera señal que necesitan los linfocitos T CD8⁺ para activarse. La segunda señal necesaria la aportan las células dendríticas a través de la expresión de moléculas coestimuladoras, entre las cuales las más estudiadas son CD80 y CD86, que interactúan con el receptor CD28 en linfocitos T CD8⁺. También son importantes otros receptores coestimuladores en los linfocitos T CD8⁺, tales como OX-40, ICOS y 4-1BB, entre otros. La interacción entre las moléculas coestimuladoras CD28 y B7 es necesaria para la activación completa de linfocitos T, y está estrechamente regulada por puntos de control inhibitorios para evitar daños colaterales y autoinmunidad. Uno de estos puntos de control inhibitorios es el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) que se descubrió en la década de 1980 y se expresa en linfocitos T activados y en linfocitos Treg (Brunet et al., 1987). Numerosos trabajos de Allison y colaboradores, demostraron que CTLA-4 compite con CD28 por los ligandos B7 e inhibe la proliferación y la secreción de IL-2 por los linfocitos T (Krummel & Allison, 1995). Otro punto de control inhibitorio expresado en linfocitos T activados, es el receptor de muerte programada 1 (PD-1), que se clonó en 1992 (Ishida et al., 1992) y posteriormente se caracterizó su ligando PD-L1 (Dong et al., 1999; Freeman et al., 2000). En la cuarta etapa, los linfocitos T CD8⁺ activados deben migrar del ganglio linfático a la zona del tumor por los vasos sanguíneos, mediante un proceso que está regulado por ciertas quimioquinas. En la quinta etapa, una vez que llegan a la vasculatura tumoral, los linfocitos T CD8⁺ deben extravasar, un proceso que es facilitado por el aumento en la expresión de selectinas e integrinas. En la sexta etapa, una vez en el microambiente tumoral, los linfocitos T CD8⁺ reconocen específicamente a través de su TCR a los antígenos tumorales unidos a moléculas del CMH I en la superficie de células tumorales. Por último, en la séptima etapa, los linfocitos T CD8⁺ desencadenan sus mecanismos citotóxicos, liberando sus gránulos de perforinas y granzimas o expresando FasL, lo que induce la muerte de las células tumorales. En este último paso, la lisis de las células tumorales produce la liberación de nuevos antígenos y DAMPs, lo cual lleva al inicio del ciclo nuevamente. Este proceso puede llevar a la destrucción de focos tumorales nacientes, a la destrucción de clones

tumorales inmunogénicos durante la fase de equilibrio, o a la eliminación de células tumorales durante la fase de escape en un intento por contener el crecimiento del tumor.

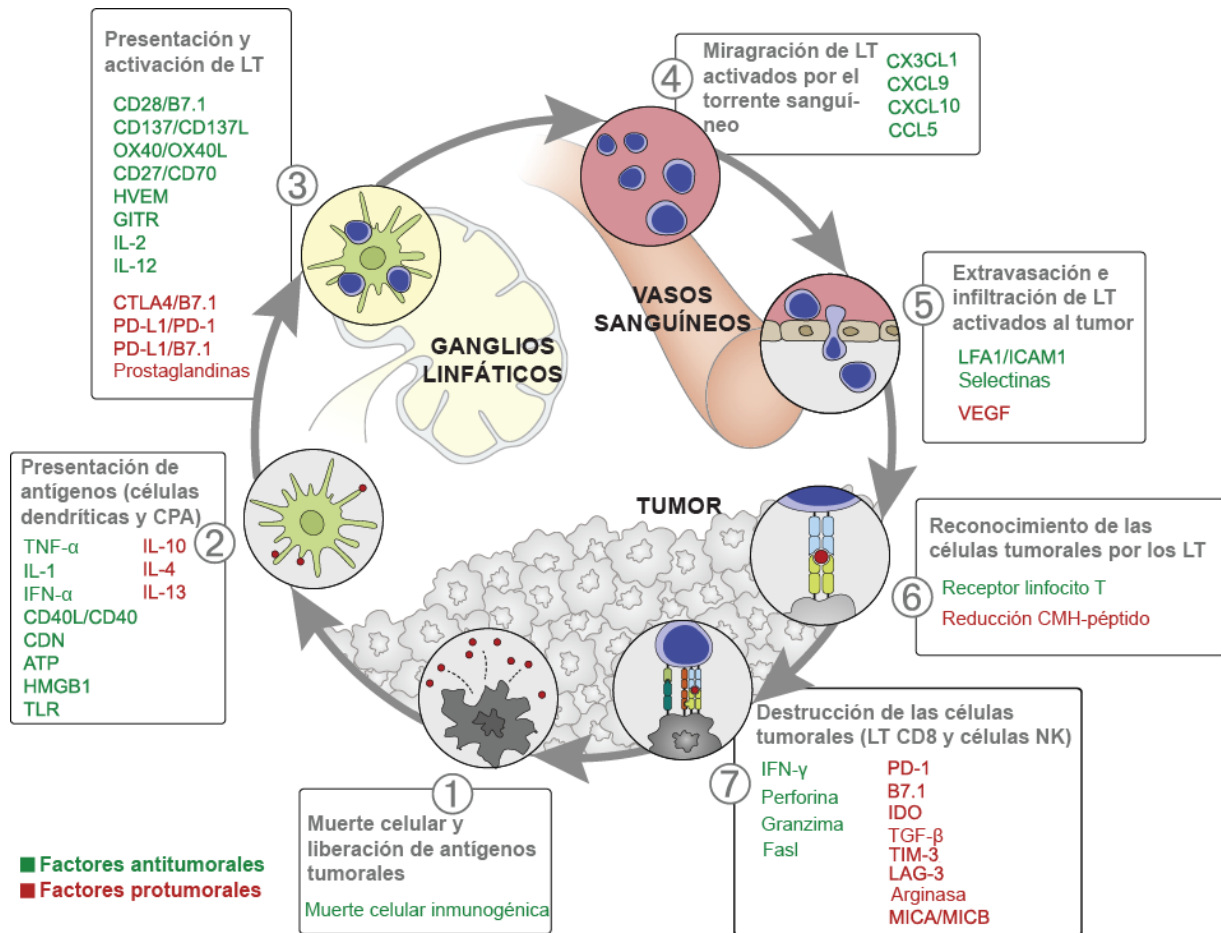


Figura 2. El ciclo de la inmunidad frente al cáncer. La generación de inmunidad contra el cáncer es un proceso cíclico que se puede autopropagar, lo que lleva a una acumulación de factores inmunoestimulatorios o antitumorales que, en principio, deben amplificar y ampliar la respuesta de linfocitos T. El ciclo también se caracteriza por factores inhibidores o protumorales que conducen a mecanismos que pueden detener el desarrollo o limitar la inmunidad. Este ciclo se puede dividir en siete pasos principales, comenzando con la liberación de antígenos de la célula tumoral y terminando con la muerte de las células tumorales. CPA, células presentadoras de antígeno; LT, linfocitos T. Adaptado de Chen y colaboradores 2013.

Como puede observarse en la Figura 2, cada etapa del ciclo de la inmunidad frente al cáncer, está regulada finamente por factores protumorales y antitumorales. El control de cada una de estas etapas, tiene su origen fisiológico en controlar la respuesta inmune y evitar fenómenos de autoinmunidad. Sin embargo, muchas veces las células tumorales aprovechan estos mecanismos de control para evadir al ataque de la respuesta inmune, ya

sea por inhibición de los factores antitumorales o favoreciendo la producción de factores protumorales. Una de las estrategias de los tumores para evadir la respuesta inmune antitumoral es la capacidad de expandir células del sistema inmune con funciones inmunosupresoras. Una de estas poblaciones son los linfocitos T regulatorios (Treg) que se caracterizan por una elevada expresión del factor de transcripción FOXP3, el cual está involucrado en la expresión de moléculas inmunoregulatorias, como TGF β , IL-10 y CTLA-4 (Schmidt et al., 2012; Speiser et al., 2016). Por otro lado, los tumores también pueden producir la expansión de células mieloides supresoras (MDSC, del inglés *myeloid derived supresor cells*) y macrófagos asociados a tumores. Las MDSCs suprimen la función de linfocitos T efectoras a través de la expresión de moléculas inmunoregulatorias comoIDO, arginasa-1, iNOS, TGF β y PD-L1 (Gabrilovich, 2017). Estos mismos mecanismos inmunoregulatorios son utilizados por los macrófagos asociados a tumores, aunque estos últimos también colaboran con el tumor produciendo grandes cantidades del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la quimioquina CCL22 (Ostuni et al., 2015). El conocimiento de las células y moléculas responsables de la inmunosupresión, ya sea mediada por células tumorales o del sistema inmune, ha llevado al desarrollo de distintas estrategias inmunoterapéuticas contra el cáncer, que se describen a continuación.

2.2 INMUNOTERAPIAS DIRIGIDAS CONTRA EL CÁNCER

En la actualidad la inmunoterapia contra el cáncer se ha convertido en el quinto pilar del tratamiento del cáncer, complementando la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia y las terapias dirigidas. La estimulación del sistema inmunológico para el tratamiento contra el cáncer tiene sus orígenes hacia finales del siglo XIX, gracias al cirujano y oncólogo William Coley, que utilizaba toxinas derivadas de bacterias *Streptococcus erisipelas* y *Bacillus prodigiosus* para el tratamiento de un tipo de sarcoma inoperable (Coley, 1893). A pesar de que no se conocían los mecanismos que llevaban a la eliminación del tumor, Coley postuló que la inflamación local producida por estas toxinas era capaz de activar la respuesta inmunológica y eliminar el tumor (Coley, 1910). Estos primeros estudios sentaron las bases de lo que en la actualidad constituye una revolución en el tratamiento del cáncer. Las inmunoterapias

pueden dividirse en dos grandes grupos: pasivas y activas. La inmunoterapia pasiva consiste en el tratamiento con anticuerpos monoclonales, citoquinas o linfocitos que han sido activados *ex vivo*. Por otro lado, la inmunoterapia activa intenta estimular el sistema inmune *in vivo* mediante la vacunación con péptidos tumorales o células completas, con células dendríticas, o el tratamiento con anticuerpos dirigidos a puntos de control cruciales para la activación de los linfocitos T. Actualmente, existen cinco tipos distintos de inmunoterapias:

1) Inmunoterapias basadas en células: complementan físicamente el sistema inmunitario de los pacientes con células inmunitarias. Estos incluyen los trasplantes de médula ósea y los trasplantes de células más sofisticados, como los linfocitos T que expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR, del inglés *chimeric antigen receptor*).

2) Inmunomoduladores: pueden actuar directamente sobre las células inmunitarias para promover la actividad contra el cáncer. La citoquina interferón α (IFN- α) fue el primer inmunomodulador aprobado por la FDA (del inglés, *US Food and Drug Administration*) en 1986 para el tratamiento de la leucemia.

3) Vacunas: ayudan a educar o estimular al sistema inmunológico contra una potencial amenaza.

4) Terapias basadas en anticuerpos monoclonales: pueden dirigirse directamente a las células tumorales u otras células/proteínas que ayudan a la supervivencia del tumor o bien a moléculas que inhiben el sistema inmune. El primer anticuerpo (anti-CD20, rituximab) se aprobó en 1997 para el tratamiento de linfoma. El primer inhibidor del punto de control inmunitario (anti-CTLA-4, ipilimumab) fue aprobado en 2011 para el tratamiento de melanoma avanzado.

5) Virus oncolíticos: pueden modificarse para que infecten específicamente las células tumorales y produzcan su lisis, atrayendo al sistema inmunológico. El virus oncolítico T-Vec se aprobó para pacientes con melanoma avanzado en 2015.

2.2.1 Inmunoterapias basadas en células

La transferencia adoptiva de células consiste principalmente en el aislamiento y la expansión *in vitro* de linfocitos T específicos de tumores,

seguida de una infusión en el paciente con cáncer. Históricamente, el concepto de transferencia celular adoptiva se introdujo por primera vez cuando un artículo en 1964 demostró que la transferencia de linfocitos inmunes podría inhibir el crecimiento de un sarcoma de rata inducido por carcinógeno (Delorme & Alexander, 1964). Años más tarde, trabajos pioneros de Rosenberg y colaboradores, mejoraron la efectividad de la transferencia celular adoptiva mediante el uso de IL-2 recombinante, para inducir la estimulación y proliferación de los linfocitos T. Esta estrategia fue aprobada por la FDA para el tratamiento de cáncer renal metastásico en 1992 y de melanoma metastásico en 1998 (Rosenberg et al., 1986; Rosenberg et al., 1988; Rosenberg et al., 2008). Por estos hallazgos, se considera al Dr. Rosenberg el “padre” de la inmunoterapia basada en transferencia de células. Algunas metodologías se centran en la transferencia de células efectoras como linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Dudley et al., 2008; Muranski & Restifo, 2009); o en la transferencia de células genéticamente modificadas para que expresen un TCR antitumoral de alta afinidad, denominada terapia con células T CAR (Lauritzsen et al., 1993). Las terapias con células T CAR han demostrado buenos resultados en malignidades hematológicas, pero presentan efectos adversos (Smith et al., 2016). Este tipo de terapia también se ha extendido al uso de células NK, ya que muestran una inmunidad rápida y potente contra las metástasis de tumores sólidos y malignidades hematológicas (Guillerey et al., 2016).

2.2.2 Inmunomoduladores

Muchos inmunomoduladores se pueden definir como inmunoterapias no específicas, ya que no están dirigidas contra una determinada célula o antígeno, sino que estimulan el sistema inmune de manera general. 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 o el bacilo de Calmette-Guérin (BCG) que ayuda a activar el sistema inmune y se utiliza para tratar el cáncer de vejiga (Green et al., 2015; Monjazebe et al., 2012).

2.2.3 Vacunas

El objetivo de las vacunas antitumorales es intentar exponer a los pacientes a antígenos tumorales que pueden provocar una respuesta inmune antitumoral a través de la generación de anticuerpos y/o linfocitos T específicos para el tumor. Por otro lado, las vacunas antitumorales 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. En algunos casos de cánceres inducidos por virus (por ejemplo: papiloma humano, Hepatitis B y C, Epstein Barr), se desarrollaron vacunas contra antígenos virales del virus del papiloma humano de forma preventiva (Garland et al., 2007) o de forma terapéutica (Kenter et al., 2009). Otras 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 antitumoral 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 células dendríticas diferenciadas del propio paciente al antígeno tumoral fosfatasa ácida prostática. Estas células dendríticas cargadas con el antígeno tumoral 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 (Gardner et al., 2012). Sipuleucel-T es una vacuna de células dendríticas, mientras que otros tipos de vacunas emplean

células tumorales muertas o antígenos tumorales seleccionados. Los ensayos de vacunas que utilizan múltiples neoantígenos específicos para el tumor de un paciente individual han mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos (Kaiser, 2017). Otra estrategia inmunoterapéutica son las vacunas con células tumorales autólogas o alogeneicas, previamente irradiadas con el objetivo de que sean inocuas para el paciente. Un ejemplo de este tipo de vacunas es GVAX, que es una vacuna de células enteras transfectadas para que expresen GM-CSF que ha demostrado una buena actividad terapéutica contra melanoma (Lipson et al., 2015). En nuestro país el grupo del Dr. Mordoh ha desarrollado vacunas contra melanoma basadas en la administración de células tumorales enteras irradiadas (Barrio et al., 2006) o en células dendríticas cargadas con células tumorales irradiadas (von Euw et al., 2008). Recientemente, demostraron que la vacuna de células de melanoma irradiadas CSF-470 junto con BCG y GM-CSF puede prolongar significativamente, con menor toxicidad, la supervivencia libre de metástasis a distancia en pacientes con melanoma, en comparación con pacientes tratados con dosis intermedias de IFN- α 2b en un ensayo clínico de fase II (Mordoh et al., 2017).

Un aspecto importante en la inmunoterapia basada en vacunas es el uso de adyuvantes para aumentar su inmunogenicidad y eficacia. Los adyuvantes pueden ser moléculas estimuladoras o sistemas de entrega de los antígenos tumorales, para favorecer la interacción entre los mismos y la CPA.

2.2.4. Terapia con anticuerpos monoclonales

Las terapias basadas en el uso de anticuerpos monoclonales en el tratamiento del cáncer se han consolidado como una de las estrategias terapéuticas más eficaces tanto para malignidades hematológicas como para tumores sólidos. Cuando el anticuerpo se une a su molécula blanco, puede desencadenar directamente apoptosis en la célula tumoral, o puede provocar una respuesta de células NK y macrófagos denominada citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Algunos ejemplos de anticuerpos monoclonales para el tratamiento del cáncer aprobados por la FDA 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).

En el año 2011 se produjo una revolución en el tratamiento del cáncer debido a la aprobación de la FDA para el uso de inhibidores de puntos de control inmunitario. De hecho, en el año 2018 los doctores James P. Allison y Tasuku Honjo fueron galardonados con el Premio Nóbel en Medicina o Fisiología por su descubrimiento de las moléculas CTLA-4 y PD-1 respectivamente. El proceso de activación de los linfocitos T implica la presentación de antígenos por medio de las moléculas de CMH en las CPA al TCR de los linfocitos T vírgenes. Como mencionamos, este proceso está finamente regulado por puntos de control inhibitorios. Como se describió previamente, uno de los puntos de control inmunitario es la molécula CTLA-4 y se ha demostrado que los anticuerpos bloqueantes de CTLA-4 funcionan como terapias antitumorales (Leach et al., 1996). En el año 2011, la FDA aprobó el ipilimumab, el primer inhibidor de punto de control CTLA-4 para el tratamiento de melanoma (Hodi et al., 2010; Robert et al., 2011). Otro punto de control expresado en linfocitos T activados es el PD-1. Los tumores pueden expresar su ligando, PD-L1, de forma inducible o constitutiva para evadir el ataque del sistema inmune. Se ha observado en ensayos clínicos, que los anticuerpos que bloquean la interacción PD-1 y PD-L1 pueden inducir la reactivación de linfocitos T en el tumor y que producen respuestas duraderas (Okazaki et al., 2013; Zou et al., 2016). Esto condujo a la aprobación de dos anticuerpos anti-PD1 (pembrolizumab y nivolumab) y un anticuerpo anti-PD-L1 (atezolimumab) para el tratamiento de melanoma avanzado, cáncer de pulmón, carcinoma de células renales, cáncer de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin y cáncer de vejiga. Recientemente, se han publicado los resultados de un ensayo clínico en fase III, donde demuestran que la combinación de atezolimumab con quimioterapia aumenta la supervivencia libre de progresión en pacientes con cáncer de mama triple negativo (Schmid et al., 2018). Actualmente hay más de diez anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 en varias etapas de las pruebas clínicas en muchos tipos diferentes de tumores.

2.2.5. Virus oncolíticos

Los virus oncolíticos son una terapia emergente contra el cáncer que se encuentra en la unión de la terapia biológica y la inmunoterapia. Estos virus están modificados genéticamente para carecer de virulencia contra las células normales, pero pueden invadir y lisar las células tumorales que han sacrificado muchas de sus defensas celulares antivirales normales para amplificar su potencial de crecimiento. La lisis es solo uno de los múltiples mecanismos implicados en la destrucción inducida por virus de las células tumorales, que sufren un ataque adicional por parte de un sistema inmunitario estimulado por una gran cantidad de antígenos tumorales liberados por la destrucción lítica (Choi et al., 2016). El primer virus oncolítico que fue aprobado por la FDA en 2015 para tratar el melanoma avanzado es un virus herpes simplex-1 (HSV-1) denominado "T-Vec", modificado para expresar GM-CSF que estimula aún más la proliferación de células inmunitarias. T-VEC se inyecta directamente en áreas de melanoma que el cirujano no puede extirpar. Se están realizando ensayos clínicos con otros virus oncolíticos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, y algunos de estos ensayos están combinados con otros tipos de terapias contra el cáncer (Raja et al., 2018).

3 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 cual las células en cultivo dejan de replicarse (Hayflick, 1965). Hoy en día se sabe que la senescencia también puede ser inducida en células "jóvenes". Es por eso que la senescencia generalmente, se divide entre senescencia replicativa o senescencia prematura que puede ser inducida 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 o bien se ha descrito que también puede gatillarse por la inactivación de un oncogén necesario para la supervivencia de la célula. Actualmente, la senescencia se define como un

arresto estable del ciclo celular, que, como dijimos, puede ser desencadenada por distintos inductores.

3.1 TIPOS DE SENESCENCIA

Como se mencionó, la senescencia es un mecanismo de arresto del ciclo celular, que tiene características comunes, pero puede ser inducida por distintos factores, que dan lugar a los siguientes tipos de senescencia:

Senescencia replicativa: se refiere a la disminución del potencial de proliferación observado después de múltiples divisiones celulares que finalmente conduce a una detención total (Hayflick & Moorhead, 1961). El acortamiento de los telómeros como consecuencia de múltiples divisiones celulares en células no transformadas ha sido reconocido como el mediador de este tipo de senescencia (Sharpless & Sherr, 2015).

Senescencia inducida por daño en el ADN: el daño irreparable en el ADN puede inducir senescencia o apoptosis, dependiendo de la magnitud del daño (Muñoz-Espín & Serrano, 2014). *In vitro*, se utilizan múltiples agentes que dañan el ADN para inducir este tipo de senescencia, incluidos la radiación (ionizante y UV) o múltiples fármacos (ver "senescencia inducida por terapia") (Muñoz-Espín & Serrano, 2014).

Senescencia inducida por estrés oxidativo: productos oxidantes del metabolismo celular o agentes oxidativos conocidos (por ejemplo, H₂O₂) pueden causar senescencia (Hernandez-Segura et al., 2017). Aunque los agentes oxidantes ejercen su efecto en parte a través del daño del ADN, otros componentes y procesos celulares también se ven afectados.

Senescencia inducida por terapia: múltiples fármacos anticancerígenos pueden inducir senescencia. Algunos (como bleomicina o doxorubicina) inducen daños en el ADN, mientras que otros pueden actuar a través de diferentes mecanismos, como la inhibición de quinasas dependientes de

ciclinas (CDK), como por ejemplo, abemaciclib y palbociclib (Petrova et al., 2016).

Senescencia paracrina: senescencia inducida por el secretoma producido por una célula senescente primaria (Juan Carlos Acosta et al., 2013).

Senescencia inducida por oncogenes (OIS): la sobreexpresión de un oncogén como Ras y Raf también puede inducir senescencia (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).

Senescencia inducida por inactivación de genes supresores de tumores: Al igual que lo descrito 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 la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), la proteína del retinoblastoma 1 (RB1), la neurofibromina 1 (NF1) y la inositol polifosfato-4-fosfatasa tipo II (INPP4B) (Alimonti et al., 2010; Collado et al., 2005; Shamma et al., 2009) puede inducir rápidamente la activación de un programa de senescencia.

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. 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. La inhibición de estos oncogenes puede conducir a la detención de la proliferación, la apoptosis (Felsher & Bishop, 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). Por todo lo expuesto, se ha observado que los tumores suelen depender de una vía oncogénica para sobrevivir, lo que llevó al desarrollo del concepto de “adicción a oncogenes” (Weinstein, 2002). La prueba *in vivo* de que este fenómeno ocurre, radica en el éxito de las terapias

blanco como el trastuzumab, inhibidores de la vía Ras/MAPK, etc. 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 el fenómeno de adicción a oncogenes, caracterizado por la dependencia de las células tumorales a los oncogenes que ayudaron en el desarrollo del tumor (Felsher et al., 2008). En un estudio más reciente de nuestro laboratorio, Tkach y colaboradores, han demostrado que la inhibición del oncogén Stat3 en células de cáncer de mama murinas induce senescencia celular *in vitro* (Tkach et al., 2012). 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).

3.2 CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS SENESCENTES

Mientras que la senescencia celular es inducida por varios estímulos, las células senescentes presentan una serie de características comunes que permiten su identificación tanto *in vitro* como *in vivo*. Dada la heterogeneidad de las células senescentes, se recomienda una combinación de diferentes marcadores para su detección. Los distintos marcadores y mecanismos presentes en las células senescentes son:

Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKis) y arresto del

ciclo celular: El arresto del ciclo celular es el marcador indispensable para la identificación de las células senescentes. Sin embargo, no puede ser utilizado como único marcador, ya que, por ejemplo, la diferenciación terminal también induce un arresto estable del ciclo celular. Las CDK fosforilan y regulan múltiples proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular. Los principales impulsores del arresto del ciclo celular en la senescencia son los CDK codificados en los loci CDKN2A (p16^{INK4a}), CDKN2B (p15^{INK4b}) y CDKN1A

(p21^{CIP}). La activación transcripcional de p16^{INK4a} ha sido muy utilizada para la identificación de células senescentes *in vivo* (Baker et al., 2011; Burd et al., 2013). Los principales inductores de los niveles de p16^{INK4a} son los cambios epigenéticos, pero se han descrito otros reguladores, desde la accesibilidad del promotor hasta la estabilidad de la proteína. Por otro lado, p21^{CIP1} también ha sido identificado como un mediador de senescencia (Hernandez-Segura et al., 2017). p21^{CIP1} puede ser modulado por varios mecanismos de forma p53 dependiente e independiente, por lo que no puede ser utilizado como único marcador para definir a las células senescentes (Jung et al., 2010).

Cambios morfológicos: La senescencia celular, generalmente, está acompañada de cambios morfológicos. Dependiendo del inductor de senescencia, las células pueden volverse grandes, planas y multinucleadas, o más bien refractarias. Los cambios en el tamaño y la morfología se miden fácilmente con microscopía normal o fluorescente, pero son difíciles de detectar y cuantificar *in vivo* o *in situ*.

Aumento del contenido lisosomal: El estado de senescencia se caracteriza por la regulación positiva del contenido lisosomal. La actividad de la enzima lisosomal beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA-β-gal, del inglés *senescence-associated-beta-galactosidase*) se utiliza como un marcador para el contenido lisosomal de las células senescentes (Dimri et al., 1995). Dado que la SA-β-gal se encuentra aumentada durante la senescencia, su actividad se puede medir a un pH subóptimo de 6, mientras que en condiciones normales el pH óptimo es 4 (Lee et al., 2006). La tinción de la enzima SA-β-gal es posiblemente el marcador más común de la senescencia. Sin embargo, no se puede utilizar para cortes de tejido embebidos en parafina y células vivas, lo que limita su aplicación.

Cambios nucleares: Una marca común de las células senescentes es la pérdida de la proteína lamina B1, una proteína estructural de la lámina nuclear (Sadaie et al., 2013). La disminución de lamina B1 produce una desestabilización de la membrana nuclear que lleva a la aparición de fragmentos de cromatina citoplásmica, que están enriquecidos en marcas

epigenéticas asociadas con daño en el ADN (Ivanov et al., 2013). Otro de los cambios en la estructura de la cromatina asociados a senescencia es la formación de focos de heterocromatina (Chandra & Kirschner, 2016; Narita et al., 2003). Una marca de represión transcripcional que se observó aumentada en estos focos de heterocromatina es la trimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (TriMeK9H3) (Narita et al., 2003)

Respuesta de daño al ADN: En presencia de daño en el ADN, las células activan una respuesta, denominada respuesta de daño al ADN (DDR del inglés *DNA damage response*). La ruptura de la doble hélice desencadena una DDR 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 (Fagagna et al., 2003; Shiloh, 2006). 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 una detención transitoria 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. La marca de la histona γ -H2AX o la fosforilación de p53 se usan comúnmente como marcadores de senescencia. Sin embargo, la DDR es activada por varios estímulos que dañan el ADN que no necesariamente llevan a las células a un estado senescente. Además, no todos los inductores de senescencia desencadenan una DDR.

Resistencia a la apoptosis: Las células senescentes activan varios factores de supervivencia y antiapoptóticos que las vuelven resistentes a la apoptosis (Childs et al., 2014). Entre los mecanismos de resistencia se ha encontrado la capacidad de las células senescentes de aumentar el factor antiapoptótico BCL2 (Ryu et al., 2007) y de regular negativamente el factor proapoptótico Bax (Sanders et al., 2013). Recientemente, se ha propuesto la activación de la vía de apoptosis en las células senescentes como una estrategia para eliminarlas. Por ejemplo, se ha demostrado que las células senescentes regulan las proteínas antiapoptóticas BCL-W y BCL-XL y que la inhibición de ambas induce

apoptosis en células senescentes (Yosef et al., 2016). Por otro lado, se ha visto que FOXO4 se sobreexpresa en células senescentes, y previene la muerte celular mediante el secuestro de p53 en el núcleo. El bloqueo de la interacción entre FOXO4 y p53 induce apoptosis de las células senescentes (Baar et al., 2017). Finalmente, se ha demostrado que HSP90 es una proteína clave para la supervivencia de las células senescentes, ya que los inhibidores de HSP90 inducen apoptosis específicamente en estas células (Fuhrmann-Stroissnigg et al., 2017).

Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP): Aunque las células senescentes no proliferan, permanecen metabólicamente activas y sufren cambios en el metabolismo que las llevan al desarrollo de un fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, del inglés *senescence induced secretory phenotype*). El secretoma se define como el conjunto de factores secretados por una célula al microambiente. En el caso de la senescencia, el SASP está compuesto mayormente por citoquinas inflamatorias, quimioquinas, factores de crecimiento y proteasas (Coppé et al., 2008; Rodier et al., 2009). Dependiendo del estímulo que induce senescencia y el tipo celular, el SASP puede tener distinta composición y, en consecuencia, diversos efectos (Figura 3). El primer reporte de cambios en el secretoma de las células senescentes, se observó en fibroblastos transitando senescencia replicativa, donde un análisis de *microarray* reveló una fuerte respuesta inflamatoria, similar a la observada en la cicatrización de heridas (Shelton et al., 1999). Un trabajo posterior demostró que la presencia de fibroblastos senescentes en los tejidos tumorales puede promover la progresión tumoral *in vivo* (Krtolica et al., 2001). Este estudio sugirió por primera vez que las células senescentes producen y secretan factores que son capaces de estimular la proliferación de células tumorales. Se ha demostrado que muchos factores del SASP, como VEGF y metaloproteinasas de matriz (MMPs), en diversas condiciones inducen propiedades tumorigénicas, como la proliferación, la supervivencia, la angiogénesis y el potencial metastásico (Coppé et al., 2006; Foersch et al., 2015; Garland et al., 2007; Liu & Hornsby, 2007). El SASP también puede favorecer la aparición de células madre del tumor que aumentan la tumorigénesis y la resistencia a las terapias (Achuthan et al., 2011; Basu et al.,

2012; Cahu et al., 2012; Canino et al., 2012). Sin embargo, hay ciertos componentes del SASP que pueden tener efectos duales. Por ejemplo, CCL2 se ha relacionado con la OIS en el hígado y la eliminación mediada por el sistema inmune de los hepatocitos premalignos (Eggert et al., 2016) o células tumorales hepáticas senescentes (Iannello et al., 2013). Sin embargo, en el contexto del carcinoma hepatocelular establecido, CCL2, entre otros, restringe la función de las células NK mediante el reclutamiento de MDSCs, y favorece el crecimiento del tumor (Eggert et al., 2016). Otro ejemplo de las dos caras que pueden tener los componentes del SASP, son las citoquinas IL-6 e IL-8 que son dos de los factores proinflamatorios del SASP más estudiados en varios tipos de senescencia (Jeon et al., 2017; Kuilman et al., 2008; Ruhland et al., 2016; Vizioli et al., 2014). Además de inducir una respuesta inflamatoria e inmunovigilancia para controlar la progresión del tumor hepático (Xue et al., 2007), la activación del receptor CXCR2 a través de IL-6 e IL-8 refuerza la senescencia y el arresto del ciclo celular (Zacarias-Fluck et al., 2015). En algunos casos, sin embargo, la IL-6 derivada de células estromales puede inducir inmunosupresión (Ruhland et al., 2016). Por otro lado, las citoquinas IL-6 e IL-8, además pueden producir fibrosis (Fielding et al., 2014) o inducir la proliferación de células tumorales (Ning et al., 2011). Por último, los componentes del SASP tienen efectos benéficos en condiciones no patológicas como la reparación de heridas (Baker et al., 2016; Demaria et al., 2014) y en la plasticidad celular y regeneración de tejidos (Mosteiro et al., 2016; Ritschka et al., 2017). En este contexto, la duración del SASP parece tener un efecto crítico: aunque el SASP a tiempos cortos promueve la plasticidad celular y la capacidad regenerativa, una exposición prolongada al SASP puede inducir senescencia que contrarresta la regeneración o incluso promueve la formación de tumores o el envejecimiento acelerado (Ritschka et al., 2017). Por todo lo expuesto, aumentar el conocimiento de las diferencias entre el SASP de las células senescentes inducidas por múltiples mecanismos, y cómo estos componentes contribuyen a la atracción y evasión del sistema inmune, es crucial para el desarrollo de nuevas terapias o combinaciones terapéuticas contra el cáncer.

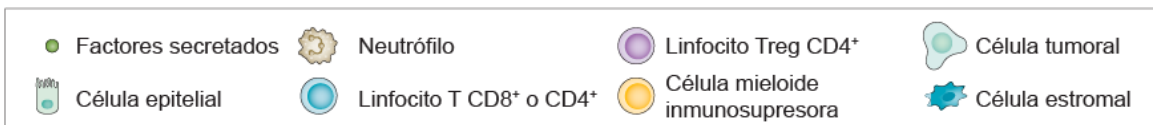
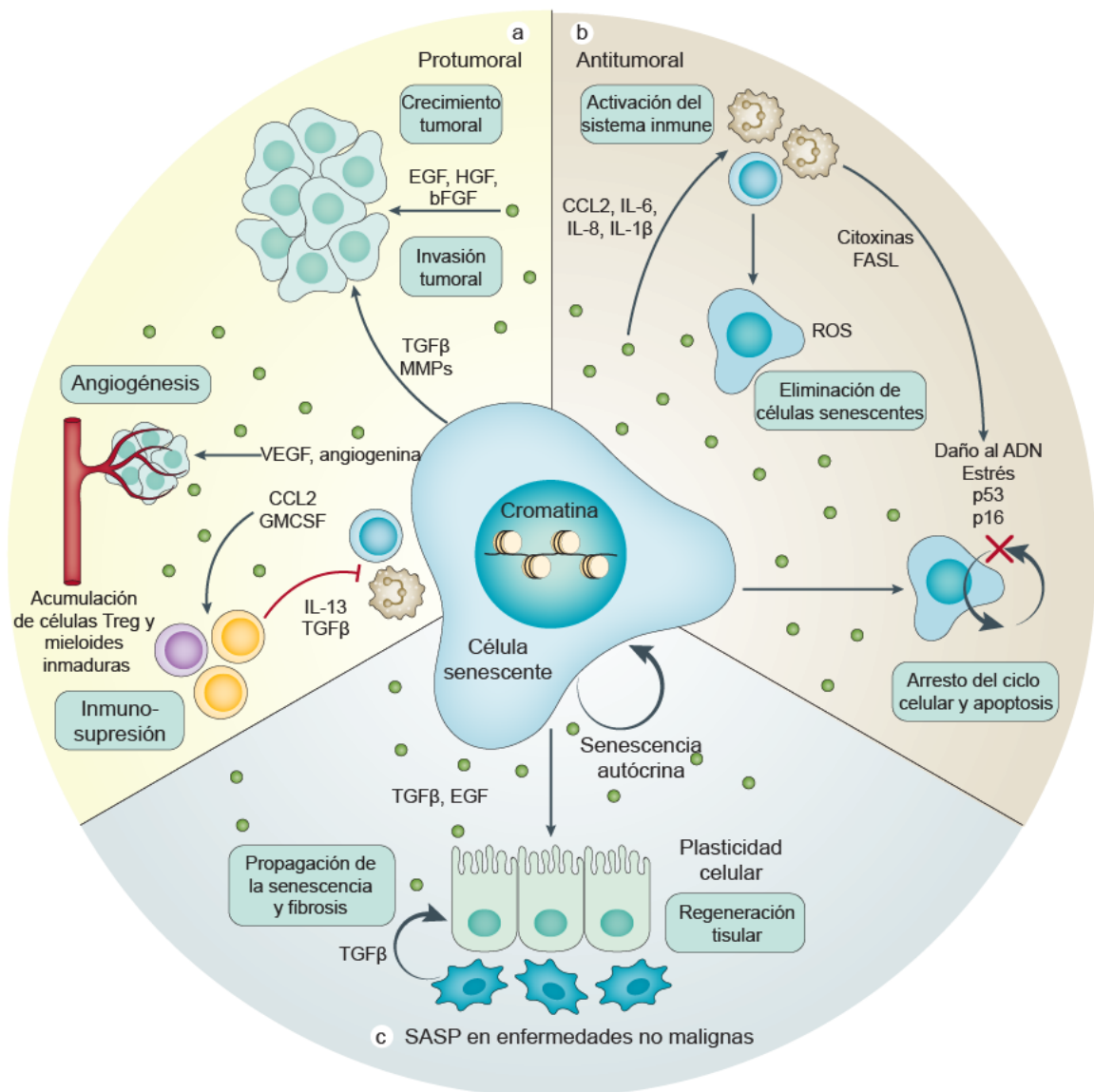


Figura 3. El SASP tiene efectos opuestos en tumorigénesis. El fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) comprende varias proteínas como citoquinas, factores de crecimiento, proteínas de remodelación de matriz extracelular y factores angiogénicos. El efecto de estos factores depende del contexto. **a. Efecto protumoral.** La exposición a largo plazo al SASP puede tener efectos perjudiciales. Las citoquinas pueden desviar las células inmunitarias hacia un fenotipo inmunosupresor o bloquear su diferenciación. La formación de nuevos vasos sanguíneos puede resultar en un aumento de la vascularización del tumor y, en combinación con proteínas de remodelación de matriz extracelular (metaloproteinasas de matriz (MMP)), puede promover las metástasis. El factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y factor de crecimiento de hepatocito (HGF) son un

ejemplo de factores del SASP que promueven la tumorigénesis. **b. Efecto antitumoral.** El SASP puede inducir una respuesta inmune atrayendo y activando células inmunes. Los neutrófilos y los macrófagos pueden promover el arresto del ciclo celular y apoptosis a través de la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), mientras que los linfocitos T citotóxicos pueden mediar la eliminación de las células senescentes a través de la liberación de ligandos pro-apoptóticos y citotoxinas (por ejemplo, miembro 6 de la superfamilia de ligandos de TNF (FASL), perforina, granzima, etc.). **c. Efecto en enfermedades no malignas.** Durante el daño agudo del tejido, las células senescentes incrementan la plasticidad del tejido y el potencial de regeneración mediante la secreción de factores de crecimiento y moduladores inmunitarios que apoyan la remodelación y reparación de tejidos. Sin embargo, en un entorno patológico crónico, cuando las células senescentes no son eliminadas, mediadores del SASP (en particular, factor de crecimiento transformante- β (TGF β)) promueven la expansión de fibroblastos aberrantes y fibrosis, promoviendo así la disfunción tisular. CCL2, quimioquina 2 con motivos C-C; GMCSF, factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago; VEGF, factor de crecimiento endotelial vascular. Adaptado de Frey y colaboradores, *Nat Rev* 2017.

3.3. INMUNOVIGILANCIA DE LAS CÉLULAS SENESCENTES

La inmunovigilancia de las células senescentes se refiere al proceso complejo mediante el cual las células del sistema inmune innato o adaptativo detectan y eliminan a las células senescentes.

Inmunovigilancia mediada por el sistema inmune innato

La primera evidencia de la inmunovigilancia de las células senescentes fue reportada por Xue y colaboradores, que demostraron que 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). 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 una estrategia terapéutica para activar una respuesta inmune antitumoral (Xue et al., 2007). Un trabajo posterior, demostró que la inmunovigilancia de las células senescentes permite la resolución de la fibrosis hepática (Krizhanovsky et al., 2008). Se encontraron células NK, macrófagos y neutrófilos cerca de las células senescentes en hígados fibróticos, pero solo las células NK

demonstraron matar selectivamente a las células hepáticas estrelladas senescentes *in vitro* e *in vivo* (Krizhanovsky et al., 2008). Sagiv y colaboradores, demostraron que la exocitosis de gránulos, pero no la apoptosis mediada por el receptor de muerte, se requiere para la muerte mediada por células NK de células senescentes (Sagiv & Krizhanovsky, 2013). Los ratones con defectos en la exocitosis de gránulos acumularon células estrelladas senescentes dentro del hígado después del daño que conduce a un aumento de la fibrosis. Trabajos posteriores demostraron que las células NK reconocen específicamente a las células senescentes porque se encuentran aumentados ciertos ligandos de receptores activadores de células NK como NKG2D, MICA y ULBP2 en senescencia replicativa, OIS o senescencia inducida por terapia (Antonangeli et al., 2016; Iannello et al., 2013; Sagiv et al., 2016). En un trabajo muy reciente, comprobaron que la eliminación de las células senescentes inducidas por inhibición de MAPK y de las quinasas 4/6 dependientes de ciclina (CDK4/6), depende de las células NK (Ruscetti et al., 2018).

Aunque las células NK han sido las más estudiadas en la inmunovigilancia de células senescentes, también se ha observado una participación de macrófagos en dicho proceso. El estudio de Lujambio y colaboradores, demostró que las células estrelladas senescentes que expresan p53 liberan factores que promueven la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M1 capaz de dirigirse a las células senescentes *in vitro* (Lujambio et al., 2013). Por otro lado, se ha observado que las células senescentes pueden reclutar macrófagos y que estos son importantes para eliminación eficaz de dichas células (Hall et al., 2016; Yun et al., 2015).

Inmunovigilancia mediada por el sistema inmune adaptativo

Se ha demostrado que la inmunovigilancia de hepatocitos senescentes pre-malignos está mediada por los linfocitos T CD4⁺ (Kang et al., 2011). En este trabajo demostraron que la expresión de moléculas de CMH clase II en los hepatocitos senescentes parece ser importante para su eliminación y que la activación de linfocitos T CD4⁺ requirió la presencia de monocitos y macrófagos (Kang et al., 2011). También se ha observado que, mientras que las células senescentes pueden promover el reclutamiento de linfocitos T para su eliminación, los linfocitos T también pueden inducir la senescencia en las

células tumorales como un mecanismo para limitar la progresión del cáncer (Braumüller et al., 2013). Por otro lado, se ha demostrado que durante la OIS, los melanocitos humanos expresan moléculas de CMH de clase II que pueden activar linfocitos T *in vitro* e *in vivo* (Joselow et al., 2017; van Tuyn et al., 2017). En este contexto, 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 los linfocitos T CD4⁺ (Rakhra et al., 2010).

Inmunosupresión durante la senescencia

Mientras que algunos estudios indican un efectivo positivo de la senescencia al inducir inmunovigilancia, otros reportes han demostrado que las células senescentes pueden establecer un microambiente inmunosupresor que favorece la tumorigénesis. En este contexto, Di Mitri y colaboradores observaron que la inducción de senescencia por pérdida de PTEN en tumores de próstata promueve una infiltración de células mieloides Gr-1⁺ que protegen a una fracción del tumor de la inducción de senescencia, sosteniendo el crecimiento tumoral (Di Mitri et al., 2014). Asimismo, se ha observado que la senescencia en células estromales induce un aumento del infiltrado de MDSCs mediado por IL-6, que inhibe la acción de los linfocitos T y favorece el crecimiento tumoral (Ruhland et al., 2016). Por otro lado, como mencionamos previamente, la presencia de CCL2 en células senescentes de carcinoma hepatocelular, es responsable reclutamiento de MDSCs, la inhibición de células NK, favoreciendo el crecimiento tumoral (Eggert et al., 2016).

4. PROTEINAS TRANSDUCTORAS DE SEÑALES Y ACTIVADORAS DE LA TRANSCRIPCIÓN (STAT)

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 (Stat1 α o p91 y Stat1 β o p84) y Stat3 (Stat3 α y Stat3 β). Las proteínas

resultantes contienen entre 750 y 850 aminoácidos y la estructura de sus 6 dominios es altamente homóloga y conservada.

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 (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2) o de SRC (Darnell et al., 1994; Taga & Kishimoto, 1997). Después de la fosforilación de residuos tirosina específicos, las Stats forman homodímeros o heterodímeros con otras Stats a través de interacciones entre sus dominios homólogos a SRC (SH2). 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. Es importante destacar que muchos de los genes modulados por las Stats codifican citoquinas y factores de crecimiento, cuyos receptores se señalizan a través de las mismas Stats, lo que proporciona un mecanismo de retroalimentación positiva. Por ejemplo, Stat3 puede ser fosforilado y activado por factores extrínsecos. Normalmente, la activación de Stat3 se induce mediante la fosforilación en un residuo de tirosina crítico (Tyr705) que desencadena su dimerización y migración al núcleo. Una vez allí, Stat3 regula la transcripción de citoquinas y factores protumorales, que conducen a la activación de Stat3 por una vía intrínseca (Figura 2).

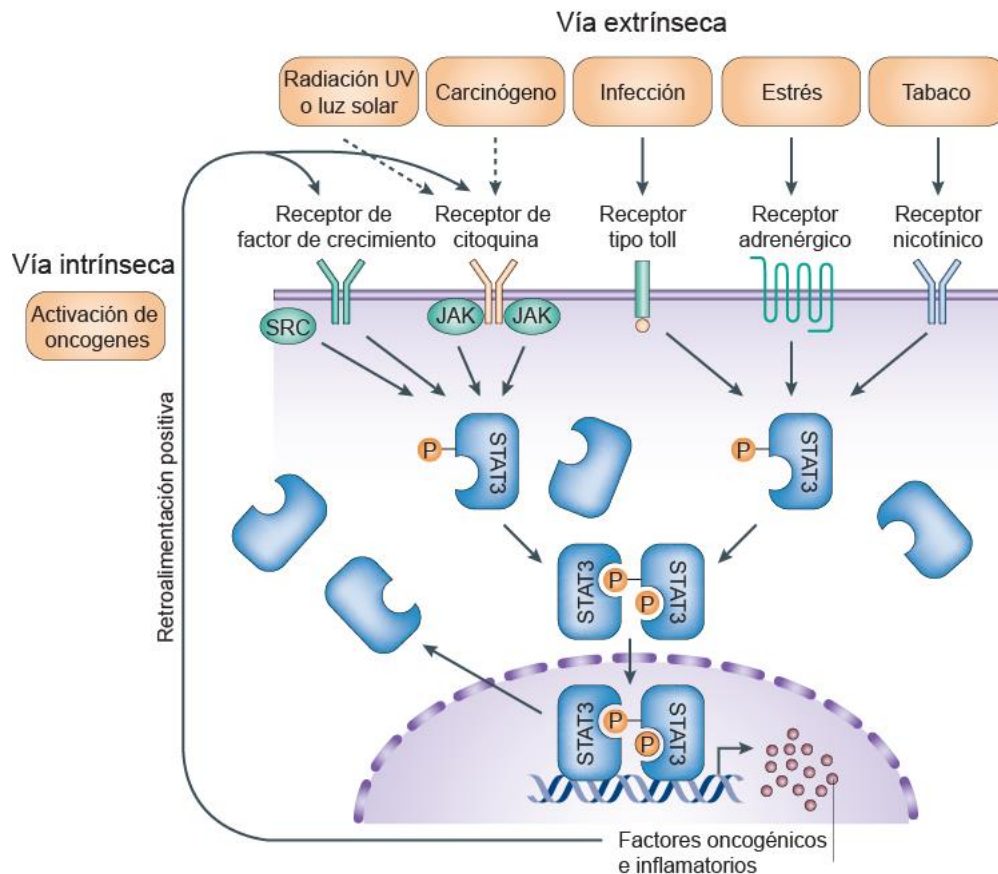


Figura 4. Stat3 vincula la inflamación y el cáncer. La inflamación y el cáncer son unidos por vías oncogénicas (intrínsecas) y ambientales (extrínsecas). La vía intrínseca se activa por alteraciones genéticas o epigenéticas en células transformadas. Dichas alteraciones incluyen aquellas que causan la sobreexpresión o la activación persistente de receptores del factor de crecimiento con actividad de tirosina quinasa intrínseca y receptores de citoquinas asociados a tirosina quinasas de la familia Janus quinasa (JAK). Estos receptores, así como las tirosina quinasas no receptoras tales como SRC, se pueden activar por vías extrínsecas, como factores ambientales vinculados a la inflamación asociada al cáncer, que incluye radiación ultravioleta (UV), carcinógenos químicos, infecciones, estrés y humo del tabaco. Las tirosina quinasas activadas, por vías intrínsecas o extrínsecas, fosforilan al transductor de la señal y activador de la transcripción 3 (Stat3), que a su vez forma dímeros que se translocan al núcleo, donde regulan directamente la expresión génica. Además de regular los numerosos genes involucrados en la proliferación, supervivencia, invasión y metástasis, Stat3 induce la expresión de muchas citoquinas, quimioquinas y otros mediadores, como la IL-6 y ciclooxigenasa 2, que está asociada con la inflamación que promueve el cáncer. Además, los receptores para muchas de estas citoquinas, quimioquinas y mediadores a su vez activan Stat3, formando así vías autocrinas y paracrinas de retroalimentación positiva que resultan en un cambio estable del programa genético y la promoción de la inflamación asociada al cáncer. P: fosforilación.

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). 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).

4.1. SEÑALIZACIÓN DE STAT3 EN CÁNCER

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 evasión de la apoptosis (c-fos, c-Myc, ciclina D1) (Bromberg et al., 1999; Leslie et al., 2006) y en la angiogénesis tumoral, como VEGF (Niu et al., 2002). Se probó además que Stat3 participa en los procesos de invasión y metástasis (Niu et al., 2002). 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 melanoma, 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 inmunosuprimidos cuando se inoculan células transfectadas con Stat3-C (Bromberg et al., 1999). Tales hallazgos reafirman la concepción de Stat3 como un oncogén ya que interviene 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 o mutaciones de ganancia de función de Stat3 pueden provocar la activación constitutiva de las Stat3 (Forbes et al., 2016). 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 autocrinos o paracrinos, 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).

4.2 STAT3 EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

La activación de Stat3 desempeña un papel central en el desarrollo de los tumores tanto de forma intrínseca en las células tumorales como a través de su capacidad para modular la actividad del microambiente tumoral (Figura 4). Diferentes estudios han identificado a Stat3 como una molécula importante en la mediación de la inmunosupresión inducida por tumores. 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, 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 donde demostraron que la inhibición de la actividad de Stat3 en células tumorales promueve la expresión de varias citoquinas proinflamatorias y quimioquinas. Por otro lado, Stat3 es un importante activador de genes cruciales para la inmunosupresión, ya que su activación en células tumorales promueve la secreción de factores inmunosupresores, como el factor de crecimiento endotelial vascular (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 microambiente tumoral, 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 y favorece la tumorigénesis.

Por ejemplo, la activación de Stat3 en macrófagos favorece la polarización hacia el subtipo M2 (Giurisato et al., 2018) y aumenta la expresión de PD-L1 (Wölfle et al., 2011) inhibiendo la respuesta inmune antitumoral. Por otro lado, Stat3 estimula el desarrollo y expansión de MDSCs y aumenta su capacidad para inhibir a los linfocitos T y promover el desarrollo de linfocitos Treg, favoreciendo la tumorigénesis (Mace et al., 2013; Vasquez-Dunddel et al., 2013). Asimismo, la eliminación de Stat3 en las MDSCs derivadas de pacientes, disminuye su capacidad inmunosupresora contra linfocitos T efectores (Hossain et al., 2015). Por otro lado, como mencionamos anteriormente, la activación de Stat3 induce la producción de IL-10 y VEGF en las células tumorales, que a su vez afectan negativamente la maduración de las células dendríticas, inhibiendo la expresión de CMH de clase II y de moléculas co-estimuladoras, y citoquinas como la IL-12 (Wang et al., 2004).

La activación de Stat3 en células del sistema inmune innato promueve el crecimiento de las células tumorales e inhibe la respuesta inmune antitumoral actuando a distintos niveles. Por un lado, la activación de Stat3 en neutrófilos reduce su capacidad citotóxica, disminuye la producción de citoquinas

proinflamatorias y la quimiotaxis estas células (Panopoulos et al., 2006). Además, la inhibición de Stat3 en neutrófilos aumenta su capacidad citotóxica e induce regresión tumoral (Kortylewski et al., 2005). Por otro lado, se ha observado que el silenciamiento de Stat3 en células NK aumenta la expresión de factores citotóxicos y su activación (Gotthardt et al., 2014).

En el caso de los linfocitos T, se ha observado que la delección de Stat3 en el compartimento hematopoyético, aumenta la actividad citotóxica y el infiltrado de linfocitos T CD8⁺ a los tumores a la vez que reduce el infiltrado de linfocitos Treg (Herrmann et al., 2014; Yue et al., 2015). Stat3 también media la diferenciación de linfocitos Treg actuando a distintos niveles. En primer lugar favorece la expansión de linfocitos Treg debido a la producción de IL-10 que, a su vez, aumenta la expresión de CTLA4 (Hsu et al., 2015). Por otro lado, Stat3 tiene la capacidad de inducir FOXP3, que es un regulador transcripcional clave de la diferenciación de linfocitos Treg (Kortylewski et al., 2009). Por último, se ha demostrado que el silenciamiento de Stat3 en linfocitos T, reduce la proliferación y producción de citoquinas antitumorales de los linfocitos T CD4⁺ (Schmetterer et al., 2015).

La activación de Stat3 en el micromambiente tumoral, también favorece el desarrollo de metástasis, en gran medida debido a la producción de VEGF por las células tumorales, pero también contribuyen otros tipos celulares. VEGF producido por las células tumorales promueve la angiogénesis y la proliferación de las células endoteliales (Yu et al., 2007). Por otro lado, la señalización de Stat3 en fibroblastos asociados a tumor y en las células tumorales favorece la remodelación del estroma del microambiente tumoral promoviendo la migración y la invasión de las células tumorales y la resistencia a terapias (Nagathihalli et al., 2015).

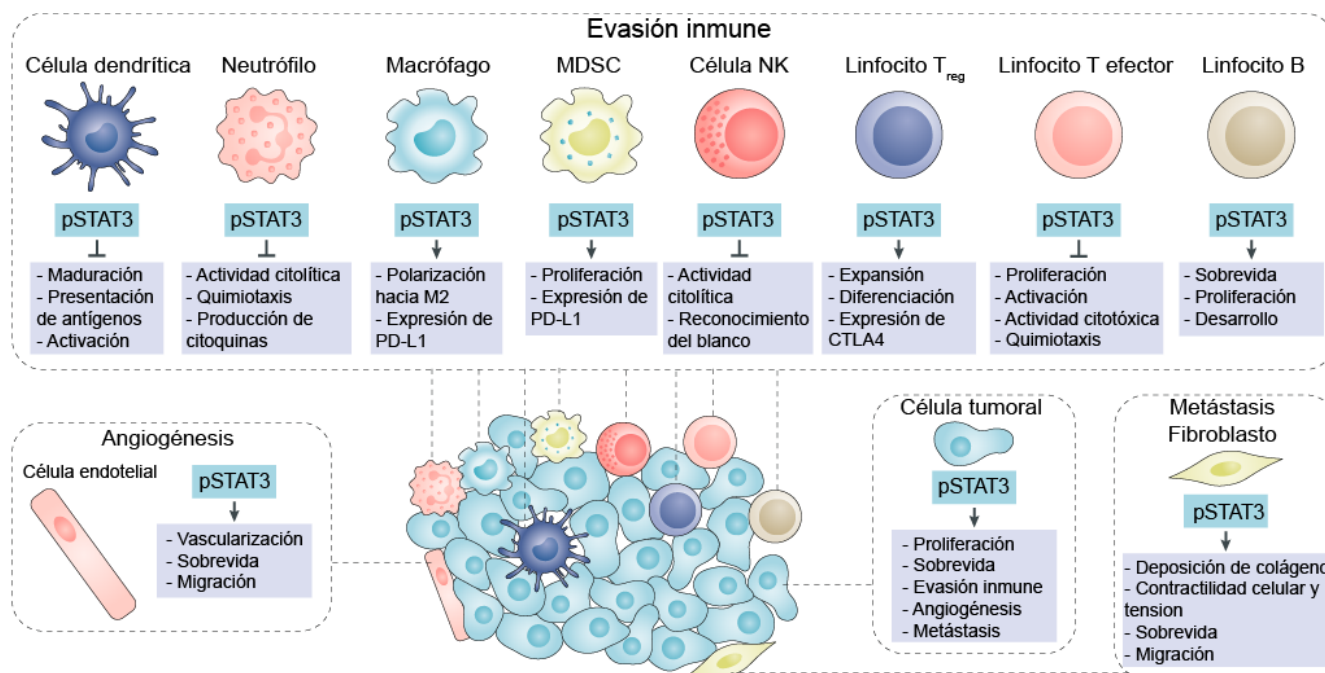


Figura 5. Señalización de Stat3 en el microambiente tumoral. La activación de Stat3 en células dendríticas compromete la maduración, activación y presentación antigénica. La activación de Stat3 en neutrófilos, células NK y linfocitos T CD8⁺ limita su actividad citotóxica. La polarización de macrófagos hacia el fenotipo M2 se ve favorecida por la actividad de Stat3, mientras que la señalización de Stat3 favorece la proliferación de células mieloides inmunosupresoras (MDSC). La activación de Stat3 es importante para la acumulación y el enriquecimiento de los linfocitos Treg en el microambiente tumoral. El desarrollo, proliferación y supervivencia de los linfocitos B inducidos por Stat3 también promueve tumorigénesis. La remodelación del estroma tumoral está mediada por fibroblastos, por lo que la señalización de Stat3 en células tumorales y los fibroblastos impulsan la producción de matriz extracelular. Factores angiogénicos liberados por células tumorales como VEGF y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) dependen de Stat3 y actúan sobre las células endoteliales para impulsar la vascularización tumoral. pStat3: Stat3 fosforilado. La flecha con punta significa activación, mientras que la flecha con guión indica inhibición. Adaptado de Huynh Nat Rev Cancer 2018.

Por todo lo expuesto, Stat3 favorece muchas de las características del cáncer, incluidas el crecimiento celular, la proliferación, la supervivencia, evasión inmune, metástasis y angiogénesis. A esto se suman los efectos inmunosupresores que confiere Stat3 en células del sistema inmune innato y adaptativo, así como la promoción de la tumorigénesis provocada por los fibroblastos y células endoteliales. 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 anti-tumoral 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.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Numerosas evidencias previas han demostrado que la activación constitutiva de Stat3 en varios tipos de tumores favorece la evasión del ataque del sistema inmune mediante múltiples mecanismos. Además, varios trabajos, incluidos antecedentes de nuestro laboratorio, demuestran que la inhibición de la activación de Stat3, revierte la inmunosupresión y favorece una respuesta antitumoral. Sin embargo, a pesar de muchos años de esfuerzo por desarrollar terapias dirigidas contra Stat3, éstas han tenido poco éxito en los ensayos clínicos debido a su alta toxicidad. Por ello, dilucidar los mecanismos moleculares que intervienen en el efecto antitumoral desencadenado por la inhibición de Stat3, podría llevar a mejor un direccionamiento de las terapias contra este oncogén y su combinación con otros tratamientos.

En este contexto, postulamos que la respuesta inmune antitumoral observada tras la inhibición de Stat3, se debería a un efecto paracrino mediado por un secretoma asociado a senescencia inducida por inactivación de oncogenes. Además, proponemos que la caracterización de los componentes de dicho secretoma y los mecanismos que los modulan permitirían definir qué tipo de tumores podría responder a una terapia dirigida contra Stat3.

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral fue caracterizar el mecanismo de senescencia celular inducido por la inhibición de Stat3 y diseñar una inmunoterapia contra el cáncer de mama y melanoma basada en el SASP de las células senescentes para una futura aplicación clínica.

Los **objetivos específicos** de esta Tesis Doctoral son:

Objetivo específico #1: Caracterizar el mecanismo de senescencia celular inducido por inhibición de Stat3 *in vitro* e *in vivo*.

Objetivo específico #2: Estudiar la actividad del SASP inducido por inhibición de Stat3 sobre células del microambiente y células tumorales *in vitro*.

Objetivo específico #3: Diseñar una inmunoterapia basada en la aplicación *in vivo* del SASP de células senescentes inducido por inhibición de Stat3.

Objetivo específico #4: Identificar los componentes del SASP inducido por inhibición de Stat3 responsables de promover inmunovigilancia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Las células de tumor mamario humano T47D, BT-474, MDA-MB-468, MDA-MB 231, de tumor mamario murino 4T1, de carcinoma de colon de ratón CT-26, células endoteliales HUVEC y de linfoma de ratón YAC-1 fueron obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EEUU). Las células de tumor mamario humano JIMT-1 fueron obtenidas del *German Resource for Biological Material* (Braunschweig, Germany) y las KPL-4 fueron donadas por el Dr. Kurebayashi (Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan). En esta Tesis utilizamos las células de melanoma B16 transfectadas para que expresen el antígeno ovoalbúmina (OVA), clon MO5, y a partir de ahora las llamaremos B16. Las células B16, junto con las células de fibrosarcoma murino MCA101 fueron donadas por la Dra. Piaggio (Institute Curie, París, Francia). Las líneas celulares T47D, MDA-MB-231, JIMT-1, KPL-4, MDA-MB-468, B16, HUVEC y MCA101 fueron mantenidas en medio DMEM/F12 (Life Technologies, Grand Island, NY). Las células 4T1, CT26, BT-474 y YAC-1 se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Life Technologies, Grand Island, NY). Los medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB, Internegocios, Córdoba, Argentina). Las células B16 que expresan OVA, se mantuvieron con el antibiótico G418 (0,5 mg/ml). Se determinó de manera rutinaria la contaminación por micoplasma.

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 macho de la cepa C57BL/6 de 2 meses de edad, fueron provistos por el bioterio del Instituto Curie, París, Francia. Los animales se mantuvieron en el bioterio del IBYME o del Instituto Curie, 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 los correspondientes CICUAL del IBYME y del Instituto Curie.

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 et al., 1986; Proietti et al., 2005; Salatino et al., 2004). El MPA se administra en forma de *pellet* (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. Primero se realizó una disgregación mecánica y luego enzimática (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, DMEM/F12sin rojo fenol (Life Technologies, Grand Island, NY) + 10% SFB de complementado. El suero se de complementó previamente calentándolo a 56°C durante 30 min. 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 min. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en solución de lavado (DMEM/F12 + 2% SFB), dejando sedimentar durante 20 min; 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. El MPA (6 α -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 *pellet* (40 mg/ratón).

Transfecciones con ARN de interferencia (siRNA)

Los siRNAs dirigidos contra Stat3, p16^{INK4a} y p21^{CIP1} 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'. El número de catálogo del siRNA contra p16^{INK4a} murino utilizado es J-043107-06 y el de p21^{CIP1} humano es LQ-003471-00 (Dharmacon). Como siRNA control, se utilizó un siRNA, que no corresponde a ninguna secuencia conocida de genes de mamíferos, también comprado a Dharmacon. Las células fueron transfectadas durante 48 h con 25 a 100 nM de siRNAs, según el experimento,

con el reactivo de transfección DharmaFECT 1 (Dharmacon) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Evaluación de la enzima β -galactosidasa (β -gal)

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos y transfectadas con siRNA contra Stat3 o control como se describió 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) compuesta por 1 mM MgCl₂, 1 mg/mL 5-bromo-4-cloro-3-indolil P3-D-galactósido (X-Gal) (Sigma), 5 mM de ferrocianuro de potasio, 5 mM de ferricianuro de potasio, 40 mM de ácido cítrico/fosfato de sodio, 150 mM de NaCl, pH 6,0. Al día siguiente se lavaron las células 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). En el caso de la tinción para la enzima β -Gal en cortes de tumores, se realizó la extracción de los mismos, que rápidamente fueron embebidos en el compuesto de temperatura óptima de corte (OCT, del inglés *optimal cutting temperature compound*) (Biopack, Argentina) y congelados en nitrógeno líquido. Inmediatamente se realizaron cortes de los tumores de 4 μ m en criostato y se colocaron en vidrios portaobjetos. Las muestras se fijaron en una solución 1% de formaldehído en PBS por 1 min, y luego se lavaron tres veces con PBS. Las muestras se incubaron durante 18 h a 37 °C (sin CO₂) con la solución de tinción de la SA- β -Gal descrita previamente. Por último, los vidrios se dejaron secar y luego se observaron a microscopio de campo claro.

Ensayo de Western blot (WB)

Los extractos proteicos totales de células sometidas a las distintas transfecciones y/o tratamientos, 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.

Los extractos proteicos se corrieron en geles de poliacrilamida desnaturizante 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% acrilamida/bisacrilamida 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 30 min a temperatura ambiente con leche descremada 5% p/v en PBS+tween 20 0,1% v/v (PBS-T 0,1% v/v). Las membranas se incubaron con los siguientes anticuerpos diluidos en PBS-T 0,1% v/v o con seroalbúmina bovina (SAB) 5% p/v durante 18 h a 4° C con agitación, según el anticuerpo:

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para identificación de proteínas por WB

Anticuerpo	Clon	Isotipo	Empresa	Dilución
Fosfotirosina Stat3 (Y705)	D3A7	monoclonal de conejo	Cell signaling	1/1000 SAB 5% p/v
IFI35	B-1	monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology	1/500 PBS-T 0,1% v/v
ISG15	F-9	monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology	1/500 PBS-T 0,1% v/v
p16^{INK4a}	F-12	policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/500 PBS-T 0,1% v/v
p21^{CIP1}	C-19	policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/500 PBS-T 0,1% v/v
Stat3	C-20	policlonal de conejo	Santa Cruz Biotechnology	1/10000 PBS-T 0,1% v/v
β-tubulina	AA2	monoclonal de ratón	Sigma	1/100000 PBS-T 0,1% v/v

Luego de 3 lavados de 10 min en PBS-T, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (HRP, del inglés

horse radish peroxidase) anti ratón o anti conejo, 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. Posteriormente, las membranas se incubaron 30 min a 50°C con solución de *stripping* (2- β mercaptoetanol 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-T, las membranas se bloquearon durante 18 h en leche descremada 5% p/v y se incubaron al día siguiente con el anticuerpo contra la proteína total correspondiente.

Análisis estadístico: 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 β -tubulina corrida en el mismo gel. En el caso de los WB donde se corrieron medios condicionados de cultivo, se realizó una tinción de proteínas totales de la membrana teñida con la solución de Rojo Ponceau y las proteínas reveladas fueron relativizadas al contenido proteico total en cada banda de la membrana.

Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos y transfectadas con siRNA contra Stat3 o control como se describió anteriormente. Las células fueron fijadas y permeabilizadas en metanol a -20°C y luego bloqueadas con PBS + SAB 1% a temperatura ambiente durante 30 min. La incubación con el anticuerpo **Trimetil K9 H3**, Clon 6F12-H4, monoclonal de conejo, (Millipore, Temecula, CA, EEUU) se llevó a cabo en PBS + SAB 1% durante 18 h a 4°C, utilizando una dilución del anticuerpo de 1/100.

Luego de 3 lavados de 10 min con PBS + SAB 1%, los cubreobjetos con células fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo de cabra anti IgG de conejo conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen); Los controles negativos se realizaron incubando las células

con PBS1% SAB en lugar del anticuerpo primario, seguido de la incubación con los anticuerpos secundarios. Los núcleos fueron teñidos con yoduro de propidio (Sigma) utilizado en una dilución de 2 ng/ml. Para cada tratamiento se analizaron 50 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.

Colección de medios condicionados (MC)

Las células 4T1, B16, MCA101 y MDA-MB-231 fueron sembradas en placas de 100 mm³ y transfectadas con 100 nmol/L de siRNA contra Stat3 o un siRNA Control durante 48 h en medio completo, como se describió previamente. Luego, las células se lavaron tres veces con PBS y luego se cultivaron durante 24 h adicionales en medio sin suero. Los medios condicionados (MC) se centrifugaron a 2000 g durante 5 min para eliminar los restos celulares. En este paso, los MC se almacenaron a -80 °C hasta su uso o fueron utilizados inmediatamente para ensayos *in vitro*. En todos los ensayos *in vitro* se utilizó una proporción de 50% de MC + 50% de medio de cultivo completo (DMEM/F12 o RPMI + 10% SFB). Para la administración *in vivo* de los MC, luego de la centrifugación, se concentraron aproximadamente 20 veces utilizando unidades de filtración con un corte de peso molecular de 3 kDa (Millipore, USA), se filtraron con filtros de jeringa de 0,22 µm de tamaño de poro y se liofilizaron. Una vez obtenido el liofilizado, los mezclamos con un polímero sintético de etilvinilacetato (Elvax®) para formar un *pellet* que, al ser implantado de forma subcutánea en el ratón, libera lentamente su contenido (Kumamoto et al., 2002). Los *pellets* generados para cada ratón, se obtuvieron partiendo de 2 ml de MC-siControl o MC-siStat3. Para que los *pellets* tuvieran la misma cantidad de proteína, relativizamos el volumen de los MC a la concentración de proteínas en el extracto proteico de las células o número de células al final del experimento. Según nuestras determinaciones de concentración de proteínas por Bradford, en estas condiciones, el MC-siControl y el MC-siStat3 tienen niveles similares de concentración de proteínas. Durante la Tesis llamamos MC-siControl al MC que proviene de células transfectadas

con un siRNA Control o MC-siStat3 al MC de células transfectadas con un siRNA contra Stat3.

Ensayos de proliferación por incorporación de timidina [³H]

Para realizar los ensayos de proliferación, las células 4T1, B16, MCA101, T47D, MDA-MB-231, HUVEC se sembraron en placas de 96 hoyos de fondo plano. Luego se transfectaron con los siRNAs o se cultivaron con los MC, según corresponda durante 48 h. 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 18 h 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/EDTA (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 min por métodos estándar de centelleo líquido. Previamente se demostró que la incorporación de timidina [³H] se correlacionó 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).

Análisis estadístico: En cada experimento individual se promediaron los octuplicados, se calcularon las cpm \pm 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.

Ensayos de migración

Con el fin de evaluar la motilidad celular, se realizaron ensayos de “cierre de herida”. Brevemente, se generaron heridas de 400 μ M de ancho en monocapas confluentes de células 4T1, B16 y MDA-MB-231. A continuación, las células se lavaron con PBS estéril y se las incubó con los MC-siControl o MC-siStat3 obtenidos del mismo tipo celular a 37°C durante 12 h, para permitir la migración de las mismas hacia el espacio libre dejado por la herida. El área

libre de células se fotografió al momento de realizarse la herida y tras la incubación de 12 h. La cuantificación se realizó con el programa ImageJ (NIH) (Schneider et al., 2012).

Experimentos *in vivo*

Inmunización profiláctica contra el tumor C4HD

Para obtener las células C4HD salvajes irradiadas, se realizó una suspensión celular que se irradió con 50 Gy de una fuente de cobalto (^{60}Co). 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 (datos no mostrados). Ratones hembras BALB/c de 8 semanas de edad (n=5) se inyectaron s.c. en el flanco derecho con 1×10^6 células C4HD irradiadas junto con el *pellet* de MC-siStat3 o MC-siControl a las 6, 4 y 2 semanas antes del desafío tumoral. El desafío tumoral se efectuó inoculando subcutáneamente a los ratones de la cepa BALB/c con un fragmento (1 mm^3) del tumor parental C4HD. Simultáneamente a la exposición al tumor C4HD, los ratones se inocularon con *pellet* de MPA como se describió previamente. El grupo control incluye ratones inyectados con PBS. Se midió el largo (L) y el ancho (A) de los tumores con un calibre de Vernier calculando tres veces por semana el volumen tumoral como $(L \times A^2)/2$.

Inmunización terapéutica contra los tumores 4T1 y B16

Se inyectaron ratones BALB/c o C57BL/6 s.c. con 1×10^4 células 4T1 o 1×10^5 células B16, respectivamente. Cuando los tumores alcanzaron 50 mm^3 , se inmunizaron con 1×10^6 4T1 o B16 irradiados s.c. Las mismas fueron obtenidas por irradiación con 100 Gy de una fuente de cobalto (^{60}Co). Simultáneamente, se administró el *pellet* de MC-siStat3 o MC-siControl s.c a los días 7, 4 y 21 con la inyección de las células 4T1 irradiadas y a los días 5, 10 y 15 en el caso de las células B16. En el caso del experimento con células B16, se inyectaron además 3 grupos experimentales con un anticuerpo anti-PD-1 (clon RMP1-14) 5 mg/kg i.p. cada 3 días. Los grupos controles incluyeron

ratones inyectados, siguiendo el mismo esquema, con el vehículo (100µl de PBS estéril). En todos los experimentos, se midió el largo (L) y el ancho (A) de los tumores con un calibre de Vernier calculando tres veces por semana el volumen tumoral como $(L \times A^2)/2$. Los animales se controlaron y el crecimiento del tumor se midió tres veces a la semana como se describió anteriormente (13). En el experimento de sobrevida de ratones portadores del tumor B16, se consideró como deceso cuando los animales mueren o se sacrifican cuando el volumen del tumor supera 1000 mm³.

Tratamiento con JSI-124

Se utilizó el inhibidor farmacológico JSI-124 (Calbiochem, La Jolla, CA, EEUU) para inhibir la fosforilación de Stat3 *in vivo*, el cual se administró en PBS + 10% DMSO. Se inyectaron ratones BALB/c o C57BL/6 con 1×10^4 células 4T1 o 1×10^5 células B16 s.c., respectivamente. Cuando los tumores alcanzaron los 100 mm³, se trataron diariamente con 1 mg/kg de JSI-124 i.p. todos los días durante 10 días. Como control se inyectó PBS + 10%DMSO i.p. Se midió el largo (L) y el ancho (A) de los tumores con un calibre de Vernier calculando tres veces por semana el volumen tumoral. El volumen tumoral se calculó como $(L \times A^2)/2$.

Evaluación de metástasis pulmonares

Los ratones BALB/c (n =5) con tumores 4T1 fueron sacrificados al día 10 o 32, según el experimento. En el caso de los pulmones obtenidos al día 32, se fijaron con la solución de Bouin (ácido acético 5%, formaldehído 9%, ácido pícrico 0.9%) y se contó el número de colonias pulmonares superficiales mediante observación en lupa. Por otro lado, en los experimentos finalizados al día 10, se realizaron cortes histológicos de los pulmones y se contó el número de micrometástasis en el microscopio de campo claro.

Análisis de poblaciones inmunes

Para el análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo, los tumores y bazos fueron disgregados de forma mecánica hasta obtener

fragmentos pequeños usando una tijera de punta curva. En el caso de los tumores, se realizó una posterior digestión enzimática durante 30 min a 37°C con agitación en 2mL de un cóctel enzimático conteniendo 2 mg/mL de colagenasa IV y 50 U/mL de DNAsa I (Roche). Luego las suspensiones fueron filtradas con *Cell Strainers* con un tamaño de poro de 70 µm (BD Biosciences). En la mayoría de los experimentos donde se utilizó citometría de flujo las células mononucleares infiltrantes de tumores fueron enriquecidas mediante la centrifugación de las suspensiones celulares en gradientes de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare), excepto en aquellos donde se evaluó la frecuencia de distintas poblaciones leucocitarias infiltrantes donde se realizaron tinciones de las suspensiones celulares directamente. Por otro lado, a la suspensión obtenida de los bazo luego de la digestión mecánica, se le agregó 3 ml de RPMI, se homogeneizó y se pasó la suspensión por filtros de 70 µm. Luego del lavado con RPMI, se lisaron los glóbulos rojos con buffer de lisis ACK (NH₄Cl 8,024 g/l, KHCO₃ 1,001 g/l, EDTA.2H₂O 37 mg/l) durante 5 min a temperatura ambiente y luego se lavaron con PBS.

Citometría de flujo

Las suspensiones celulares obtenidas mediante los métodos de disgregación fueron teñidas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos murinos y humanos detallados en la tabla que se encuentra a continuación. Las células muertas fueron excluidas de los análisis utilizando una tinción de viabilidad el reactivo Zombie Aqua (Biolegend). En general por cada tinción se utilizaron de 5x10⁴ a 2x10⁶ células, dependiendo del ensayo. Las células fueron incubadas por 30 min a 4°C con los anticuerpos y luego fueron lavadas con PBS 1% SAB. Para tinciones intracelulares, como FOXP3, las células fueron fijadas y permeabilizadas según las indicaciones del fabricante con el kit "Foxp3 *Staining Buffer Set*" (eBioscience). Las células fijadas y permeabilizadas fueron teñidas con anticuerpos marcados dirigidos a proteínas intracelulares a temperatura ambiente por 1 h. 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 el fluorocromo correspondiente. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo

FACSCanto II o LSRFortessa (BD Biosciences) y los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo (TreeStar, Inc, Ashland, OR, EEUU). Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales:

Tabla 1. Anticuerpos y fluorocromos utilizados citometría de flujo.

Antígeno	Clon	Fluorocromo	Compañía
CD107a	1D4B	FITC	Biolegend
CD11b	M1/70	PE/Cy5	Biolegend
CD25	PC61	APC	BD Pharmingen
CD3	17A2	Pacific Blue	Biolegend
CD4	GK1.5	PerCP/Cy5.5	Biolegend
CD44	IM7	PE	Biolegend
CD45.2	104	PE/Cy7	BD Pharmingen
CD49b	DX5	APC	Biolegend
CD49b	DX5	PE/Cy7	Biolegend
CD62L	MEL-14	APC	BD Pharmingen
CD69	H1.2F3	FITC	Biolegend
CD8	53-6.7	PE/Cy7	BD Pharmingen
FOXP3	MF-14	PE	Biolegend
Gr1	RB6-8C5	PE/Cy7	Biolegend
TCRβ	H57-597	APC/Cy7	BD Pharmingen

Estimulación de linfocitos T *in vitro*

Se purificaron linfocitos T de ratones BALB/c o C57BL/6 a partir de suspensiones celulares de esplenocitos obtenidas del bazo como se describió previamente. La purificación se realizó utilizando el kit de selección negativa “EasySep Mouse T Cell Isolation Kit” (StemCell Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los ensayos, los linfocitos T purificados se cultivaron durante 72 h con los MC indicados y con partículas magnéticas anti-CD3/CD28 (Gibco, ThermoScientific). Se realizaron ensayos de proliferación cultivando 8×10^4 linfocitos T por hoyo de placas p96 con una relación 0,5:1 de partículas magnéticas sobre células. Las últimas 6 h del cultivo, se adicionó 1 μ Ci de timidina [3 H] (New England Nuclear, Dupont, Boston, MA, EEUU, actividad específica: 20 Ci/mmol) en cada hoyo y se determinó la proliferación como se describió previamente. En algunos casos, se agregaron durante todo el cultivo 10 μ g/ml de anticuerpos bloqueantes contra CCL2 (2H5) y CXCR3 (CD183) (BioXCell, West Lebanon, USA) o contra IL-

15(AF447-SP) y CCL5 (AF478-SP) (RyD, Redwood City, CA, EEUU). Por otro lado, en los ensayos de diferenciación, se incubaron 2×10^5 por hoyo de placas p96, con una relación 0,1:1 de partículas magnéticas sobre células. Al finalizar el cultivo, las células se marcaron con anticuerpos anti-CD3, CD4, CD8, CD62L, CD44 y CD69 como se describió anteriormente, para determinar el estado de diferenciación y activación de los linfocitos T.

Degranulación de células NK

Para la evaluación de la degranulación de células NK, se cocultivaron 1×10^4 células YAC-1 (célula blanco) con esplenocitos aislados del bazo de los ratones inmunizados *in vivo* (célula efectora) en con distintas relaciones célula efectora: célula blanco (50:1, 100:1 o 200:1). 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) o el correspondiente control de isotipo. A continuación se lavaron las células y se marcaron anticuerpo anti CD3 y CD49b como se describió previamente. Se seleccionaron las células NK (CD3⁻DX5⁺) para determinar el porcentaje de CD107a⁺ en esta población.

ELISPOT

Dado que el tumor B16 utilizado expresa el antígeno OVA, estudiamos la presencia de linfocitos T específicos contra el tumor, en sangre periférica mediante la técnica de ELISPOT (del inglés, *enzyme-linked immunospot*). Este método se basa en la detección de la secreción de citoquinas por linfocitos T específicos de antígeno tras la estimulación con un péptido deseado. Brevemente, incubamos durante 24 h células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de los ratones estimulados con el péptido sintético de OVA restringido al MHC de clase I, OVA257-264 (SIINFEKL, Invivogen, San Diego, USA). Detectamos la producción de IFN γ con un sistema enzimático que emplea sustratos cromogénicos. La reacción se visualiza como manchas y da una medida semicuantitativa de cada linfocito T que responde.

Arreglo de anticuerpos

Se colectaron los MC-siControl y MC-siStat3 de células 4T1 y B16 como se describió anteriormente. Se utilizaron arreglos de anticuerpos de citoquinas y quimioquinas en membranas de nitrocelulosa (RyD, Redwood City, CA, EEUU), las cuales fueron incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con los MC. 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.

ELISA

Las células 4T1, B16 y MCA101 fueron transfectadas con un siRNA control o específico contra Stat3 y se colectaron los MC como se describió previamente. Mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) se determinó la cantidad de CXCL10 e IL-6 (RyD, Redwood City, CA, EEUU), y de CCL2, CCL2, IL-15 e IL-1 β (PeproTech, Rocky Hill, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Proteómica

Preparación de las muestras

Se cultivaron las células 4T1 durante 8 pasajes en el medio para SILAC, DMEM libre de Arginina (Arg) y Lisina (Lys) suplementado con isótopos "livianos" ($^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_2\text{-Lys}$ y $^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_4\text{-Arg}$) o "pesados" ($^{12}\text{C}_6^{15}\text{N}_2\text{Lys}$ y $^{12}\text{C}_6^{15}\text{N}_4\text{-Arg}$). El marcado de isótopos estables se confirmó por cromatografía líquida, seguida de espectrometría de masas, luego de la separación de las proteínas en gel y la digestión enzimática de las bandas azules. Las células 4T1 marcadas con el medio con aminoácidos "livianos" se transfectaron con un siRNA control y las células marcadas con el medio "pesado" se transfectaron con un siRNA contra Stat3. Después de 48 h de transfección, las células se lavaron 5 veces con PBS y se cultivaron durante otras 24 h en medio sin suero. Se recolectaron tres secretomas de experimentos independientes (volumen total: 5 ml/condición), las muestras se mezclaron en una proporción de 1:1 y se

filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,2 μm . Las muestras se concentraron hasta 500 μl utilizando unidades de filtración con un corte de peso molecular de 3 kDa (Millipore, USA).

Digestión enzimática

Los secretomas mezclados en una proporción de 1:1 fueron sometidos a una preparación de muestra asistida por filtro (FASP, del inglés *filter aided simple preparation*), y luego se fraccionaron a través de una fuerte separación de intercambio aniónico (SAX). El 90% de cada muestra se diluyó en 500 μl de bicarbonato de amonio 25 mM (ABC) antes de la reducción con ditiotreitól 5 mM a 37 °C durante una hora y la alquilación con yodocacetamida 10 mM durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Las muestras se procesaron a continuación mediante un procedimiento FASP utilizando dispositivos Nanosep de 3 kDa (Pall), de acuerdo con los protocolos estándar. Brevemente, la muestra se cargó en los dispositivos de filtración y se centrifugó a 13.000 g durante 25 min. Se añadieron 500 μl de ABC 25 mM y se concentraron de nuevo. Este paso se repitió dos veces. El concentrado resultante se diluyó a 200 μl con ABC 25 mM y se agregaron 2 μg de tripsina/LysC. Después de la incubación durante la noche a temperatura ambiente, los péptidos se recogieron mediante centrifugación en unidades filtrantes durante 5 min. El fraccionamiento de péptidos basado en SAX se realizó como se describe (Wiśniewski et al., 2009). Las seis fracciones eluidas por pH se cargaron en una punta de micropipeta empacada con SepPak C18 casera para desalinizar (principio mediante el apilamiento de un 3M Empore SPE Extraction Disk Octadecyl (C18) y perlas de SepPak C18 CartidgeWaters en una punta de micropipeta de 200 μL). Las muestras desaladas se reconstituyeron en el buffer de inyección (MeCN al 2%, TFA al 0,3%) antes del análisis.

Análisis por cromatografía líquida y espectrometría de masas

La cromatografía líquida (CL) se realizó con un sistema RSLCnano (Ultimate 3000, ThermoScientific) acoplado en línea a un espectrómetro de masas OrbitrapFusionTribrid (ThermoScientific). Los péptidos fueron atrapados en una columna C18 (75 μm de diámetro interno x 2 cm; nanoViperAcclaimPepMapTM 100, ThermoScientific) con buffer A (2/98 MeCN / H₂O en ácido fórmico al 0,1%) a un caudal de 4.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 4 min. La

separación se realizó en una columna C18 de 50 cm x 75 µm (nanoViperAcclaimPepMap™ RSLC, 2 µm, 100Å, ThermoScientific) regulada a una temperatura de 55 °C con un gradiente lineal de 5% a 25% de buffer B (100% MeCN en ácido fórmico al 0,1%) a un caudal de 300 nL/min durante 100 min. La espectrometría de masas de escaneo completo se adquirió en el analizador Orbitrap con una resolución establecida en 120,000 y los iones de cada escaneo completo se fragmentaron y se analizaron en la trampa de iones lineales.

Procesamiento de datos e identificación de proteínas

Los datos se buscaron en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot Mus musculus utilizando SequestHT a través de Thermo Scientific Proteome Discoverer (v 2.1). Las tolerancias de masa en MS y MS / MS se ajustaron a 10 ppm y 0,6 Da, respectivamente. Establecimos carbamidometilcisteína, oxidación de metionina, acetilación N-terminal, $^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_2\text{-Lys}$, $^{12}\text{C}_6^{14}\text{N}_4\text{-Arg}$, $^{12}\text{C}_6^{15}\text{N}_2\text{Lys}$ y $^{12}\text{C}_6^{15}\text{N}_4\text{-Arg}$ como modificaciones variables. Establecimos la especificidad de la digestión con tripsina y permitimos dos sitios de escisión perdidos.

Los archivos resultantes se procesaron posteriormente utilizando myProMS (v 3.5) (Pouillet et al., 2007). El objetivo de Sequest HT y el resultado de búsqueda de señuelo se validaron a una tasa de descubrimiento falso (FDR) del 1% con Percolator. Para la cuantificación de proteínas basada en SILAC, los péptidos XIC (cromatogramas de iones extraídos) se recuperaron de Thermo Scientific Proteome Discoverer. La normalización global de MAD se aplicó a la señal total para corregir los XIC para cada réplica biológica (n = 3). Las proporciones de proteínas se calcularon como la media geométrica de los péptidos relacionados. Para estimar la importancia de la relación, se realizó una prueba t con el paquete R limma (Ritchie et al., 2015) y la tasa de descubrimiento falso se ha controlado gracias al procedimiento Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995) con un umbral en 0.05, y todas las proteínas identificadas tienen al menos 2 péptidos cuantificados.

Análisis de datos del TCGA

Se descargaron datos de expresión de cáncer de mama de técnicas de RNA-seq, Microarray e iTRAQ (etiqueta isobárica para cuantificación relativa y absoluta) del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA Weinstein et al., 2013) utilizando el software TCGA-Assembler (Wei et al., 2018). Solo se conservaron muestras de tumores primarios, obteniendo un total de 1095 muestras de RNA-seq, 528 muestras de Microarray y 105 muestras iTRAQ. De esas 105 muestras de iTRAQ, 28 se descartaron (77 se mantuvieron) después de un control de calidad de varianza (Mertins et al., 2016). Los datos se normalizaron de modo que la expresión tuviera distribuciones similares entre las muestras. Las muestras se clasificaron en subtipos intrínsecos de cáncer de mama según la firma molecular PAM50 (Parker et al., 2009), utilizando el paquete PBCMC (Fresno et al., 2018) R con 10000 permutaciones, un umbral de significación de 0,01 y un límite de correlación de 0,1. Para hacer coincidir los datos de TCGA con la anotación de proteínas obtenida de la salida de myProMS, se utilizaron los servicios de anotación de MyGene.info (Mark et al., 2018).

El análisis de la expresión diferencial entre los subtipos intrínsecos del cáncer de mama en los datos de TCGA se realizó utilizando el paquete limma R (Ritchie et al., 2015) entre los subtipos de tipo basal y el resto (Luminal A, Luminal B y Her2) y los valores de p fueron ajustado mediante el procedimiento de Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995) con un umbral establecido en 0.05. Los paralelismos entre el contenido del MC-siStat3 y los subtipos de cáncer de mama se estudiaron mediante tablas de contingencia y la prueba de chi cuadrado de Pearson.

Análisis estadístico

Cuando se compararon dos grupos, se utilizó la prueba t de Student, salvo donde se indique lo contrario. Cuando tres o más grupos se compararon, se utilizó una prueba de ANOVA de una vía, seguida de la prueba t de Tukey, para determinar la significación entre grupos. No se emplearon métodos estadísticos a priori para predeterminar los tamaños muestrales, pero los mismos estuvieron en línea con aquellos reportados en trabajos previos (Carnevale et al., 2007; Cordo Russo et al., 2015; Rivas et al., 2012). La

comparación de los volúmenes tumorales entre los distintos grupos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza de dos vías, seguida de una prueba de Tukey. Las velocidades de crecimiento se calcularon como las pendientes de las curvas de crecimiento, empleando un análisis de regresión lineal, y las pendientes fueron comparadas mediante un análisis de varianza, seguido de una prueba de paralelismo para determinar la significación estadística de las diferencias. Las probabilidades de sobrevida se calcularon de acuerdo al método de Kaplan-Meier, y la significación estadística se analizó mediante la prueba de rango logarítmico. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando los programas GraphPadPrism 4 (GraphPad, La Jolla, CA, EEUU) y SPSS Software (SPSS, Inc., Chicago, IL, EEUU). Todos los análisis estadísticos fueron de dos colas, y un p valor inferior a 0,05 fue considerado significativo.

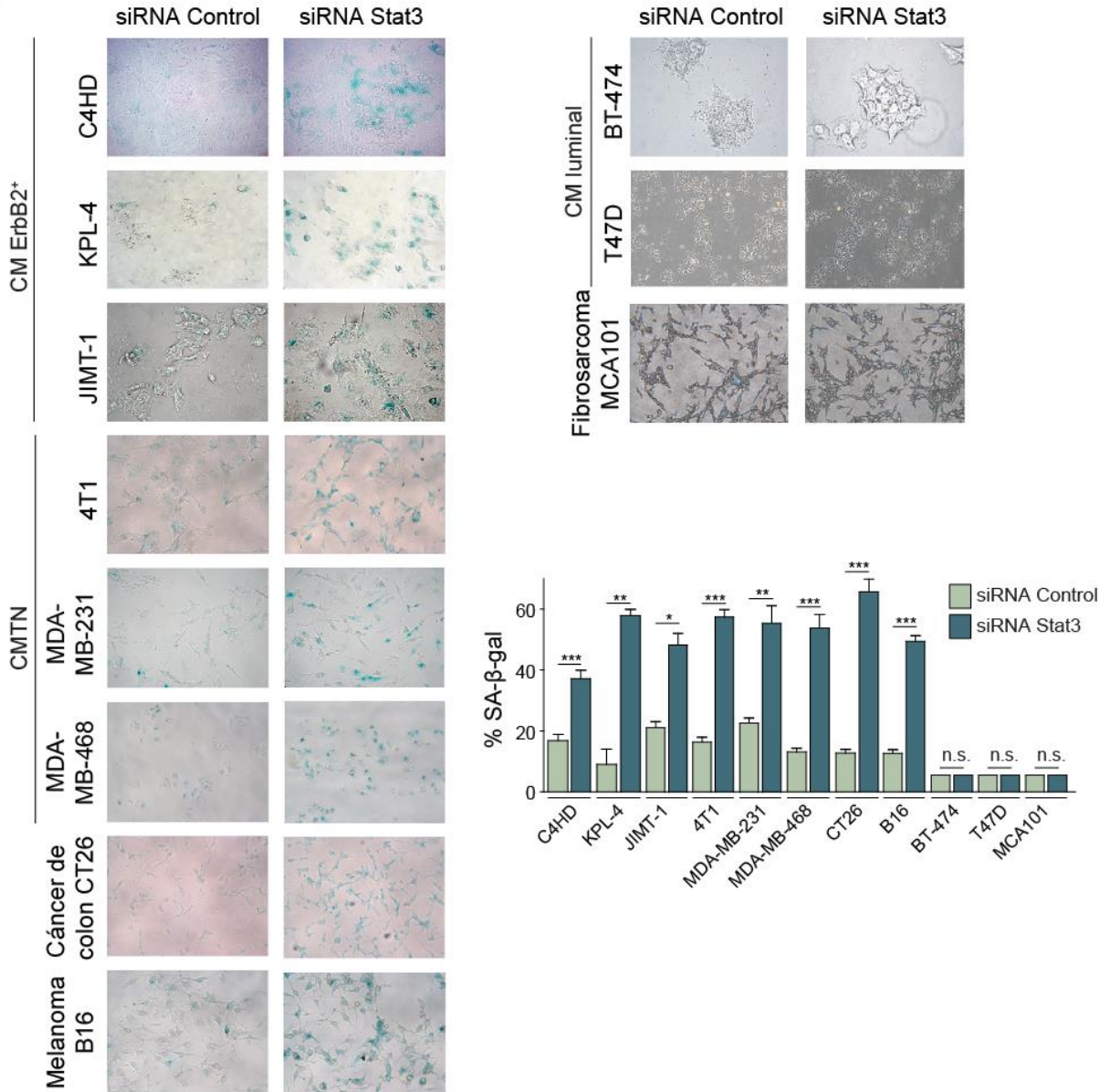
RESULTADOS

Objetivo específico #1: Caracterizar el mecanismo de senescencia celular inducido por inhibición de Stat3 *in vitro* e *in vivo*.

1.1 La inhibición de la adicción a Stat3 *in vitro* induce senescencia celular

Como se señaló en la Introducción de este trabajo, el rol de Stat3 en el desarrollo y la progresión del cáncer ha sido ampliamente estudiado. Interesantemente, se ha demostrado que la inhibición de Stat3 conduce a una respuesta inmune antitumoral (Wang et al., 2004). Sin embargo, el mecanismo que lleva a que ciertos tumores sean reconocidos por el sistema inmune tras la inhibición de Stat3 ha sido poco descrito. Previamente hemos demostrado que el bloqueo de la activación de Stat3 mediante la transfección con un plásmido dominante negativo, indujo senescencia en dos líneas de cáncer de mama murino (Tkach et al., 2012). Debido a que la senescencia celular puede promover inmunovigilancia, decidimos caracterizar con mayor profundidad el mecanismo de senescencia antes observado. Para ello, realizamos estudios de silenciamiento de la expresión de Stat3 con un ARN corto de interferencia (siRNA) utilizando distintos tipos de tumores sólidos y con diferentes niveles de activación de Stat3 basal. En los modelos de cáncer de mama ErbB-2+ (C4HD, JIMT-1 y KPL-4), cáncer de mama triple negativo (4T1, MDA-MB-231 y MDA-MB-468), cáncer de colon (CT26) y melanoma (B16), el bloqueo de Stat3 produjo un aumento de la tinción para la actividad de la enzima SA- β -gal (Figura 1A), uno de los principales marcadores de senescencia celular (Dimri et al., 1995). Sin embargo, en las líneas de cáncer de mama luminal (T-47D), luminal ErbB-2⁺, (BT-474) y en el modelo de fibrosarcoma murino (MCA101), la inhibición de Stat3 no promovió cambios en este marcador (Figura 1A). Corroboramos, mediante WB, que la inhibición de Stat3 utilizando el siRNA específico contra esta proteína fue del 30-80% en todas las líneas (Figura 1B).

A



B

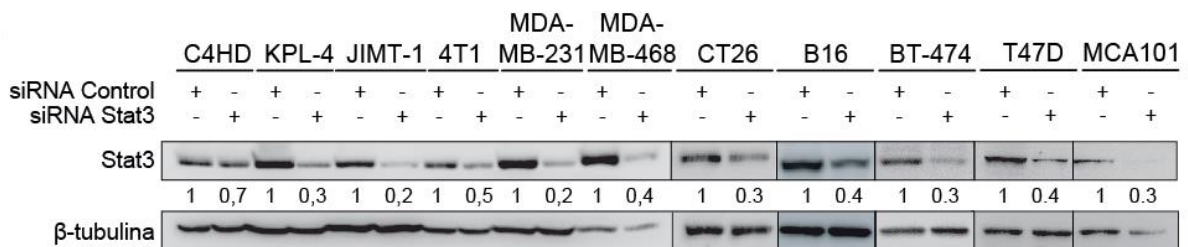


Figura 1 El boqueo de Stat3 aumenta la actividad de la enzima SA-β-gal en ciertos tipos de tumores sólidos. Se transfectaron las líneas celulares durante 48 h con un siRNA Control o específico para Stat3. **A.** Ensayo de senescencia por tinción de la enzima SA-β-gal. El gráfico de barras representa las medias de los porcentajes de células SA-β-gal positivas. **B.** Se determinó la expresión de Stat3 y β-tubulina mediante WB. Los números debajo representan la relación Stat3/β-tubulina tomando como referencia a las células transfectadas con siRNA Control. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 vs siRNA Control. Experimento representativo de 3

realizados. Datos presentados como media±EEM. CM: Cáncer de mama, CMTN: Cáncer de mama triple negativo.

Dado que la funcionalidad de Stat3 está dada por su activación, decidimos evaluar si había alguna correlación entre los niveles de activación de dicho oncogén y la inducción de senescencia. Normalmente, la activación de Stat3 se induce mediante la fosforilación en un residuo de tirosina crítico (Tyr705) que desencadena su dimerización y migración al núcleo donde se comporta como un activador de transcripción para una amplia gama de genes, según lo descrito en la Introducción. Como se puede observar en la Figura 2, las líneas que senescen tras la inhibición de Stat3, presentan niveles elevados de activación de esta proteína, determinada por la fosforilación en Tyr705. En cambio, en aquellas líneas donde el bloqueo de Stat3 no produce cambios en la tinción para la actividad de la enzima SA-β-gal, se observan niveles apenas detectables de fosforilación de esta proteína. Estos resultados demuestran que el bloqueo de Stat3 *in vitro* induce senescencia celular solo en células de cáncer de mama murinas y humanas y en otros tipos de tumores que tienen elevados niveles de fosforilación de Stat3 en Tyr705 basal.

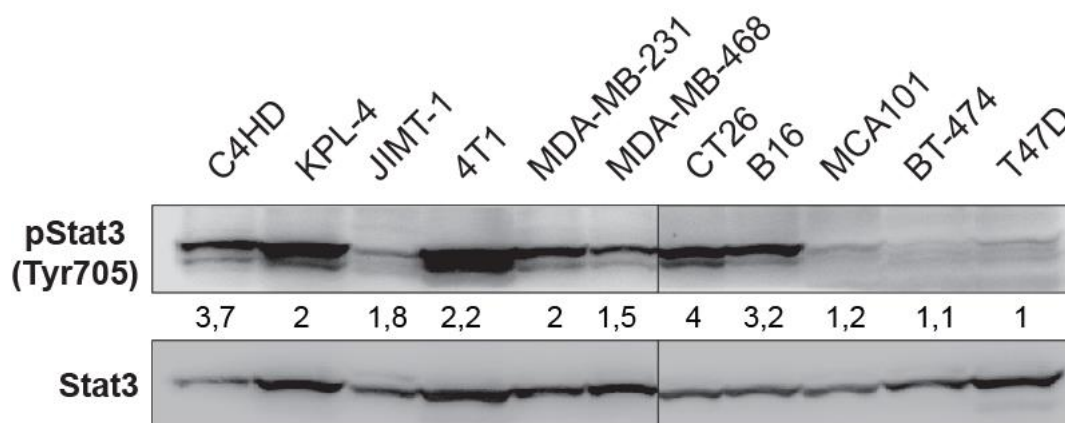


Figura 2: Niveles de activación de Stat3. Se realizaron extractos proteicos de las células en medio suplementado con SFB. La medida de la activación de Stat3, por la fosforilación de Stat3 (pStat3) en el residuo Tyr705 y la expresión de Stat3 se determinó mediante WB. Los números representan el cociente entre pStat3/Stat3, tomando como 1 a las células T-47D. Experimento representativo de 3 realizados.

Como se comentó en la Introducción, la senescencia celular está asociada con cambios globales en la estructura de la cromatina, como la metilación de histonas. Observamos, mediante marcación por inmunofluorescencia y posterior análisis por microscopía confocal en las células 4T1, MDA-MB-231, MDA-MB-468, JIMT-1 y B16, que el silenciamiento de la expresión de Stat3 induce un aumento de tinción para la marca TriMeK9H3, una marca de represión transcripcional asociada a un fenotipo senescente (Narita et al., 2003)(Figura 3).

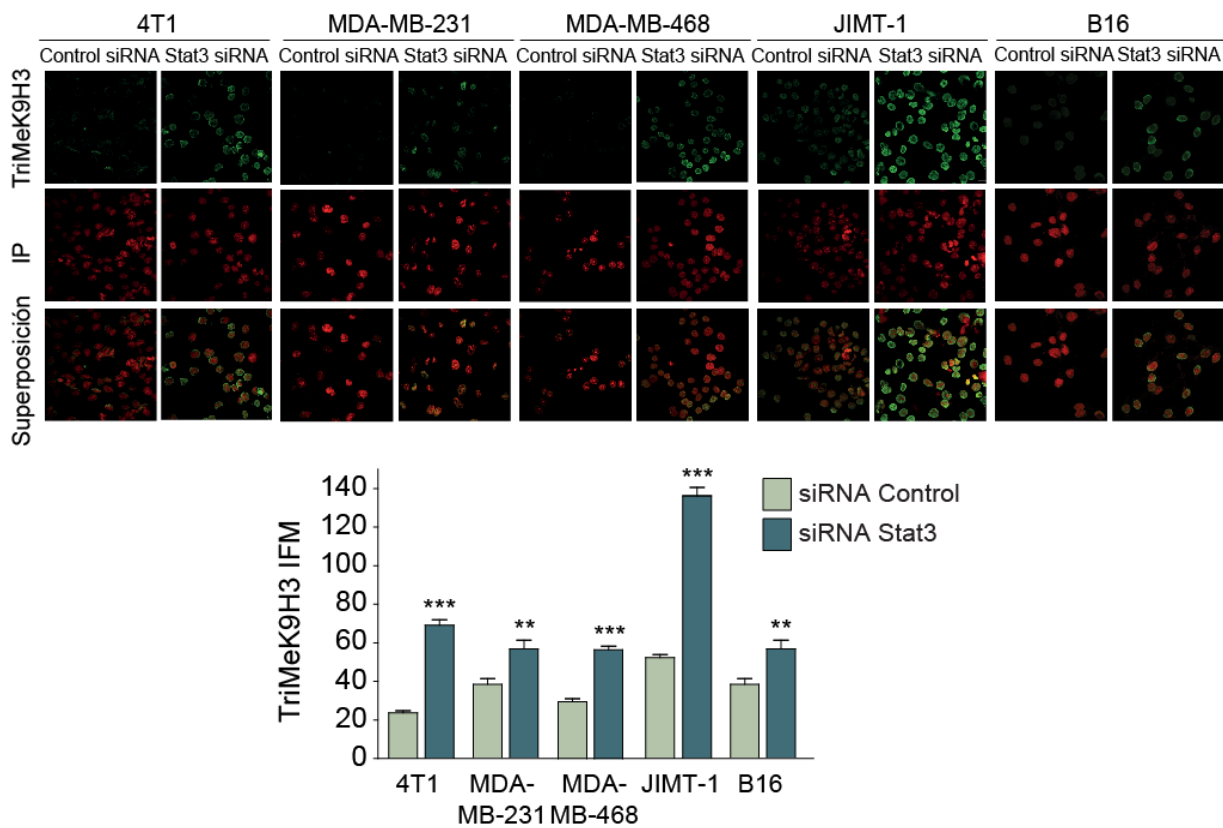


Figura 3: La senescencia inducida por bloqueo de Stat3 produce cambios en la estructura de la cromatina. Según corresponda, se transfectaron las células durante 48 h con siRNA Control o siRNA específico para Stat3. Se realizó una inmunofluorescencia con un anticuerpo anti-trimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (TriMeK9H3) seguido de la incubación con un anticuerpo secundario anti-IgG-FITC. Los núcleos se tiñeron con Ioduro de propidio. La intensidad de fluorescencia media (IFM) verde se cuantificó en 50 células para cada línea celular y condición. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs Control siRNA. Datos presentados como media \pm EEM. Experimento representativo de 2 realizados.

Los principales mediadores del arresto del ciclo celular durante la senescencia, son los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDKi),

como p16^{INK4a} y p21^{cip1}. Observamos, mediante WB, que el bloqueo de Stat3 con un siRNA, produce un aumento de la expresión de p16^{INK4a} en las células C4HD y 4T1 y p21^{cip1} en las células MDA-MB-231 (Figura 4A). Es importante resaltar que muchos tumores tienen deleciones o mutaciones en el gen CDKN2A que codifica para p16^{INK4a}, como es el caso de las células MDA-MB-231. En estas células pudimos observar que el bloqueo de Stat3 produce un aumento de la expresión de p21^{cip1} y no de p16^{INK4a}. Interesantemente, en la Figura 4B podemos observar que el silenciamiento de Stat3 induce senescencia en las células C4HD, 4T1 y MDA-MB-231, y la inhibición de la expresión de p16^{INK4a} o p21^{cip1} anula la inducción de senescencia mediada por el bloqueo de Stat3 (Figura 4B). La inhibición en la expresión de Stat3 y p16^{INK4a} o p21^{cip1} en células transfectadas con siRNAs contra ambas proteínas se corroboró por WB (Figura 4A).

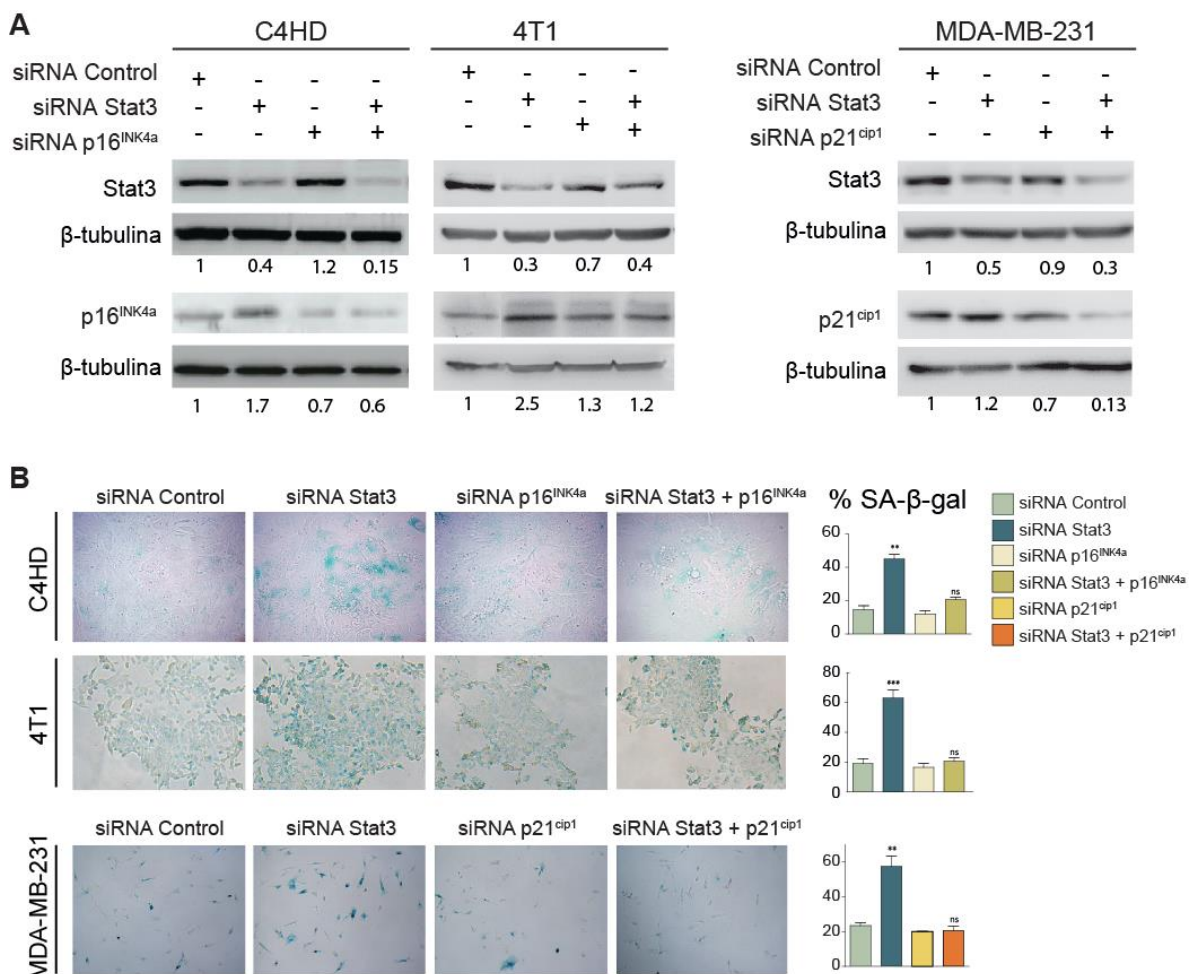


Figura 4: El mecanismo de senescencia inducido por bloqueo de Stat3 depende de inhibidores del ciclo celular. Según corresponda, se transfectaron las células C4HD, 4T1 o

MDA-MB-231 con siRNA control, siRNA Stat3, siRNA p16^{INK4a} o siRNA p21^{cip1} o con la combinación de estos dos últimos siRNAs con siRNA Stat3. **A.** Ensayo de senescencia por tinción de la enzima SA-β-gal. Los resultados se muestran como las medias de los porcentajes de células SA-β-gal positivas n=50. **B.** Se determinó la expresión de Stat3, p16^{INK4a}, p21^{cip1} y β-tubulina mediante WB. Los números representan la cuantificación de las respectivas proteínas sobre β-tubulina. **p<0,01, ***p<0,001 vs Control siRNA. Datos presentados como media±EEM. Experimento representativo de 2 realizados.

Otro de las características principales de las células senescentes, es el arresto del ciclo celular. 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 estimuladas con MPA (Figura 5A). También, comprobamos que el bloqueo de Stat3 redujo la proliferación de células 4T1 y MDA-MB-231 (Figura 5B y 5C). Además, la inhibición de la expresión de p16^{INK4a} en células C4HD y 4T1 y p21^{CIP1} en células MDA-MB-231, revirtió el arresto de la proliferación observado por la transfección con siRNA contra Stat3. En sintonía con los hallazgos de la figura 1, el silenciamiento de Stat3 en las líneas MCA101 y T47D, que tienen niveles bajos de activación de Stat3 y no senescen tras su bloqueo, no produjo un arresto del ciclo celular (Figura 5). En conclusión, el bloqueo de inhibidores del ciclo celular, como p16^{INK4a} y p21^{cip1}, previene la inducción de senescencia celular y la inhibición de la proliferación por inactivación de Stat3. Estos resultados demuestran que el bloqueo de Stat3 *in vitro* induce senescencia celular en células de cáncer de mama murinas y humanas, en cáncer de colon y melanoma. La inducción de senescencia por inhibición de Stat3 ocurre solo en células que tienen activación constitutiva de esta proteína y la necesitan para poder proliferar. Además, observamos que los inhibidores del ciclo celular son mediadores claves de la senescencia celular inducida por el bloqueo de Stat3.

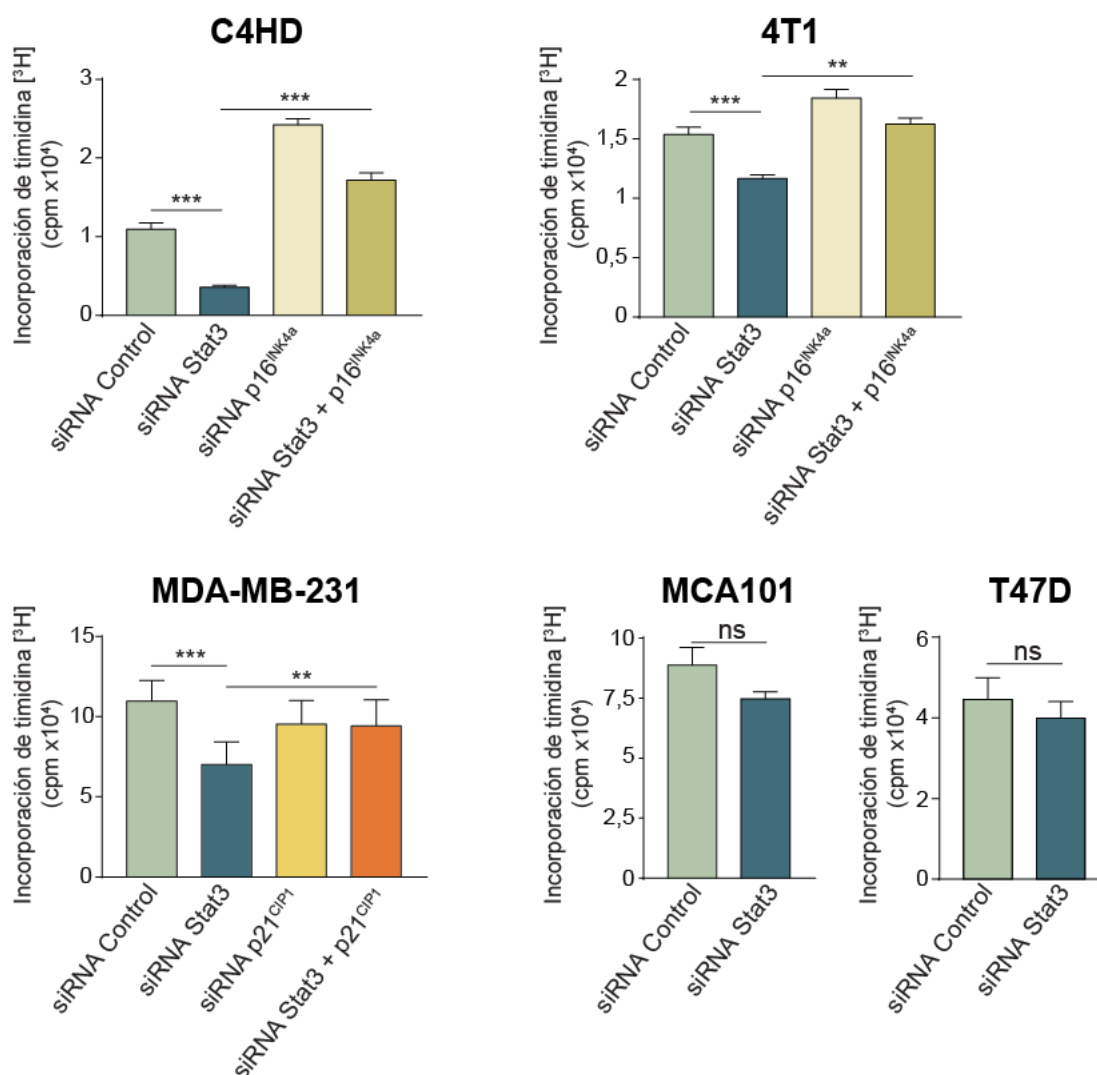


Figura 5: El silenciamiento de p16^{INK4a} o p21^{cip1} revierte la inhibición de la proliferación inducida por el bloqueo de Stat3. Se realizó un ensayo de proliferación por incorporación de timidina [³H] en células C4HD, estimuladas con MPA, 4T1, MDA-MB-231, MCA101 o T47D transfectadas con siRNA control, siRNA Stat3, siRNA p16^{INK4a} o siRNA p21^{cip1} o con la combinación de estos dos últimos siRNA con siRNA Stat3. Luego 48 h de transfección, se midió la radioactividad incorporada al ADN, con un pulso de timidina [³H] durante las últimas 18h. Los datos se presentan como la media de las cpm ± EEM de octuplicados. Las diferencias significativas fueron calculadas contra las células transfectadas con siRNA Control y contra células transfectadas con siRNA Stat3. ns: no significativo, **p<0,01, ***p<0,001. Datos presentados como media±EEM. Experimento representativo de 2 realizados.

1.2 La inhibición de Stat3 *in vivo* induce senescencia en los tumores 4T1 y B16

Con el objetivo de validar nuestros hallazgos *in vivo*, realizamos experimentos con el modelo murino de cáncer de mama triple negativo estadio IV 4T1 y en el modelo de melanoma B16. Ambos tumores tienen activación constitutiva de Stat3 como se puede observar en la figura 2. Administramos a ratones portadores del tumor 4T1 o B16, el inhibidor de la activación de Stat3, JSI-124 (Blaskovich et al., 2003) diariamente durante 10 días (Figura 6A). Observamos, como ya estaba reportado, que el tratamiento con JSI-124 inhibió el crecimiento de los tumores 4T1 (Ren et al., 2014) y B16 (Blaskovich et al., 2003; Molavi et al., 2008) con respecto al grupo control, representado por las curvas de crecimiento tumoral (Figura 6B y 6C, respectivamente). Es importante resaltar que, a pesar que observamos una inhibición similar, en los trabajos mencionados, la administración del JSI-124 fue intratumoral, mientras que en nuestro caso fue intraperitoneal. Además, observamos que los ratones portadores del tumor 4T1 tratados con JSI-124, presentaron un menor número de micrometástasis en pulmón al final del experimento (Figura 6D).

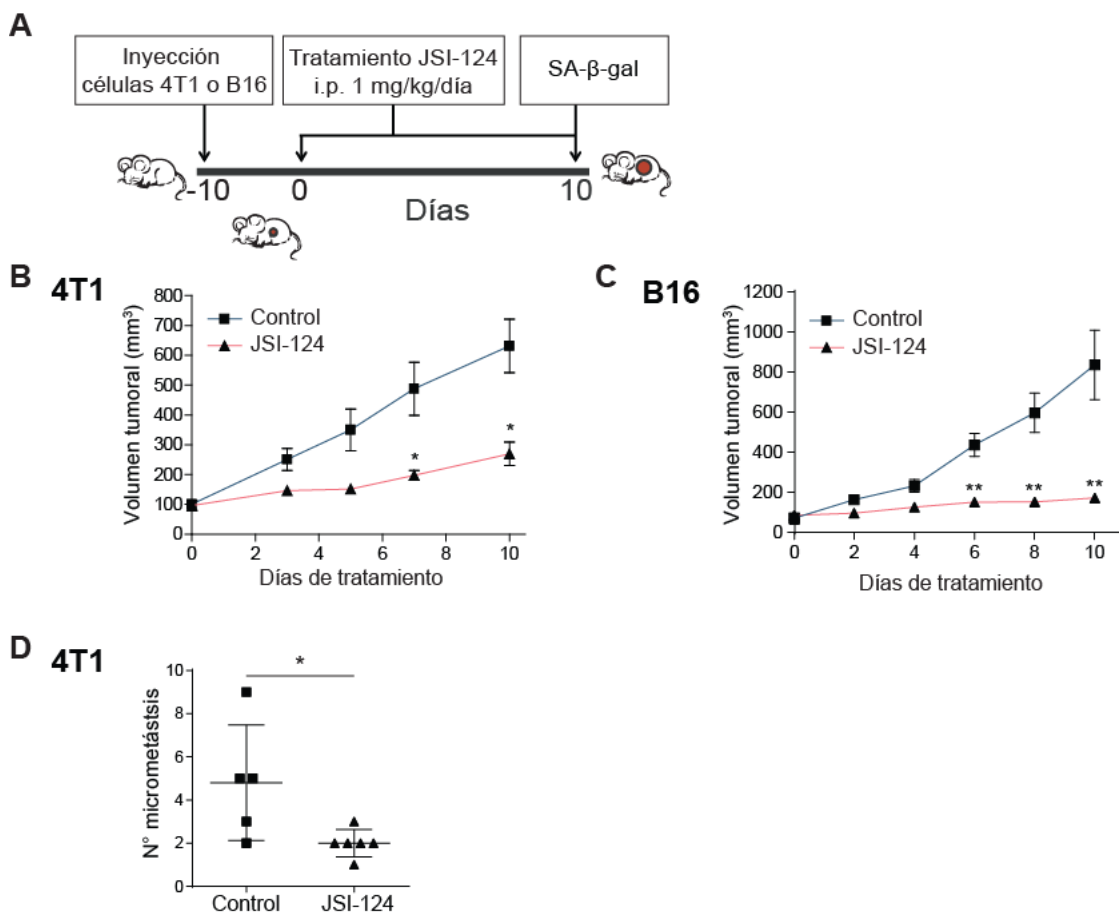


Figura 6: El tratamiento con JSI-124 inhibe el crecimiento de los tumores 4T1 y B16. A. Se inyectaron 10^4 células 4T1 s.c. en ratones BALB/c o 10^5 células B16 s.c. en ratones C57BL/6. Cuando el tumor alcanzó un volumen de 100 mm^3 , los animales se distribuyeron al azar para recibir 1 mg/kg/día de JSI-124 de forma i.p. ($n=5/\text{grupo}$). Al día 10 de tratamiento, los animales fueron sacrificados. El crecimiento del tumor 4T1 (**A**) o B16 (**B**) se muestra como volumen tumoral, calculado como $(L \times A^2)/2$, donde A es el ancho y L es el largo del tumor. **C.** Se realizó un recuento de micrometástasis en pulmón al final del experimento. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. Grupo control. Datos presentados como $\text{media} \pm \text{EEM}$.

Finalmente, estudiamos la actividad de la enzima SA- β -gal en cortes frescos de los tumores tratados con JSI-124. La Figura 7 muestra la tinción de la enzima SA- β -gal en tumores representativos de ambos grupos, donde se observa que los tumores 4T1 y B16 tratados con JSI-124 presentan marcación positiva, mientras que los controles son negativos para la tinción. Esta es la primer demostración de que la inhibición de Stat3 *in vivo* induce senescencia celular en tumores adictos a este oncogén. Dado que actualmente hay un gran interés en el desarrollo de inhibidores de Stat3, este hallazgo resulta muy interesante para conocer los mecanismos moleculares que transcurren luego de su inhibición.

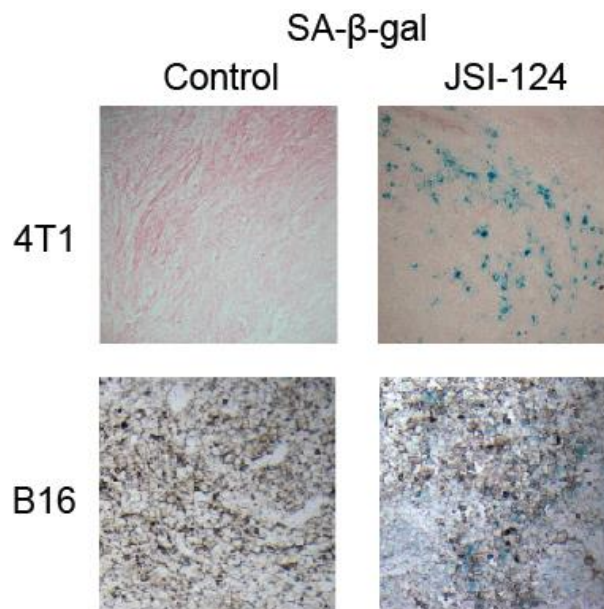
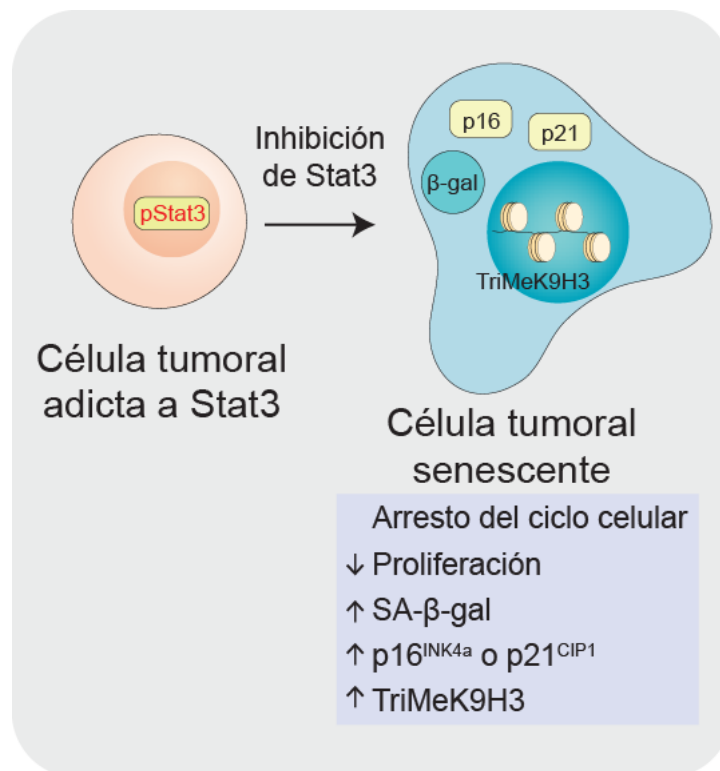


Figura 7: La inhibición de Stat3 *in vivo* produce un aumento de la actividad de la enzima SA- β -gal. Luego de 10 días de tratamiento con JSI-124 (figura 6), se realizaron cortes en criostato de los tumores 4T1 y B16. Se realizó la tinción de SA- β -gal. Se muestran cortes representativos de los distintos grupos experimentales.

En esta primera parte de resultados observamos que:

- En modelos murinos y humanos de cáncer de mama, cáncer de colon y melanoma que presentan activación constitutiva de Stat3, demostramos que han desarrollado adicción a éste oncogen, ya que el silenciamiento de Stat3 en estas células induce un arresto del ciclo celular denominado senescencia.
- El mecanismo de senescencia celular inducido por silenciamiento de Stat3 está acompañado de:
 - Un aumento en la actividad de la enzima SA- β -gal
 - Cambios en la estructura de la cromatina
 - Dependencia de inhibidores del ciclo celular
 - Un arresto del ciclo celular.
- El silenciamiento de Stat3 no induce senescencia ni arresto de la proliferación en células que no tienen activación constitutiva de Stat3.
- El tratamiento *in vivo* con un inhibidor farmacológico de la activación de Stat3 en tumores adictos a dicho oncogén, induce senescencia celular.



Objetivo específico #2: Estudiar la actividad del SASP inducido por silenciamiento de Stat3 sobre células del microambiente y células tumorales *in vitro*.

2.1 Los medios condicionados de células senescentes inducidas por silenciamiento de Stat3 tienen efecto inmunoestimulador *in vitro*.

En la primera parte de resultados de esta Tesis observamos que la inhibición de Stat3 en células y tumores que tienen activación constitutiva de dicho oncogén, induce senescencia celular por un mecanismo denominado senescencia inducida por inactivación de oncogenes. Como se detalló en la Introducción, la senescencia lleva a la producción de un SASP que, dependiendo del contexto, puede tener tanto funciones protumorales como antitumorales. La actividad del SASP asociado a otros tipos de senescencia como la inducida por terapia o por activación de oncogenes, ha sido bien caracterizada. Sin embargo, muy poco se conoce sobre el SASP asociado a senescencia inducida por inactivación de oncogenes y no hay reportes hasta el momento, que describan la actividad del SASP de células senescentes inducida por bloqueo de Stat3. Para ensayar las propiedades del SASP inducido por silenciamiento de Stat3, obtuvimos el medio condicionado (MC) de células 4T1 o B16 transfectadas con siRNA contra Stat3 (MC-siStat3) o con siRNA control (MC-siControl) y realizamos varios ensayos funcionales. Como control, incluimos el MC de células MCA101 que no experimentaron senescencia por silenciamiento Stat3 (Figura 1A). Brevemente, luego de la transfección con los siRNAs las células se lavaron al menos tres veces con PBS y se agregó medio sin suero, para asegurar que el efecto observado se debe a los factores secretados por las células, y no a restos de reactivo de transfección, siRNA o componentes del suero (ver Materiales y Métodos).

En primer lugar, estudiamos la proliferación, diferenciación y activación de linfocitos T murinos purificados por selección negativa a partir del bazo de ratones BALB/c o C57BL/6 sanos. Estimulamos los linfocitos T purificados con partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos anti-CD3/CD28 en presencia

de MC-siStat3 o MC-siControl de células 4T1, B16 y MCA101. Las partículas anti-CD3/CD28 simulan la interacción entre un linfocito T y una célula presentadora de antígeno. Observamos que, en presencia del MC-siStat3 de células 4T1 y B16, se potencia la proliferación de linfocitos T con respecto al MC-siControl (Figura 8). Sin embargo, el MC-siStat3 de células MCA101 no modificó la proliferación de linfocitos T en comparación con el MC-siControl (Figura 8).

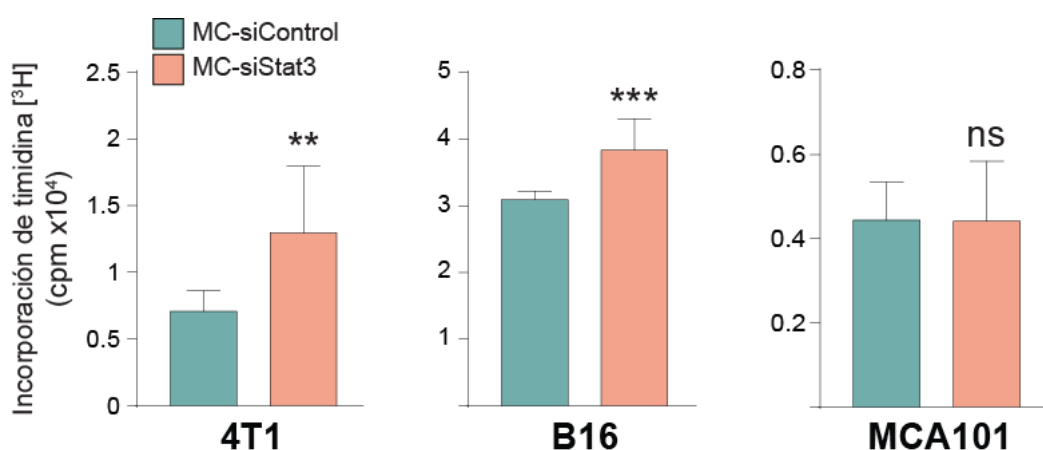


Figura 8. El MC-siStat3 de células senescentes estimula la proliferación de linfocitos T. Se purificaron linfocitos T de bazo de ratones BALB/c (para experimento con MC de células 4T1 y MCA101) o C57BL/6 (para experimento con MC de células B16) mediante selección negativa. Estos linfocitos se cultivaron durante 72 h con partículas magnéticas anti-CD3/CD28 y los MC indicados y se realizó un ensayo de proliferación por incorporación de timidina [³H], con pulso durante las últimas 6 h. ns: no significativo **p<0,01, ***p<0,001, vs MC-siControl. Datos presentados como media±EEM. Experimento representativo de 5 realizados. MC-siControl: medio condicionado obtenido de células transfectadas con siRNA Control, MC-siStat3 medio condicionado obtenido de células transfectadas con siRNA contra Stat3.

Observamos que el MC-siStat3 de células senescentes por inhibición de Stat3 induce la proliferación de linfocitos T, pero quisimos caracterizar con mayor profundidad cómo impacta sobre la activación y diferenciación de los linfocitos T CD4+ y CD8+. Nuevamente, obtuvimos linfocitos T purificados por selección negativa de ratones BALB/c y C57BL/6 sanos y los incubamos con los MC de células 4T1 y B16, respectivamente y partículas anti-CD3/CD28. Estudiamos la expresión de CD44, una molécula de adhesión a ácido hialurónico que es indicadora de un estado activado de linfocitos T, y de CD62L, otra molécula de adhesión que solo se expresa en linfocitos T vírgenes

y de memoria central (Sallusto et al., 2004). El análisis combinado de la expresión de CD44 y CD62L permite determinar el fenotipo virgen, de memoria central o efector de linfocitos T (Figura 9A). Mediante citometría de flujo pudimos observar que el tratamiento *in vitro* con el MC-siStat3 de células 4T1 y B16, produce un aumento en la población de linfocitos T CD4⁺ CD44⁺ CD62L⁻ (Figura 9A y 9B), indicando un fenotipo de linfocito T efector. Este aumento es a expensas de una disminución en los linfocitos T CD4⁺ vírgenes (CD62L⁺CD44⁻), ya que no observamos diferencias en el porcentaje de células de memoria central (CD62L⁺CD44⁺), en los linfocitos T CD4⁺ tratados con MC-siStat3 vs. MC-siControl. Con respecto a los linfocitos T CD8⁺, no observamos diferencias en la frecuencia de células efectoras cultivadas con el MC-siStat3 de células 4T1 y B16 vs. MC-siControl (Figuras 9C y 9D). Sin embargo, el MC-siStat3 de células 4T1 produjo un aumento en la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ de memoria central, a expensas de una disminución en la población virgen (Figuras 9C y 9D). Esto no ocurrió en el tratamiento con el MC-siStat3 de las células B16. Por otro lado, decidimos estudiar el marcador de activación de linfocitos T CD69 (Simms & Ellis, 1996). En la Figura 9E podemos observar que el MC-siStat3 de células 4T1 y B16 induce un aumento en la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ que expresan el marcador CD69 con respecto al MC-siControl. Por otra parte, solo el MC-siStat3 de células 4T1 indujo un aumento significativo de activación de linfocitos T CD8⁺, mientras que MC-siStat3 de células B16 no modificó la expresión de CD69 en estas células (Figura 9E).

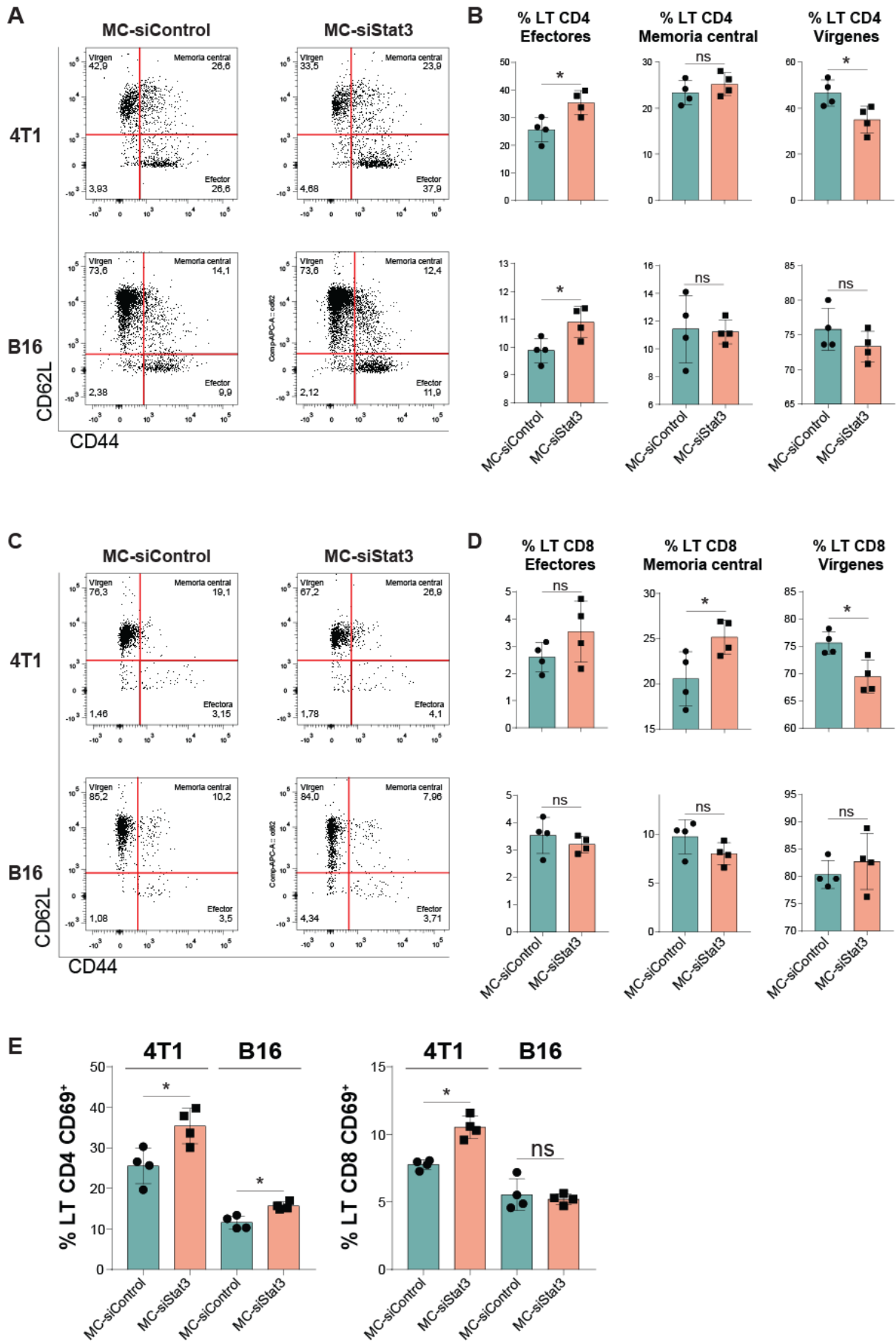


Figura 9. Linfocitos T CD4⁺ tratados con el MC-siStat3 de células 4T1 y B16 presentan mayor activación y un fenotipo de células efectoras. Se purificaron linfocitos T de bazo de ratones BALB/c o C57/BL6 mediante selección negativa. Estos linfocitos se cultivaron durante 72 h con partículas magnéticas anti-CD3/CD28 y los MC indicados de células 4T1 o B16, respectivamente. Luego se tiñeron con anticuerpos anti CD3, CD4, CD8, CD44, CD62L y CD69 y luego se sometieron a análisis por citometría de flujo **A.** Gráficos de puntos representativos, muestran la distribución de linfocitos T CD4⁺ vírgenes, de memoria central y efectoras. **B.** Porcentaje de células vírgenes, de memoria central y efectora en linfocitos T CD4⁺ (n=4). **C.** Gráficos de puntos representativos, muestran la distribución de linfocitos T CD8⁺ vírgenes, de memoria central y efectoras. **D.** Porcentaje de células vírgenes, de memoria central y efectora en linfocitos T CD8⁺ (n=4). **E.** Porcentaje de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ CD69⁺ (n=4). Resultados representativos de 2-5 experimentos independientes. Datos presentados como media±EEM; ns: no significativo; * p<0,05. LT: linfocitos T.

2.2 Los medios condicionados de células senescentes inducidas por el silenciamiento de Stat3 tienen efecto antitumoral *in vitro*.

Para evaluar si el MC-siStat3 tiene un efecto paracrina sobre las propias células tumorales, estudiamos distintos parámetros. En primer lugar, evaluamos la proliferación de células tumorales cuando se expusieron a MC-siStat3 o MC-siControl proveniente de células 4T1, B16, MDA-MB-231 y MCA101. Las células 4T1, B16 y MDA-MB-231 cultivadas con MC-siStat3 exhibieron una disminución de la proliferación cuando se compararon con las células cultivadas con MC-siControl (Figura 10). Sin embargo, el MC-siStat3 de células MCA101, tuvo la misma actividad sobre la proliferación en las células MCA101 que el MC-siControl (Figura 10).

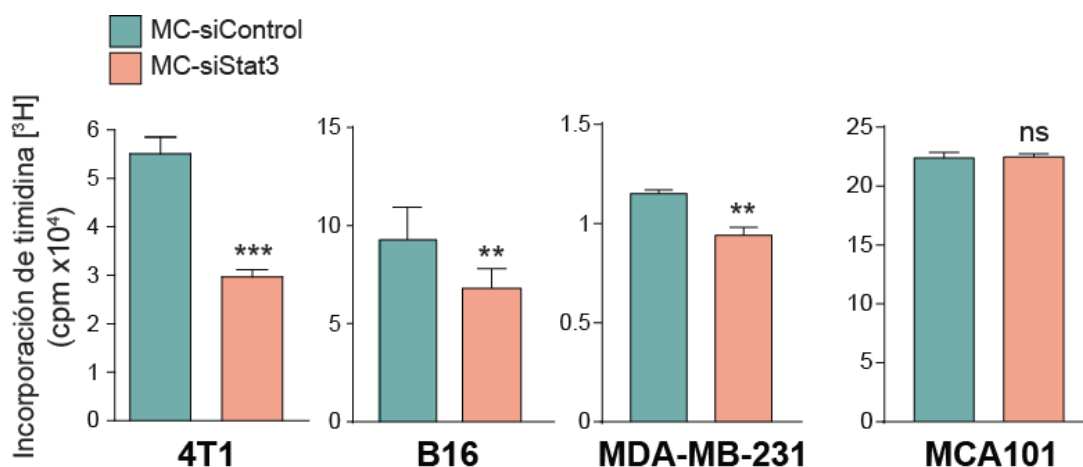


Figura 10. El MC-siStat3 de células senescentes inhibe la proliferación de las propias células tumorales. Las células 4T1, B16, MCA101 y MDA-MB-231 se cultivaron durante 48 h con MC-siStat3 o MC-siControl proveniente de la misma línea celular. Se realizó un ensayo de proliferación por incorporación de timidina [³H]. ns: no significativo, **p<0,01, ***p<0,001, vs MC-siControl. Datos presentados como media±EEM. Experimento representativo de 4 realizados.

En segundo lugar, evaluamos la migración celular, un parámetro asociado a la capacidad metastásica. Observamos que el MC-siStat3 inhibió la migración, en un ensayo de cierre de la herida, de las células 4T1, B16 y MDA-MB-231 (Figura 11). Cabe resaltar que el MC-siControl no estimuló más la migración que el medio de crecimiento normal. Este ensayo no pudo realizarse en las células MCA101 por un problema técnico debido al tipo de monocapa que forman.

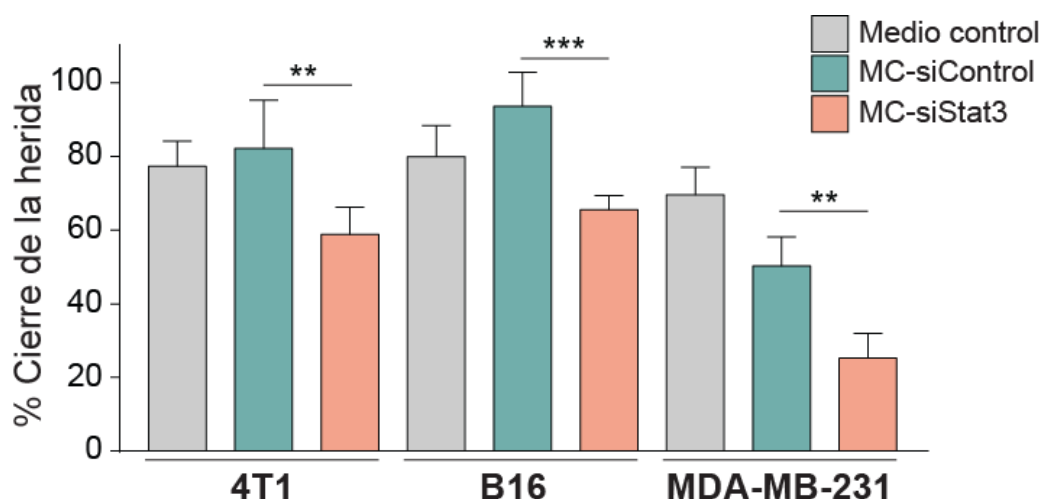


Figura 11. El MC-siStat3 de células senescentes inhibe la migración de células tumorales. Las monocapas confluentes de células 4T1, B16, MCA101 y MDA-MB-231 en medio completo se hirieron y se cultivaron con MC-siStat3 o MC-siControl proveniente de la misma línea celular. Se dejó migrar a las células hacia el área libre de células. Las heridas se fotografiaron a las 0 y 12 h y se cuantificaron por densitometría. **p<0,01, ***p<0,001, vs MC-siControl. Datos presentados como media±EEM. Experimento representativo de 3 realizados.

Finalmente, para probar el potencial angiogénico de los MC, estudiamos la capacidad los mismos de modular la proliferación de células endoteliales de la vena del cordón umbilical humanas (HUVEC del inglés *human umbilical vein endothelial cells*). Los resultados revelaron que el MC-siControl de células 4T1, B16 y MCA101 tiene actividad angiogénica, ya que aumentó la proliferación de

las células HUVEC. Sin embargo, el MC-siStat3 de las células 4T1 y B16 moduló la proliferación de las células HUVEC a niveles similares al medio control (Figura 12). En el caso de los MC provenientes de las células MDA-MB-231, el MC-siControl no produjo un aumento de la proliferación de las células HUVEC, pero el MC-siStat3 mostró una actividad significativamente menor. Nuevamente, a pesar de que el MC de las células MCA101 estimuló la proliferación de las células HUVEC vs el medio control, el MC-siStat3 de dichas células no presentó diferencias en comparación con el MC-siControl.

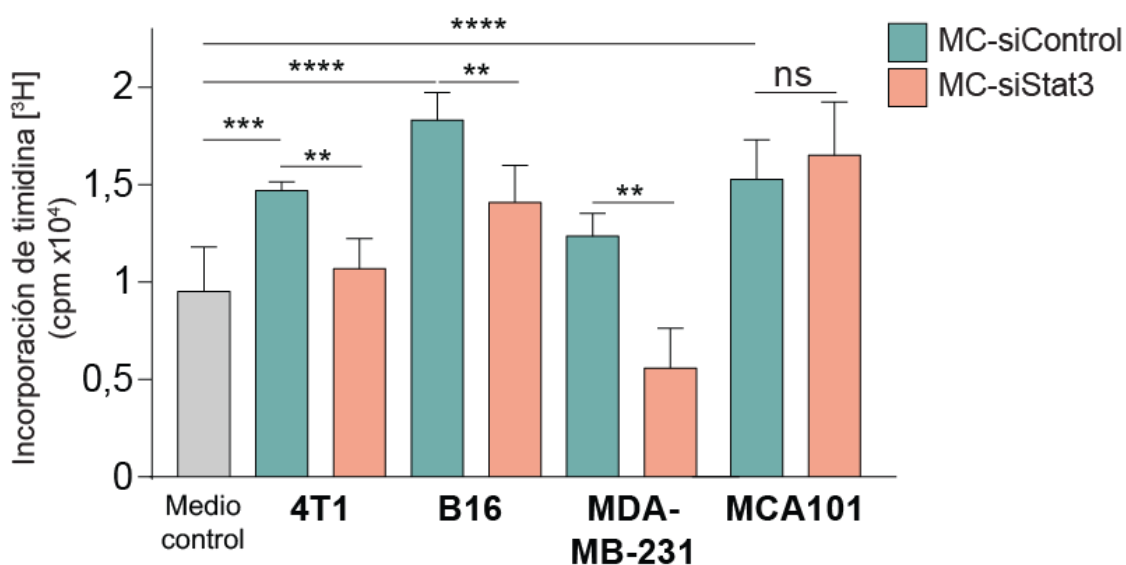
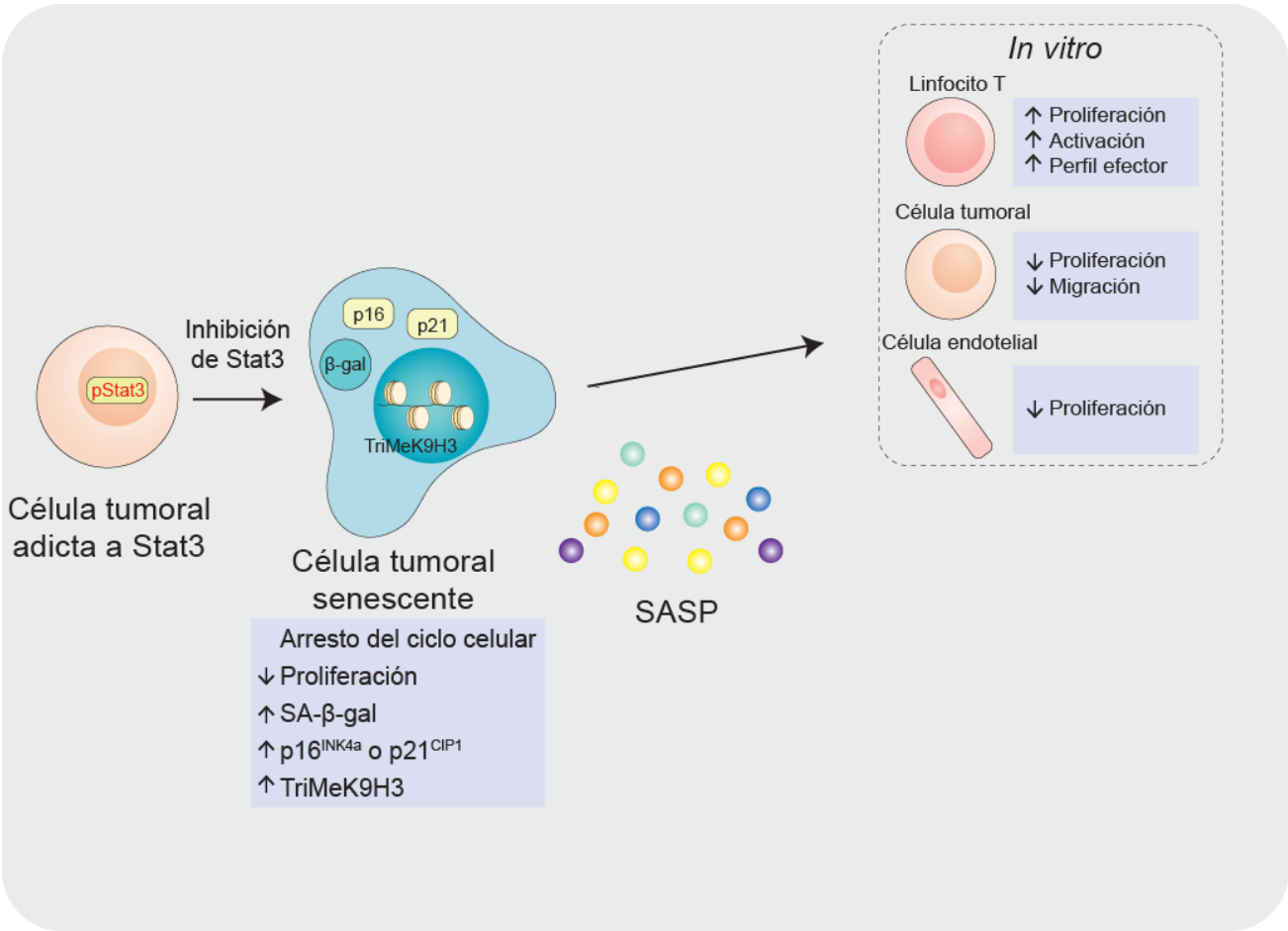


Figura 12. El MC-siStat3 de células senescentes no induce la proliferación de las células HUVEC. Las células HUVEC se cultivaron durante 48 h con MC-siStat3 o MC-siControl proveniente de las líneas celulares 4T1, B16, MCA101 y MDA-MB-231 según se indica. Como control se utilizó un medio con 10% de SFB. Se realizó un ensayo de proliferación por incorporación de timidina [³H]. ns: no significativo, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001. Datos presentados como media±EEM. Experimento representativo de 3 realizados.

En esta segunda parte de resultados observamos que:

- La senescencia celular inducida por bloqueo de la adicción a Stat3 lleva a la producción de un SASP que *in vitro*:
 - Aumenta la proliferación de linfocitos T estimulados
 - Produce una diferenciación de linfocitos T CD4⁺ hacia un subtipo efector
 - Tiene un efecto paracrino sobre las mismas células tumorales, inhibiendo su proliferación y migración.
 - No muestra actividad angiogénica.
- El efecto observado *in vitro* del SASP inducido por silenciamiento de Stat3 no ocurre con los MC de células no adictas.



Objetivo específico #3: Diseñar una inmunoterapia basada en la aplicación *in vivo* del SASP de células senescentes inducida por inhibición de Stat3.

3.1 El SASP derivado de células que tienen silenciado Stat3 es un adyuvante para una inmunoterapia celular profiláctica contra cáncer de mama ErbB2+

En las secciones de Resultados 1 y 2 de esta Tesis, comprobamos que el silenciamiento de Stat3 en células y tumores adictos a dicho oncogén, induce senescencia celular con la producción de un SASP que tiene actividad immunoestimuladora y antitumoral *in vitro*. Además, previamente en nuestro laboratorio, demostramos que la inmunización con células irradiadas que tienen bloqueada la activación de Stat3, induce una respuesta antitumoral típica contra células senescentes, que involucra los linfocitos T CD4⁺ y las células NK (Tkach et al., 2012). Sin embargo, los diversos efectos del SASP inducido por silenciamiento de Stat3 observados *in vitro*, nos alentaron a estudiar si la inmunovigilancia antes observada podía ser mediada por los factores secretados. De esta forma podemos estudiar el efecto paracrino exclusivo que tiene la inhibición de Stat3. Para ello, diseñamos una inmunoterapia basada en la administración *in vivo* del SASP. En primer lugar, decidimos hacer una administración profiláctica contra el modelo de cáncer de mama murino ErbB2+ C4HD, semejante al experimento realizado anteriormente en el laboratorio (Tkach et al., 2012). Con este objetivo, colectamos los MC-siStat3 y MC-siControl de células C4HD, los concentramos con columnas de 4 KDa de línea de corte y los liofilizamos. Una vez obtenido el liofilizado, los mezclamos con un polímero sintético de etilenvinilacetato (Elvax®) para formar un *pellet* que, al ser implantado de forma subcutánea en el ratón, libera lentamente su contenido (Kumamoto et al., 2002). Inmunizamos ratones hembras BALB/c con células C4HD salvajes irradiadas, junto con los *pellet* conteniendo el MC-siControl o el MC-siStat3. Es importante resaltar que, en todos los experimentos, la dosis de radiación utilizada, no induce senescencia en las células irradiadas. Luego de 3 inmunizaciones, los animales fueron desafiados con el tumor C4HD y se monitoreó el crecimiento durante 22 días (Figura 13A). Observamos que la

inmunización con células irradiadas junto con el *pellet* de MC-siStat3 produjo una inhibición en el crecimiento tumoral comparado con el MC-siControl (Figura 13B). En esta curva de crecimiento también se puede observar que la inmunización con el MC-siControl, no produce cambios en el crecimiento tumoral en comparación a ratones inyectados con PBS.

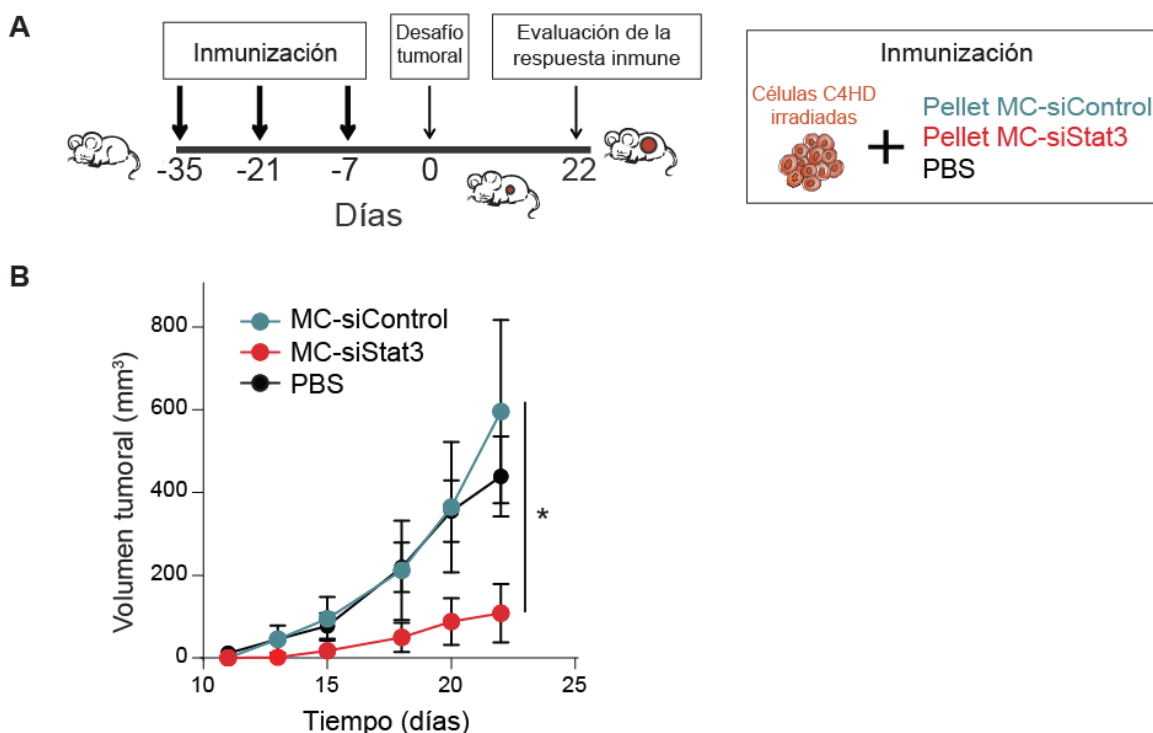


Figura 13. La inmunización profiláctica con MC-siStat3 junto con células C4HD irradiadas disminuye el crecimiento del tumor C4HD. **A.** Protocolo de inmunoterapia: Ratones hembra BALB/c fueron inmunizados con 10^6 células C4HD irradiadas s.c. y con un *pellet* que contiene el MC de células C4HD transfectadas con siRNA control (MC-siControl) o con siRNA Stat3 (MC-siStat3), o inyectados con PBS s.c. ($n=5$ /grupo). Luego de tres inmunizaciones con un intervalo de dos semanas entre cada una, los animales se desafiaron con un fragmento de tumor C4HD y simultáneamente se les aplicó un *pellet* de MPA en el flanco opuesto. **B.** El crecimiento tumoral se muestra como volumen tumoral, calculado como $(L \times A^2)/2$, donde A es el ancho y L es el largo del tumor. * $p < 0,05$ vs MC-siControl. Datos presentados como media \pm EEM. Experimento representativo de 2 realizados. MC: medio condicionado.

Por último, decidimos estudiar la respuesta inmune en linfocitos T y células NK aislados a partir del bazo de los ratones del experimento descrito en la Figura 13. Como marcadores de activación, estudiamos la expresión de CD44 y la expresión de CD69 que permiten detectar la activación de linfocitos T (Simms & Ellis, 1996) y de células NK (Ziegler et al., 1993). Observamos que

los ratones inmunizados con células C4HD irradiadas junto con un *pellet* conteniendo el MC-siStat3, presentaron una mayor activación de linfocitos T CD4⁺ (Figura 14A) en comparación con el grupo inmunizado con MC-siControl. Asimismo, las células NK de los ratones inmunizados con MC-siStat3 tenían mayor expresión del marcador de activación CD69 con respecto al grupo inmunizado con MC-siControl (Figura 14B). Teniendo en cuenta que la capacidad de degranulación de las células NK es clave para la eliminación de células tumorales, decidimos evaluarla analizando la expresión del marcador CD107a, que es una molécula asociada a gránulos de granzimas y perforinas que queda expuesta en la superficie cuando estos son liberados (Anfossi et al., 2006). Para ello, realizamos cocultivos de 18 h de esplenocitos con distintas proporciones de células YAC-1, que es una línea celular sensible a la actividad citotóxica de las células NK. Posteriormente cosechamos las células y realizamos una marcación con anticuerpos específicos acoplados a distintos fluorocromos con el objeto de determinar el porcentaje de células NK CD107a⁺. Como se muestra en la Figura 14C, las células NK de ratones inmunizados con el MC-siStat3 cultivados en presencia de células YAC-1 muestran mayor expresión en superficie del marcador CD107a que las células NK de ratones inmunizados con el MC-siControl.

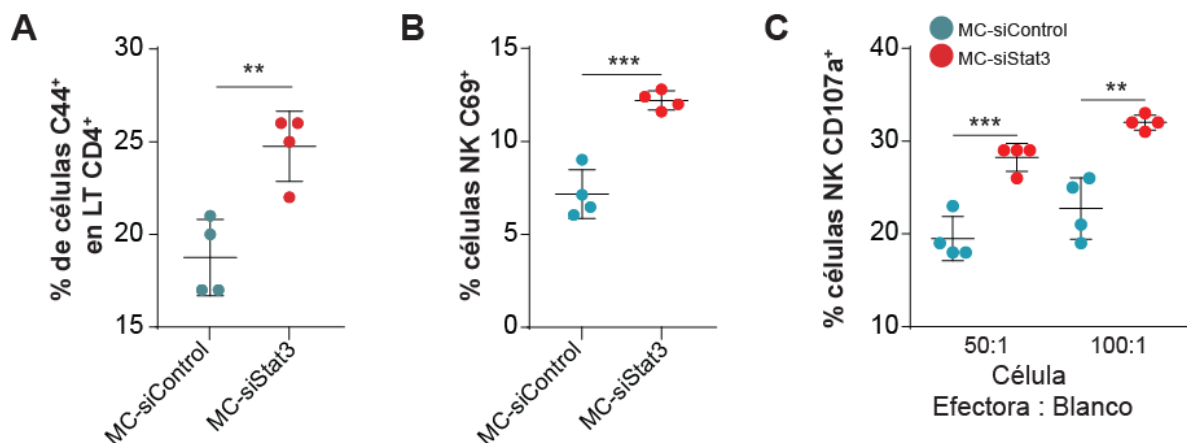


Figura 14. A. La inmunoterapia de MC-siStat3 y células 4T1 irradiadas estimula una respuesta inmune antitumoral. Los esplenocitos de ratones sometidos a la inmunoterapia descrita en la Figura 13, se tiñeron con anticuerpos anti CD3, CD4, CD44, CD69, DX5 y CD107a y luego se sometieron a análisis de citometría de flujo para calcular el porcentaje de: linfocitos T activados, CD3⁺, CD4⁺, CD44⁺ (A). Las células NK se definieron como la población CD3/DX5⁺ y se determinó su activación mediante tinción con anticuerpo anti-CD69 (B). C. La degranulación de células NK se estudió mediante estimulación *ex vivo* con diferentes

proporciones de células YAC-1 y tinción con anticuerpo anti-CD107a. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs. MC-siControl. Datos presentados como $\text{media} \pm \text{EEM}$. Experimento representativo de 3 realizados. LT: linfocitos T. MC-siControl: medio condicionado de células C4HD transfectadas con siRNA control. MC-siStat3: medio condicionado de células C4HD transfectadas con siRNA Stat3.

3.2 El SASP derivado de células que tienen silenciado Stat3 es un adyuvante para una inmunoterapia celular terapéutica contra cáncer de mama triple negativo

Teniendo en cuenta que el protocolo de inmunización profiláctica basado en la administración del MC-siStat3 tuvo un efecto antitumoral contra el tumor C4HD, decidimos trasladarnos a una condición más exigente con relevancia clínica como es la inmunización terapéutica. Con el objetivo de extender nuestros resultados obtenidos en el tumor C4HD a otros modelos tumorales, evaluamos la eficacia de la inmunización terapéutica utilizando el carcinoma mamario murino 4T1. Este tumor es capaz de generar metástasis en diversos órganos, incluyendo pulmón, hígado, cerebro y hueso. Diseñamos un protocolo de administración terapéutico que consistió en inmunizaciones seriadas con células 4T1 salvajes irradiadas simultáneamente con el *pellet* de MC-siStat3 o MC-siControl, luego del establecimiento del tumor (Figura 15A). Como control, inyectamos animales con PBS. Monitoreamos el crecimiento tumoral a lo largo del experimento y observamos una marcada inhibición del mismo en los ratones tratados con MC-siStat3 (Figura 15B). El crecimiento tumoral fue similar entre el grupo inmunizado con MC-siControl y el grupo tratado con PBS. Por último, contamos el número de nódulos metastásicos en pulmón y observamos que los pulmones de los ratones pertenecientes al grupo MC-siStat3 presentaban una marcada disminución en el número de colonias metastásicas en comparación al grupo MC-siControl (Figura 15C).

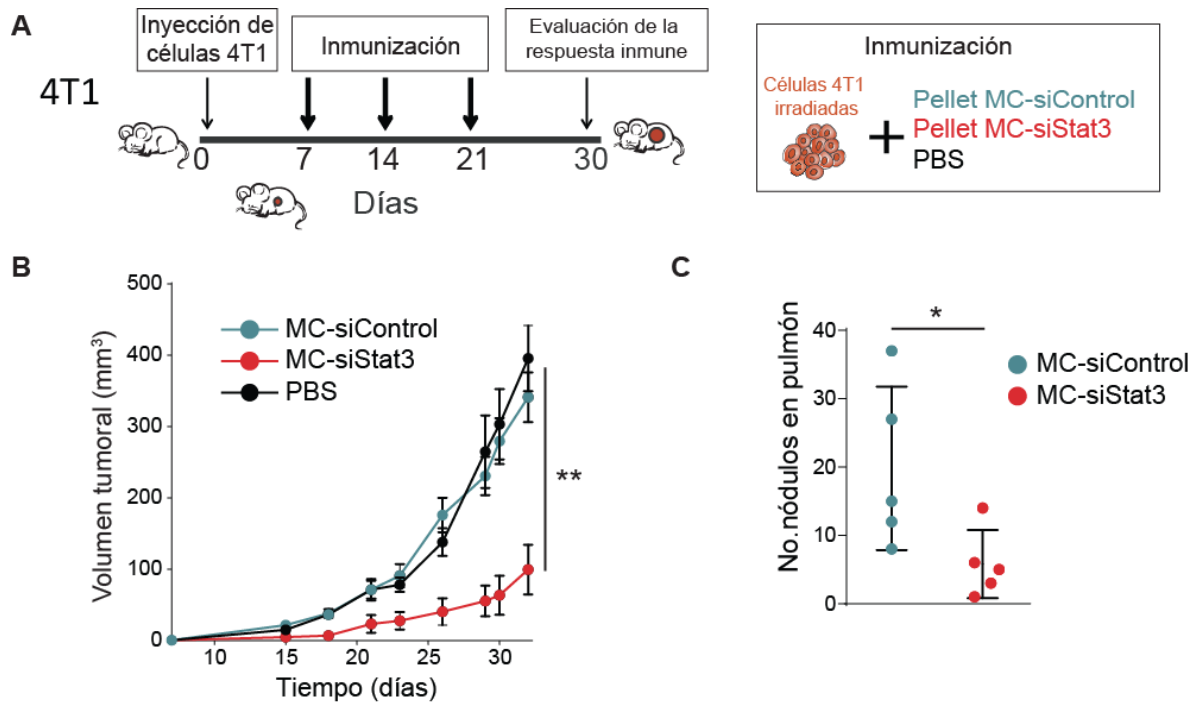


Figura 15. La inmunoterapia con MC-siStat3 y células 4T1 irradiadas disminuye el crecimiento tumoral y las metástasis del tumor 4T1. **A.** Protocolo de inmunoterapia: Los ratones hembra BALB/c fueron desafiados con 10^4 células 4T1 s.c. Cuando el tumor era palpable, los animales se distribuyeron al azar para luego ser inyectados con 10^6 células 4T1 irradiadas s.c. y con un *pellet* que contiene el MC de células 4T1 transfectadas con siRNA control (MC-siControl) o con siRNA Stat3 (MC-siStat3), o inyectados con PBS s.c. una vez a la semana durante tres semanas (n=5/grupo). Una semana después de la última inmunización, se sacrificaron los ratones. **B.** El crecimiento tumoral se muestra como volumen tumoral, calculado como $(L \times A^2)/2$, donde A es el ancho y L es el largo del tumor. **C.** Se obtuvieron los pulmones, se fijaron y se contó el número de nódulos tumorales de forma macroscópica. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, vs MC-siControl. Datos presentados como media \pm EEM. Experimento representativo de 5 realizados.

Nuevamente, analizamos el estado de activación de distintas poblaciones en el bazo de los ratones inmunizados. El análisis de las poblaciones inmunes en el bazo de animales inmunizados con MC-siStat3 mostró que los linfocitos T CD4⁺ tenían una expresión más elevada de los marcadores de activación CD69 y CD44 en comparación con el grupo MC-siControl (Figura 16A y 16B, respectivamente). Cabe destacar, que este último marcador de activación, no se encontraba aumentado en linfocitos T CD8⁺ de ratones inmunizados con el MC-siStat3 respecto al grupo MC-siControl (Figura 16C).

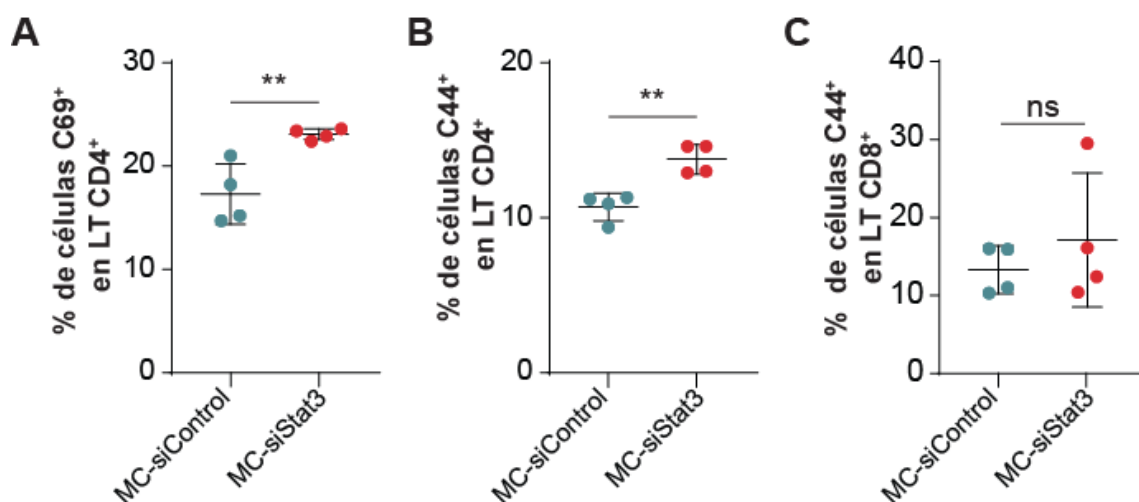


Figura 16. La inmunoterapia basada en la administración del MC-siStat3 activa linfocitos T CD4⁺. Los esplenocitos de ratones sometidos a la inmunoterapia descrita en la Figura 15, se tiñeron con anticuerpos anti CD3, CD4, CD8, CD44, CD69 y luego se sometieron a análisis de citometría de flujo para calcular el porcentaje de: linfocitos T activados, CD3⁺, CD4⁺, CD69⁺ **(A)** CD3⁺, CD4⁺, CD44⁺ **(B)** y CD3⁺, CD8⁺, CD44⁺ **(C)**. ns: no significativo, *p<0,05, **p<0,01 vs. MC-siControl,. Datos presentados como media±EEM Experimento representativo de 3 realizados. LT: linfocitos T.

Por otro lado, decidimos estudiar la activación y degranulación las células NK. Observamos que los ratones inmunizados con el MC-siStat3 presentaron una expresión más alta del marcador de activación CD69 en comparación con los ratones inmunizados con el MC-siControl (Figura 17A). Para estudiar la degranulación de las células NK, nuevamente realizamos cocultivos de 18 h de esplenocitos con distintas proporciones de células YAC-1, cosechamos las células y realizamos una marcación con anticuerpos específicos acoplados a distintos fluorocromos con el objeto de determinar el porcentaje de células NK CD107a⁺. Como se muestra en la Figura 17B, las células NK de ratones inmunizados con el MC-siStat3 cultivados en presencia de células YAC-1 muestran mayor expresión en superficie del marcador CD107a que las células NK de ratones inmunizados con el MC-siControl.

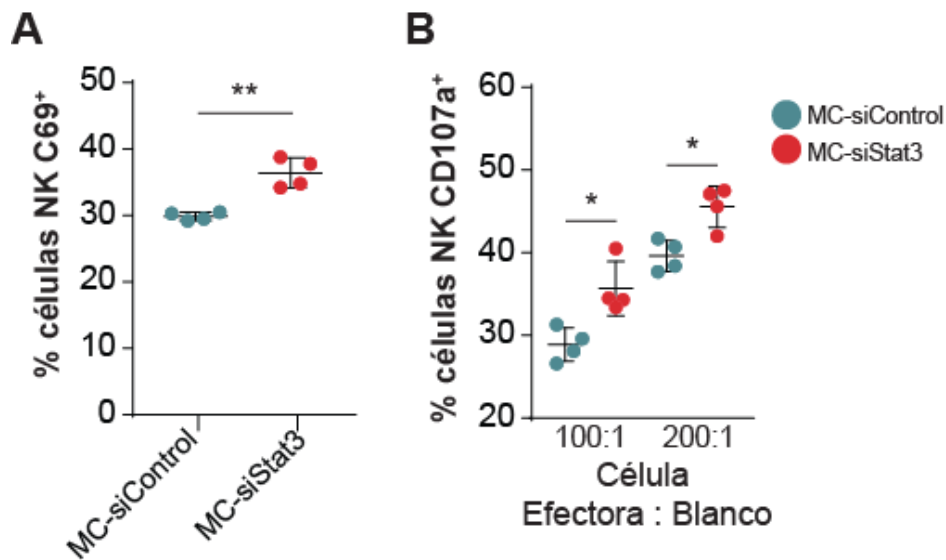


Figura 17. La inmunoterapia basada en el MC-siStat3 y células 4T1 irradiadas activa a las células NK. **A.** Las células NK de los esplenocitos de ratones sometidos a la inmunoterapia descrita en la Figura 15, se identificaron como la población CD3⁺/DX5⁺ y su activación mediante tinción con anticuerpo anti-CD69 **B.** La degranulación de células NK se estudió mediante estimulación *ex vivo* con diferentes proporciones de células YAC-1 y tinción con anticuerpo anti-CD107a. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. MC-siControl. Datos presentados como media \pm EEM Experimento representativo de 3 realizados.

Como se describió en la Introducción, los tumores que tienen activación constitutiva de Stat3, como el tumor 4T1, producen una expansión de poblaciones inmunosupresoras (Figura 5 de la Introducción) como los linfocitos Treg y las MDSCs. En la figura 18A, podemos observar que la inmunización con el MC-siStat3 disminuye el porcentaje de MDSCs en el bazo. Este es un resultado esperado, ya que existe una correlación entre el tamaño del tumor 4T1 y la frecuencia de MDSCs en el tumor y distintos órganos, incluido el bazo (Bunt et al., 2007; Younos et al., 2011). Por otra parte, no observamos diferencia en la frecuencia de linfocitos Treg (Figura 18B).

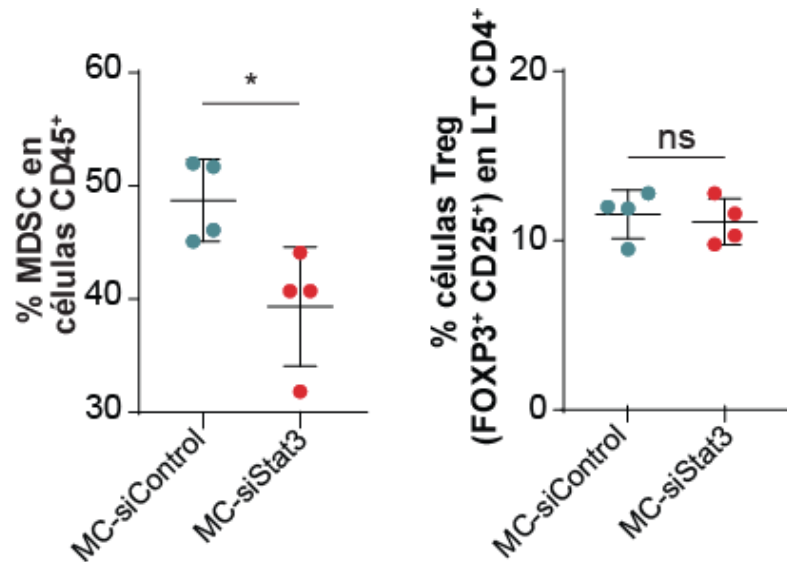


Figura 18. La inmunoterapia basada en el MC-siStat3 y células 4T1 disminuye las MDSC, pero no afecta los linfocitos Treg. Los esplenocitos de ratones sometidos a la inmunoterapia descrita en la Figura 15, se tiñeron con anticuerpos anti CD11b, Gr1, CD3, CD4, CD25 y FOXP3 y luego se sometieron a análisis de citometría de flujo para calcular el porcentaje de: células mieloides supresoras CD11b⁺, Gr1⁺ (A) y linfocitos Treg CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺ (B). ns: no significativo, * p<0,05 vs. MC-siControl. Datos presentados como media±EEM Experimento representativo de 3 realizados.

Hasta el momento, demostramos que el SASP inducido por silenciamiento de Stat3 estimula una potente respuesta inmune antitumoral cuando es administrado tanto de forma profiláctica como terapéutica junto con células salvajes irradiadas. Estos resultados nos alentaron a estudiar si el SASP puede desencadenar la respuesta inmune antitumoral, de forma independiente de una fuente de antígenos, proporcionada por las células irradiadas. De esta forma, queríamos comprobar si el silenciamiento de Stat3 induce la liberación de antígenos tumorales, ya sea solubles o presentes en exosomas. Realizamos un protocolo de administración terapéutico similar al descrito anteriormente, que consistió en inmunizaciones seriadas con el *pellet* conteniendo el MC-siStat3 o MC-siControl, luego del establecimiento del tumor (Figura 19A). En la figura 19B se observa la importancia de una fuente de antígenos tumorales para el éxito de esta inmunoterapia, ya que la inmunización con el MC-siStat3 solo no tuvo ningún impacto sobre el crecimiento tumoral en comparación con el MC-siControl.

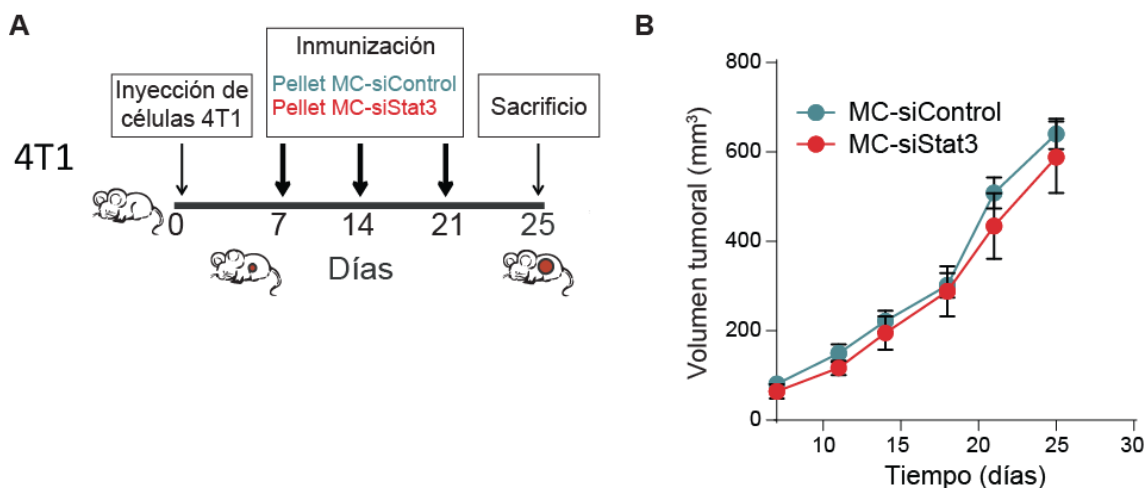


Figura 19. La inmunoterapia con MC-siStat3 depende de una fuente de antígenos tumorales. **A.** Protocolo de inmunoterapia: Los ratones BALB/c fueron desafiados con 10^4 células 4T1 s.c.. Cuando el tumor era palpable, los animales fueron inmunizados con un *pellet* que contiene el MC liofilizado de células 4T1 transfectadas con siRNA control (MC-siControl) o con siRNA Stat3 (MC-siStat3) una vez a la semana durante tres semanas. **B.** El crecimiento tumoral se muestra como volumen tumoral, calculado como $(L \times A^2)/2$, donde A es el ancho y L es el largo del tumor. Experimento representativo de 2 realizados.

3.3 El SASP derivado de células que tienen silenciado Stat3 actúa en forma sinérgica con inhibidores de puntos de control inmunitario contra melanoma

Para poder validar nuestros resultados previos en otro tipo de tumor y en otra cepa de ratones, realizamos un experimento similar al descrito anteriormente pero utilizando el modelo murino de melanoma B16. En las secciones de Resultados 1 y 2, observamos que el melanoma B16 es adicto a Stat3, al igual que los tumores C4HD y 4T1, y el SASP tiene efectos similares *in vitro* al producido por las células 4T1. Como se mencionó en la sección Materiales y Métodos, en esta Tesis trabajamos con la variante del tumor B16 que expresa ovoalbúmina (OVA), lo que nos permitió monitorear una respuesta específica contra el tumor. Al igual que en el modelo 4T1, realizamos una administración terapéutica de células B16 irradiadas junto con el MC-siStat3 o MC-siControl (Figura 20A). Como control, inyectamos animales con PBS. Se realizaron dos experimentos en paralelo, para poder estudiar el crecimiento tumoral y la respuesta inmune a tiempo final o para analizar la supervivencia de los animales. En el primer ensayo, donde sacrificamos los ratones a tiempo final, observamos una fuerte disminución en el crecimiento tumoral en ratones

C57BL/6 inmunizados con células B16 irradiadas y MC-siStat3 (Figura 20B) en comparación con MC-siControl. Por otro lado, realizamos un estudio de sobrevida, donde consideramos como evento la muerte del ratón, la presencia de signos evidentes de debilidad o cuando el tumor excede un volumen de 1000 mm³. En la figura 20C podemos observar que la inmunoterapia con MC-siStat3 produjo un aumento en la sobrevida de los ratones con respecto a los grupos MC-siControl y PBS (Figura 20C). En conjunto, estos resultados destacan la eficacia de la aplicación del MC-siStat3 en combinación con células tumorales irradiadas como inmunoterapia contra el melanoma B16.

Como se describió anteriormente, el efecto antitumoral y antimetastásico de nuestro protocolo de inmunoterapia con MC-siStat3 activa linfocitos T CD4⁺ y células NK, sin modificar la actividad de los linfocitos T CD8⁺. Con el fin de mejorar el efecto antitumoral de la inmunoterapia basada en la administración del MC-siStat3, decidimos promover la participación de los linfocitos T CD8⁺. Para lograr esto, combinamos nuestro protocolo de inmunoterapia junto con un anticuerpo contra el punto de control inmunitario, anti-PD-1. Los anticuerpos que bloquean la interacción entre la proteína PD-1 (expresada en linfocitos T citotóxicos) y PD-L1 (expresada en células tumorales) han demostrado ser exitosos para tratar cánceres humanos, ya que aumentan la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺. Sin embargo, los eventos de resistencia ocurren en alrededor del 60% de los pacientes con melanoma (Zou et al., 2016) y, por lo tanto, se necesitan opciones terapéuticas adicionales. En particular, el tumor B16 utilizado en este experimento, es resistente para la concentración de anticuerpo anti-PD-1 administrada. Nuevamente realizamos dos experimentos en paralelo, para poder estudiar el crecimiento tumoral y la respuesta inmune a tiempo final o para analizar la sobrevida de los animales. La combinación del anticuerpo anti-PD1 junto con la inmunoterapia basada en el MC-siStat3 inhibió el crecimiento del tumor B16 y mejoró la sobrevida de los ratones con respecto al MC-siStat3 o anti-PD-1 administrados solos (Figuras 20B y 20C). En conclusión, la combinación de estas terapias, no solo presentó un efecto sinérgico, sino que también la administración de la inmunoterapia basada en el MC-siStat3 sensibilizó al tumor B16 a la terapia con anti-PD-1.

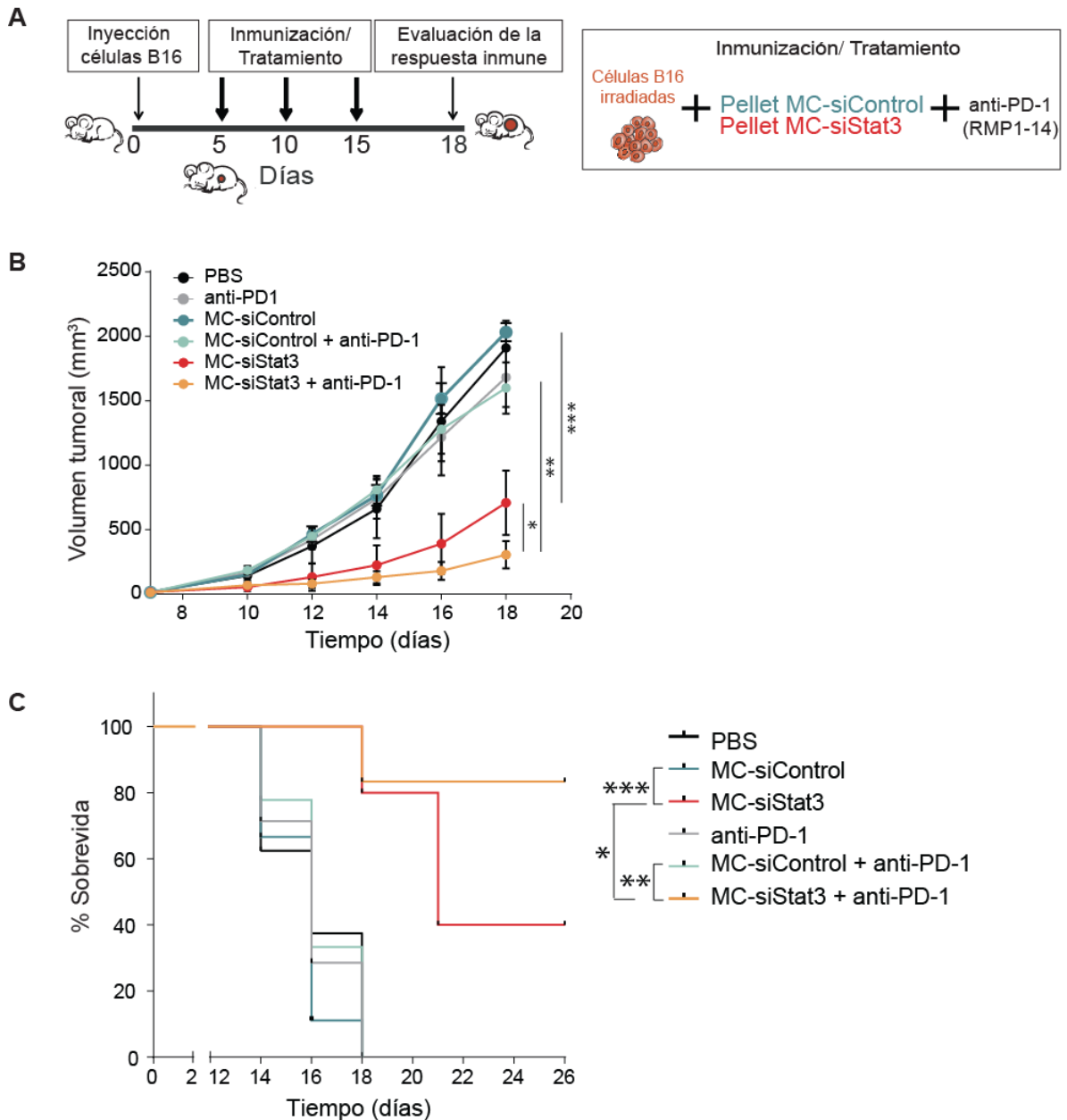


Figura 20. La inmunoterapia basada en el MC-siStat3 y células B-16 es efectiva contra el tumor de melanoma B16 y actúa en sinergia con anticuerpos anti PD-1. A. Protocolo de inmunoterapia: Los ratones C57BL/6 fueron desafiados con 2×10^5 células B16 s.c. Cuando el tumor fue palpable, los animales se distribuyeron al azar para luego ser inyectados con 10^6 células B16 irradiadas s.c. y con un *pellet* que contiene el MC liofilizado de células B16 transfectadas con siRNA control (MC-siControl) o con siRNA Stat3 (MC-siStat3) cada 5 días. Tres grupos de animales recibieron i.p. anticuerpos anti PD-1 (5 mg/kg) dos veces por semana. El grupo de control recibió inyección de PBS dos veces por semana. Tres días después de la última inmunización, se sacrificaron los ratones y se evaluó la respuesta inmune. **B.** El volumen del tumor se controló a lo largo del experimento. **C.** Curvas de supervivencia, expresados como gráfico de Kaplan-Meier. La pérdida de supervivencia se considera cuando el animal muere o el

volumen tumoral alcanza o excede 1000 mm³. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Datos presentados como media±EEM Experimento representativo de 2 realizados.

Dado que el tumor utilizado expresa el antígeno OVA, estudiamos la presencia de linfocitos T específicos contra el tumor, en sangre periférica mediante la técnica de ELISPOT (del inglés *enzyme-linked immunospot*). Este método se basa en la detección de la secreción de citoquinas por linfocitos T específicos de antígeno tras la estimulación con el péptido deseado. En este caso, analizamos la respuesta de linfocitos T circulantes reestimulados con el péptido sintético de OVA restringido al MHC de clase I (SIINFEKL). Observamos que el tratamiento con MC-siStat3 junto con anti-PD1 indujo una respuesta inmune antígeno específica de los linfocitos T CD8⁺, ya que se observó mayor cantidad de puntos productores de IFN γ en este grupo con respecto al grupo MC-siStat3 (Figura 21). Los grupos que recibieron anti-PD-1, ya sea solo o con MC-siControl, presentan una tendencia a un mayor número de puntos en el ELISPOT, pero esta diferencia no es significativa. Sin embargo, esta observación confirma la activación de los linfocitos T CD8⁺ por acción del anticuerpo anti-PD-1.

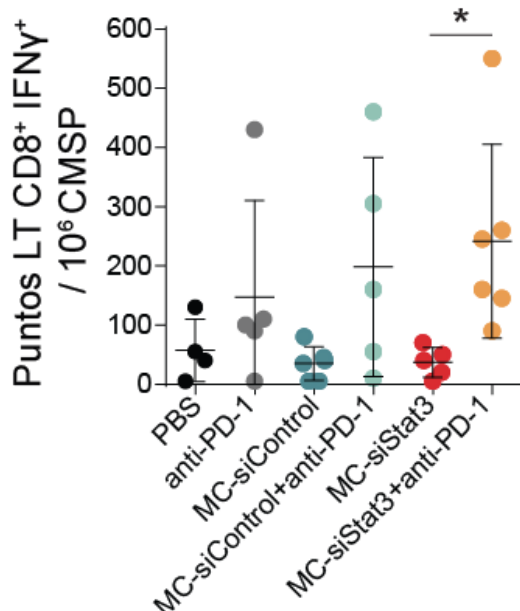


Figura 21. La combinación de la inmunoterapia basada en el MC-siStat3 con anti-PD-1 produce una respuesta tumor específica. ELISPOT de producción de IFN γ en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) al día 14 del experimento descrito en la figura 20. Las CMSP se incubaron con el péptido OVA257-264 (SIINFEKL) o un péptido control por

24h y las células secretoras de IFN- γ se contaron y expresan como puntos relativos a un millón de CMSP. LT: linfocito T. Cada punto en el gráfico representa células provenientes de un ratón. * $p < 0,05$. Datos presentados como media \pm EEM

Al final del experimento, evaluamos el infiltrado de células inmunes en el tumor. Como puede observarse en las Figuras 22A y 22B, el tratamiento con MC-siStat3 junto con anti-PD-1 aumentó tanto el infiltrado leucocitario (células CD45+) como el infiltrado de linfocitos (células TCR β +) en el tumor con respecto a MC-siStat3 solo. Estos datos subrayan la posible aplicación de la inmunoterapia basada en MC-siStat3 para sensibilizar los tumores a los inhibidores de los puntos de control inmunitario.

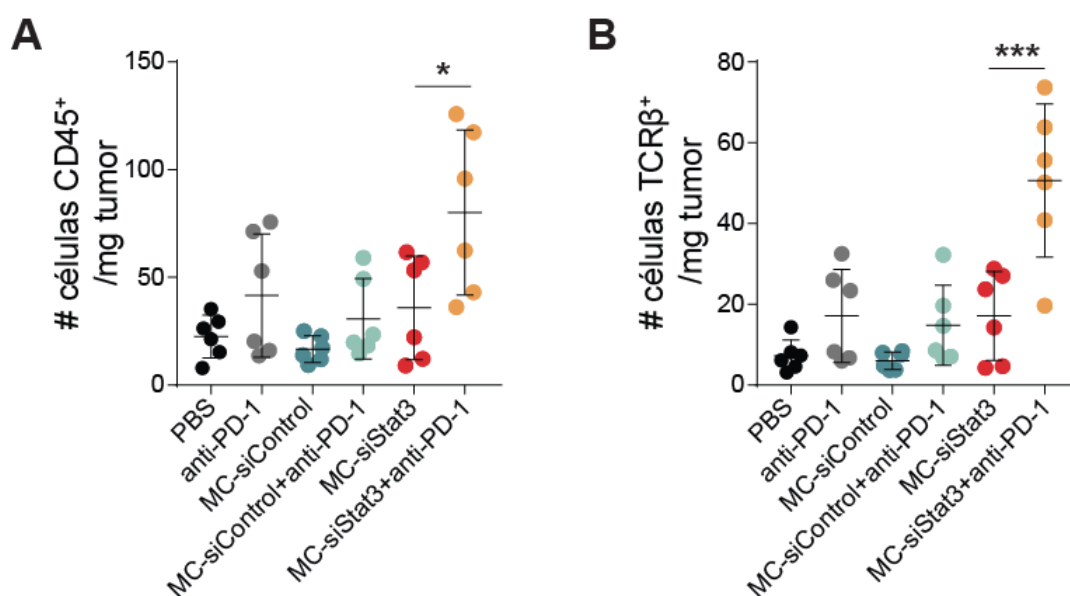


Figura 22. La inmunoterapia basada en el MC-siStat3 en combinación con anticuerpos anti PD-1 aumenta el infiltrado tumoral de linfocitos T en melanoma. A. Se aislaron leucocitos infiltrantes de tumor al final del experimento descrito en la figura 20, se tiñeron con anticuerpos anti CD45 y TCR β + y luego se sometieron a análisis de citometría de flujo para calcular el número de: células CD45+ y **B.** TCR β + mediante citometría de flujo. Ambos se relativizaron al peso del tumor inicial (mg). * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$. Cada punto en el gráfico representa células provenientes de un ratón. Datos presentados como media \pm EEM

Como observamos un mayor infiltrado de linfocitos T en el grupo inmunizado con el MC-siStat3 junto con anti-PD-1, decidimos caracterizar el fenotipo y estado de activación de dicho infiltrado. Para cumplir con este objetivo evaluamos los marcadores CD44 y CD62L que, como se describió en

la sección de Resultados 2, permiten identificar el estado de activación y diferenciación de los linfocitos T. Además, estudiamos estos marcadores en linfocitos T infiltrantes y en el bazo de los ratones al final del experimento para evaluar la respuesta local en el tumor y sistémica. Observamos que el tratamiento con anti-PD-1 junto con la inmunoterapia basada en el MC-siStat3 induce la activación y diferenciación hacia un perfil efector de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ tanto en las células infiltrantes del tumor como en el bazo (Figura 23A y 23B, respectivamente). Además, podemos observar que la inmunización con el MC-siStat3 induce la activación de linfocitos T CD4⁺ infiltrantes de tumor en comparación con el MC-siControl (Figura 23A). En este experimento no detectamos un aumento significativo en la activación de linfocitos T CD4⁺ en el bazo, como se observó en el caso de las 4T1 (Figura 16), aunque hay una tendencia marcada hacia el aumento (Figura 23A). Nuevamente, detectamos que la inmunización con MC-siStat3 no logra activar a los linfocitos T CD8⁺ en el tumor ni en el bazo (Figura 23B). Cabe destacar que la terapia con anti-PD-1 solo no fue suficiente para activar los linfocitos T CD8⁺ (Figura 23B). En esta figura, podemos dilucidar que la inmunoterapia con células salvajes irradiadas y el MC-siStat3, produce una diferenciación de linfocitos T CD4⁺ hacia un perfil efector, que por algún mecanismo que podría involucrar la secreción de citoquinas y quimioquinas, permite que la terapia con anti-PD-1 impacte sobre la activación de linfocitos T CD8⁺.

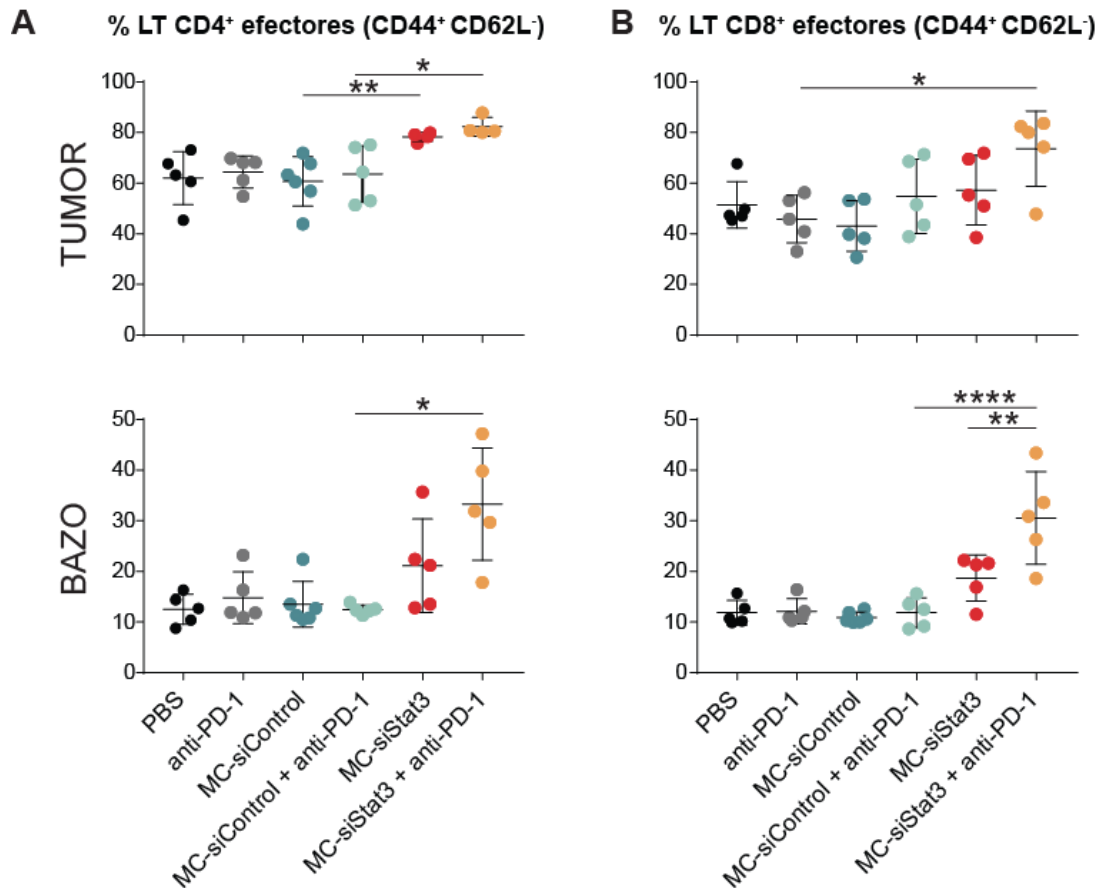


Figura 23. La inmunoterapia basada en el MC-siStat3 en combinación con anticuerpos anti PD-1 activa linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Se aislaron esplenocitos o leucocitos infiltrantes de tumor de ratones sometidos a la inmunoterapia descrita en la Figura 20, se tiñeron con anticuerpos anti CD3, CD4, CD8, CD44 y CD62L y luego se sometieron a análisis de citometría de flujo para calcular el porcentaje de: linfocitos T efectores CD3⁺, CD4⁺, CD44⁺, CD62L⁻ (**A**) y CD3⁺, CD8⁺, CD44⁺, CD62L⁻ (**B**) en tumor y bazo, relativizado a células CD45⁺. *p<0,05, **p<0,01 y ****p<0,001. . Cada punto en el gráfico representa células provenientes de un ratón. Datos presentados como media±EEM Experimento representativo de 2 realizados. LT: linfocitos T.

Por otro lado, como vimos modulación de células NK en los experimentos realizados con los tumores C4HD y 4T1, decidimos estudiar la activación de dichas células en el infiltrado tumoral y en el bazo de ratones del experimento descrito en la figura 20. En primer lugar, detectamos que todos los grupos experimentales no presentaron diferencias en el porcentaje de células NK en el tumor o en el bazo (Figura 24A). Luego, detectamos la activación de las células NK mediante el marcador CD44 descrito anteriormente. Observamos que los ratones inmunizados con el MC-siStat3 presentaron mayor activación de las células NK en el bazo y se observó una

tendencia en las células provenientes del tumor, aunque no fue estadísticamente significativa (Figura 24B). Asimismo, la combinación de anti-PD-1 con la inmunización con el MC-siStat3 produjo un aumento de la activación de las células NK presentes en tumor y bazo, en comparación con el resto de los grupos que recibieron anti-PD-1 solo.

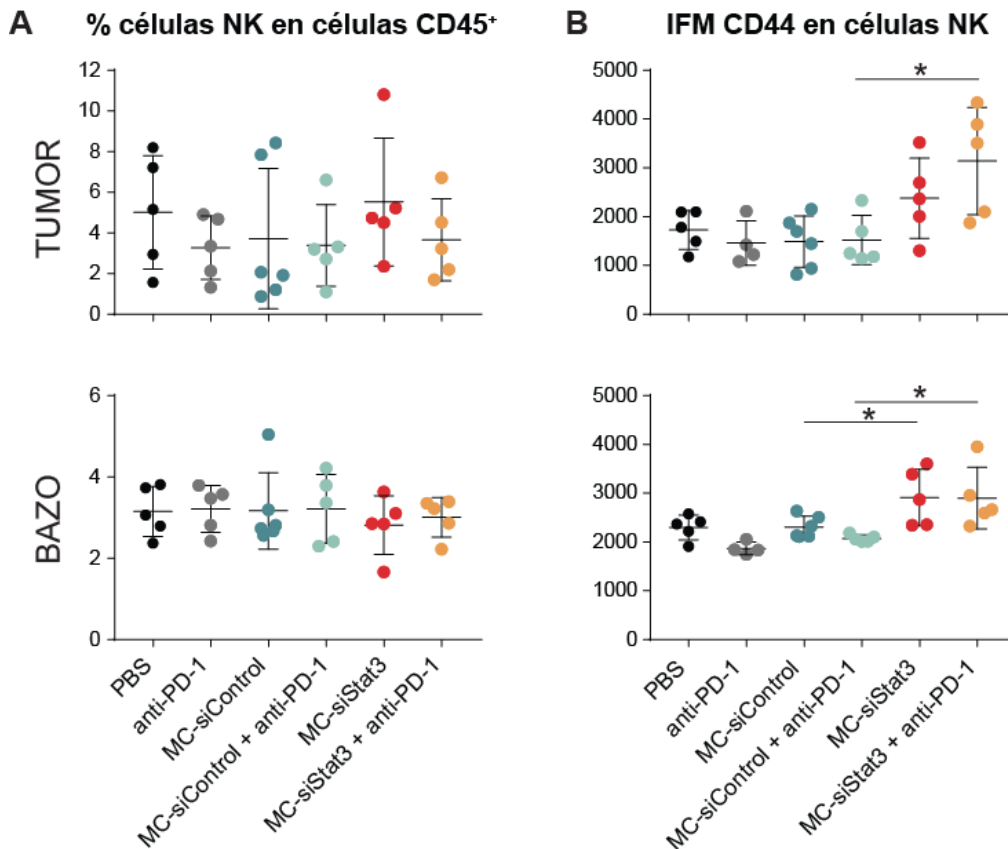


Figura 24. La inmunoterapia basada en el MC-siStat3 en combinación con anticuerpos anti PD-1 activa las células NK del bazo e infiltrantes del tumor. Se aislaron esplenocitos o leucocitos infiltrantes de tumor de ratones sometidos a la inmunoterapia descrita en la Figura 20, se tiñeron con anticuerpos anti CD3, NK1.1 y CD44 y luego se sometieron a análisis de citometría de flujo para calcular el porcentaje de células NK totales CD3⁻, NK1.1⁺ (**A**) o activadas CD3⁻, NK1.1⁺ CD44⁺ (**B**) en tumor y bazo. *p<0,05. Cada punto en el gráfico representa células provenientes de un ratón. Datos presentados como media±EEM. Experimento representativo de 2 realizados. LT: linfocitos T. IFM: intensidad de fluorescencia media.

Como se describió anteriormente, los tumores que tienen activación constitutiva de Stat3, como es el caso del melanoma B16, pueden producir expansión de linfocitos Treg (Figura 5 de la Introducción). En la figura 25, podemos observar

que la inmunización con el MC-siStat3 disminuye el porcentaje de linfocitos Treg infiltrantes del tumor en comparación al MC-siControl. No observamos diferencias con respecto al porcentaje de linfocitos Treg en el bazo de los ratones, lo mismo que habíamos encontrado en el caso de las 4T1 (Figura 18). En el caso de los ratones tratados con anti-PD-1 junto con la inmunoterapia con MC-siStat3, observamos una disminución de los linfocitos Treg infiltrantes del tumor y en el bazo en comparación con los grupos que recibieron anti-PD-1 (Figura 25).

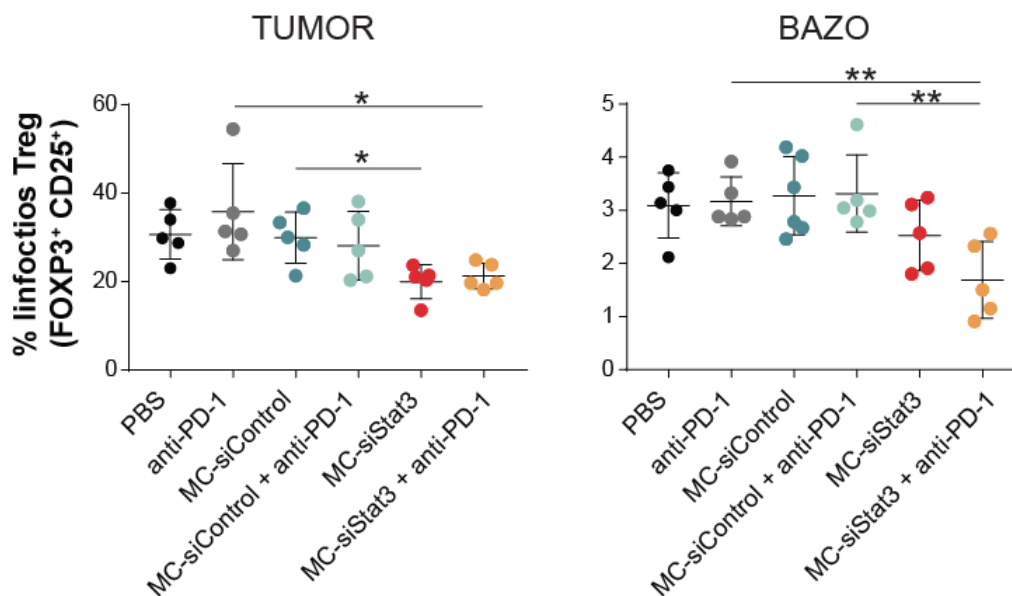
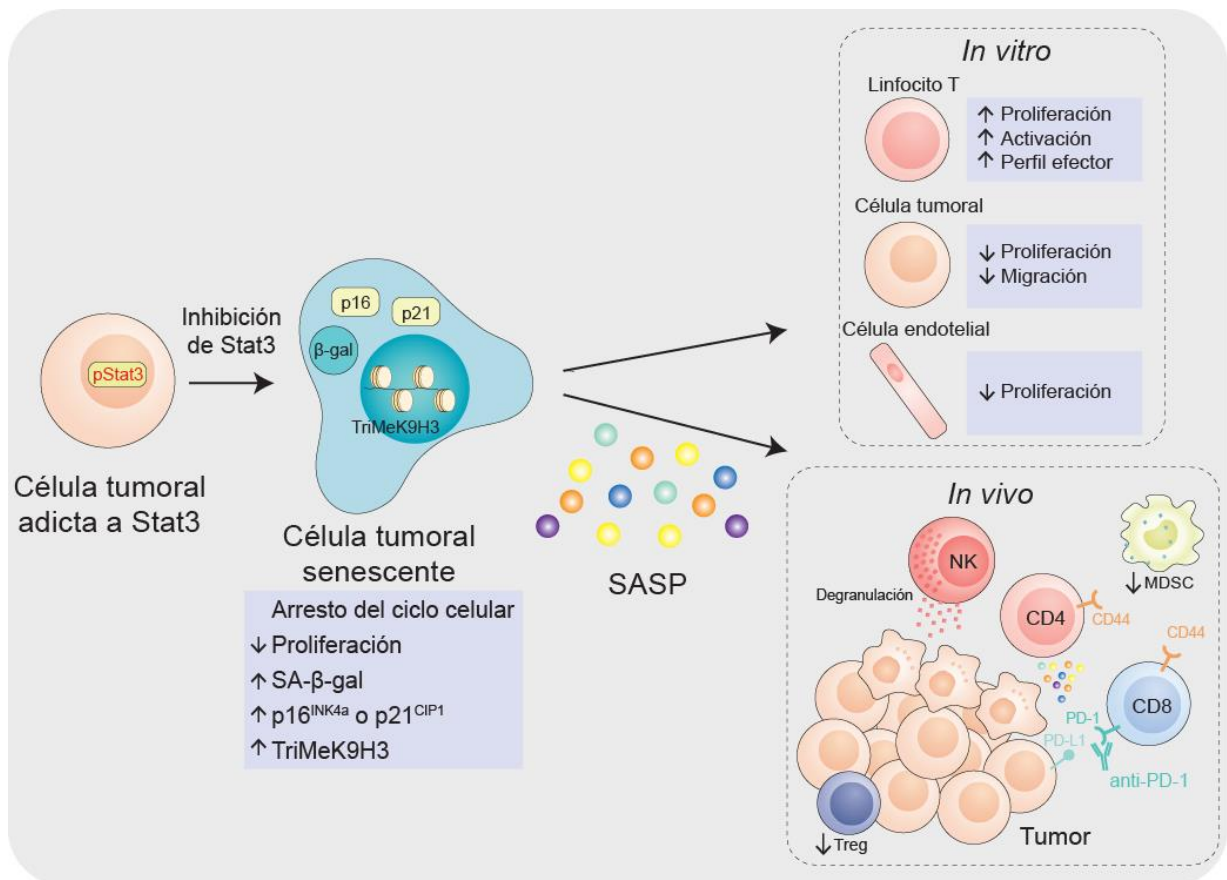


Figura 25. La inmunoterapia basada en el MC-siStat3 en combinación con anti-PD-1 disminuye el porcentaje de linfocitos Treg en tumor y bazo. Se aislaron esplenocitos o leucocitos infiltrantes de tumor de ratones sometidos a la inmunoterapia descrita en la Figura 20, se tiñeron con anticuerpos anti CD3, CD4, CD25 y FOXP3 y luego se sometieron a análisis de citometría de flujo para calcular el porcentaje de linfocitos Treg CD3⁺, CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺ en tumor y bazo. *p<0,05 y **p<0,01. Cada punto en el gráfico representa células provenientes de un ratón. Datos presentados como media±EEM Experimento representativo de 2 realizados.

En esta tercera parte de resultados observamos que:

- El SASP derivado de células senescentes inducidas por silenciamiento de Stat3 es un adyuvante para una vacuna celular contra el tumor C4HD de forma profiláctica.
- El SASP inducido por silenciamiento de Stat3 es un adyuvante para una vacuna celular contra el tumor de cáncer de mama triple negativo 4T1 y melanoma B16 de forma terapéutica.
- La inmunoterapia basada en el MC-siStat3 activa linfocitos T CD4⁺ y células NK.
- La inmunoterapia basada en el MC-siStat3 en combinación con un anticuerpo anti-PD-1 presenta un efecto sinérgico contra el melanoma B16, debido a la activación de linfocitos T CD8⁺ y una disminución en la población de linfocitos Treg.



Objetivo específico #4: Identificar los componentes del SASP inducido por inhibición de Stat3 responsables de la inmunovigilancia.

4.1 Caracterización de las citoquinas y quimioquinas que componen el SASP inducido por silenciamiento de Stat3

Con los resultados descritos hasta ahora, hemos demostrado que el silenciamiento de Stat3 gatilla senescencia en diversos tipos de tumores que tienen activación constitutiva de dicho oncogén y que el secretoma de estas células puede inducir una respuesta antitumoral *in vitro* e *in vivo*. El siguiente objetivo fue caracterizar la composición del SASP inducido por silenciamiento de Stat3 e identificar los mediadores responsables del efecto inmunoestimulador y antitumoral.

En primer lugar, utilizamos un arreglo de anticuerpos para detectar 111 citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento en el MC-siStat3 y MC-siControl de células 4T1 y B16. En la figura 25, podemos observar que muchas de las proteínas que permite evaluar el arreglo de anticuerpos no son detectables, al menos en los MC de células 4T1 y B16. En particular, observamos 11 y 7 proteínas aumentadas y 4 y 7 proteínas disminuidas en el MC-siStat3 con respecto al MC-siControl, en células 4T1 y B16, respectivamente (Figura 25). Entre las proteínas que disminuyen por bloqueo de Stat3, detectamos a VEGF y el factor inhibidor de leucemia (LIF, del inglés *leukemia inhibitory factor*), ambos genes regulados por dicho oncogén (Carpenter & Lo, 2014) (Figura 25). En el grupo de citoquinas aumentadas en el MC-siStat3 de 4T1 y B16 observamos un enriquecimiento en quimioquinas que atraen linfocitos T y células NK y citoquinas inducidas por IFN γ : CXCL10, CCL5, CCL2 e IL-15 (Figura 25).

4T1											
Adiponectin/Acrp30	CCL6/C10	CD160	CXCL9/MIG	Endostatin	ICAM-1/CD54	IL-2	IL-15	Lipocalin-2/NGAL	PDGF-BB	Resistin	WISP-1/CCN4
Amphiregulin	CCL11/Eotaxin	Chemerin	CXCL10/IP-10	Fetuin A/AHSG	IFN-γ	IL-3	IL-17A	LIX	Pentraxin 2/SAP	E-Selectin/CD62E	
Angiopoietin-1	CCL12/MCP-5	Chitinase 3-like 1	CXCL11/I-TAC	FGF acidic	IGFBP-1	IL-4	IL-22	M-CSF	Pentraxin 3/TSG-14	P-Selectin/CD62P	
Angiopoietin-2	CCL17/TARC	Coagulation Factor III/Tissue Factor	CXCL13/BLC/BCA-1	FGF-21	IGFBP-2	IL-5	IL-23	MMP-2	Periostin/OSF-2	Serpine E1/PAI-1	
Angiopoietin-like 3	CCL19/MIP-3β	Complement Component C5/C5a	CXCL16	Fit-3 Ligand	IGFBP-3	IL-6	IL-27 p28	MMP-3	Pref-1/DLK-1/FA1	Serpine F1/PEDF	
BAFF/BLyS/TNFSF13B	CCL20/MIP-3α	Complement Factor D	Cystatin C	Gas 6	IGFBP-5	IL-7	IL-28A/B	MMP-9	Proliferin	Thrombopoietin	
C1q R1/CD93	CCL21/6CKine	C-Reactive Protein/CRP	DKK-1	G-CSF	IGFBP-6	IL-10	IL-33	Myeloperoxidase	Proteinase 9/PCSK9	TIM-1/KIM-1/HAVCR	
CCL2/JE/ MCP-1	CCL22/MDC	CX3CL1/Fractalkine	DPPIV/CD26	GDF-15 mic1	IL-1ra/IL-1F3	IL-11	LDL R	Osteopontin (OPN)	RAGE	TNF-α	
CCL3/CCL4/MIP-1α/β	CD14	CXCL1/KC	EGF	GM-CSF	IL-1α/IL-1F1	IL-12 p40	Leptin	Osteoprotegerin/TNFRSF11B	RBP4	VCAM-1/CD106	
CCL5/RANTES	CD40/TNFRSF5	CXCL2/MIP-2	Endoglin/CD105	HGF	IL-1β/IL-1F2	IL-13	LIF	PD-ECGF	Reg3G	VEGF	
B16											
Adiponectin/Acrp30	CCL6/C10	CD160	CXCL9/MIG	Endostatin	ICAM-1/CD54	IL-2	IL-15	Lipocalin-2/NGAL	PDGF-BB	Resistin	WISP-1/CCN4
Amphiregulin	CCL11/Eotaxin	Chemerin	CXCL10/IP-10	Fetuin A/AHSG	IFN-γ	IL-3	IL-17A	LIX	Pentraxin 2/SAP	E-Selectin/CD62E	
Angiopoietin-1	CCL12/MCP-5	Chitinase 3-like 1	CXCL11/I-TAC	FGF acidic	IGFBP-1	IL-4	IL-22	M-CSF	Pentraxin 3/TSG-14	P-Selectin/CD62P	
Angiopoietin-2	CCL17/TARC	Coagulation Factor III/Tissue Factor	CXCL13/BLC/BCA-1	FGF-21	IGFBP-2	IL-5	IL-23	MMP-2	Periostin/OSF-2	Serpine E1+K23/PAI-1	
Angiopoietin-like 3	CCL19/MIP-3β	Complement Component C5/C5a	CXCL16	Fit-3 Ligand	IGFBP-3	IL-6	IL-27 p28	MMP-3	Pref-1/DLK-1/FA1	Serpine F1/PEDF	
BAFF/BLyS/TNFSF13B	CCL20/MIP-3α	Complement Factor D	Cystatin C	Gas 6	IGFBP-5	IL-7	IL-28A/B	MMP-9	Proliferin	Thrombopoietin	
C1q R1/CD93	CCL21/6CKine	C-Reactive Protein/CRP	DKK-1	G-CSF	IGFBP-6	IL-10	IL-33	Myeloperoxidase	Proteinase 9/PCSK9	TIM-1/KIM-1/HAVCR	
CCL2/JE/ MCP-1	CCL22/MDC	CX3CL1/Fractalkine	DPPIV/CD26	GDF-15 mic1	IL-1ra/IL-1F3	IL-11	LDL R	Osteopontin (OPN)	RAGE	TNF-α	
CCL3/CCL4/MIP-1α/β	CD14	CXCL1/KC	EGF	GM-CSF	IL-1α/IL-1F1	IL-12 p40	Leptin	Osteoprotegerin/TNFRSF11B	RBP4	VCAM-1/CD106	
CCL5/RANTES	CD40/TNFRSF5	CXCL2/MIP-2	Endoglin/CD105	HGF	IL-1β/IL-1F2	IL-13	LIF	PD-ECGF	Reg3G	VEGF	

Figura 25. Determinación semicuantitativa de citoquinas y quimioquinas del SASP inducido por silenciamiento de Stat3 mediante arreglo de anticuerpos. Se colectaron los MC-siControl y MC-siStat3 de células 4T1 y B16 y se analizaron a través de un arreglo de anticuerpos siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las proteínas no detectadas se muestran en letra *cursiva*; los factores abundantes están en negrita; las proteínas aumentadas en MC-siStat3 en comparación con el MC-siControl se resaltan en colorado, mientras que los cuadros verdes indican una expresión más baja después del silenciamiento de Stat3.

Dado que el arreglo de anticuerpos permite hacer una determinación semicuantitativa de las proteínas evaluadas, decidimos validar las modulaciones observadas mediante la técnica de ELISA. Verificamos, entonces, la regulación positiva en el MC-siStat3 de células 4T1 y B16 de las citoquinas y quimioquinas CXCL10, CCL2, CCL5 e IL-15 (Figura 26). Sin embargo, pudimos observar que el silenciamiento de Stat3 no modula los niveles de ninguna de estas citoquinas en las células MCA101, en las cuales el silenciamiento de Stat3 no induce senescencia (Figura 1 de Resultados). Además, en la figura 26 podemos observar que las células 4T1 secretan niveles más elevados de CCL2, CCL5 e IL-15 que con respecto a las células B16. Por otro lado las células B16 tienen una concentración de CXCL10 alrededor de 10 veces mayor que las células 4T1.

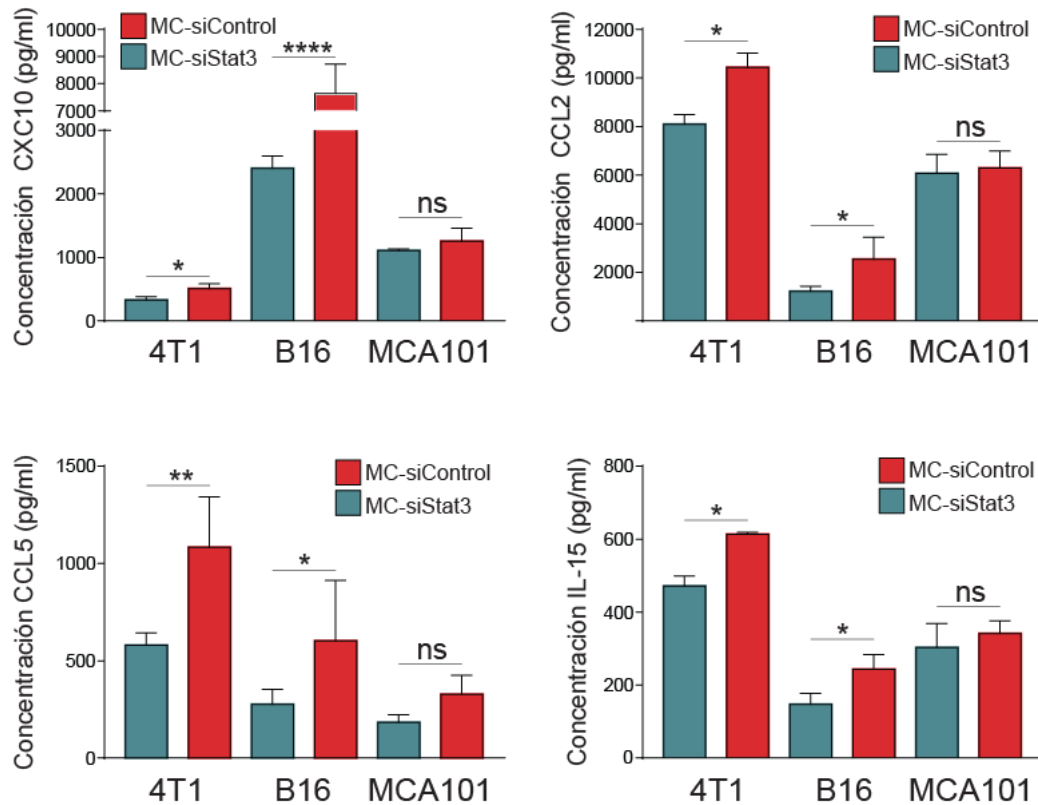


Figura 26. Determinación cuantitativa de citoquinas y quimioquinas por ELISA. Determinación de la secreción de CXCL10, CCL-2, CCL5 e IL-15 en MC de células 4T1, B16 y MCA101, mediante ELISA. ns: no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ vs MC-siControl. Datos presentados como media \pm EEM Experimento representativo de 2 realizados.

Como se mencionó en la introducción de esta Tesis, otro de los marcadores de las células senescentes es la producción de un SASP con citoquinas proinflamatorias, que, dependiendo de la concentración en la que se encuentran, pueden tener efectos duales. Una de las citoquinas principales es la IL-6 y otra la IL-1 β . Aquí, determinamos mediante ELISA, que el MC-siStat3 de células senescentes 4T1 y B16 tenían los mismos niveles de estas citoquinas proinflamatorias que el MC-siControl (Figura 27). Esto mismo se observó en el MC-siStat3 de células MCA101.

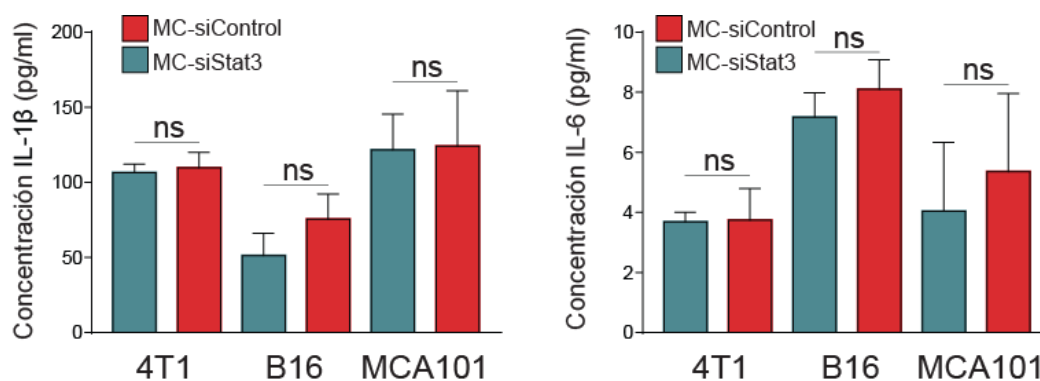


Figura 27. Determinación cuantitativa de IL-1β e IL-6 por ELISA Determinación de la secreción de IL-1β e IL-6 en MC de células 4T1, B16 y MCA101 mediante ELISA. Ns: no significativo vs MC-siControl. ns: no significativo. Datos presentados como media±EEM Experimento representativo de 2 realizados.

Por los resultados obtenidos hasta el momento, el SASP por inhibición de Stat3 no tiene incrementadas las citoquinas proinflamatorias clásicas asociadas a otros tipos de senescencia. Para comprender si el SASP inducido por silenciamiento de Stat3 está relacionado con el producido por otros tipos de senescencia, recuperamos los datos de arreglos de anticuerpos para proteínas similar al nuestro, pero realizado por distintos grupos (Acosta et al., 2008; Coppé et al., 2008; Liu & Hornsby, 2007; Rodier et al., 2009). Observamos que en los SASPs inducidos por activación de Ras (senescencia inducida por oncogenes: OIS por sus siglas en inglés), radiación (senescencia inducida por daño al ADN: DDIS por sus siglas en inglés) o el acortamiento de los telómeros (senescencia replicativa), hay muy pocas coincidencias entre ellos y el secretoma inducido por el bloqueo de Stat3 (Figura 28). Podemos resaltar la coincidencia en la regulación positiva de CCL-2 e CXCL10 y la discordancia en VEGF, LIF y la mieloperoxidasa. Estos datos resaltan la diferencia del SASP inducido por otros tipos de estímulos (OIS, DDIS, senescencia replicativa), con respecto al SASP inducido por silenciamiento de Stat3. En general, el SASP asociado a dichos tipos de senescencia suele tener un efecto protumoral, por lo que estas diferencias explicarían el efecto opuesto que observamos en el SASP-siStat3.

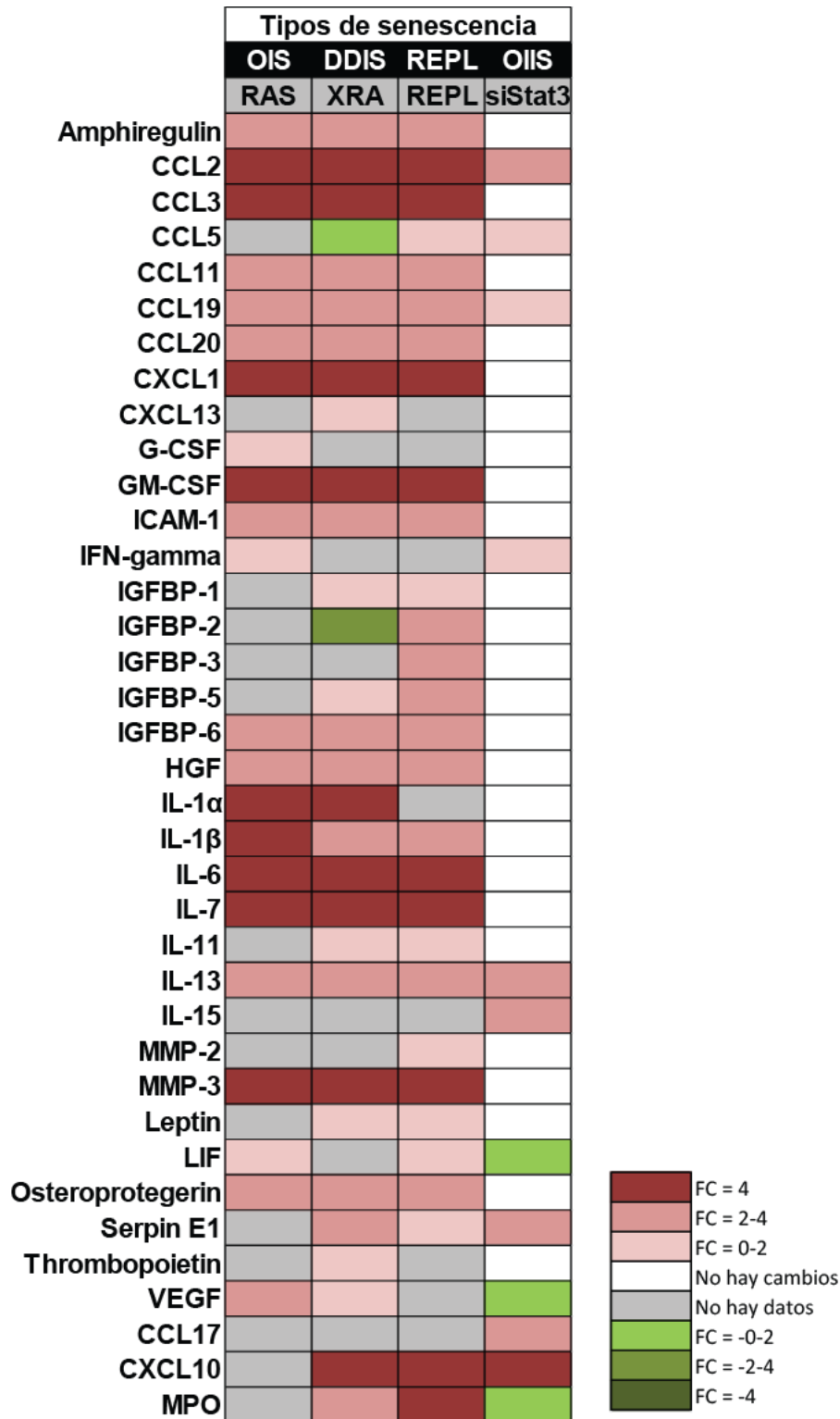


Figura 28. ELISA Determinación semicuantitativa de citoquinas y quimioquinas mediante arreglo de anticuerpos. Heat map de citoquinas, quimioquinas, metaloproteasas y factores de crecimiento secretados por células senescentes inducidas por diferentes estímulos determinados mediante arreglos de anticuerpos de proteínas. Los datos del secretoma de senescencia inducida por oncogenes (OIS), la senescencia inducida por daños en el ADN (DDIS) y senescencia replicativa, se obtuvieron de Acosta et al. Cell 133, 1006-1018, Coppé et

al. PLoS Biol. 6, 2853–2868, Rodier et al. Nat. Cell Biol. 11, 973–979 y Liu et al. Cancer Res. 67, 3117–3126. Senescencia inducida por oncogenes (OIS) corresponde a los resultados mostrados en figura 25. FC: Veces de cambio sobre control.

Hasta el momento, observamos que la senescencia inducida por inhibición de Stat3 tiene un secretoma que difiere de otros tipos de senescencia. Además, presenta características de inmunovigilancia contra células senescentes *in vitro* e *in vivo*. Para poder identificar qué citoquinas/quimioquinas del secretoma median la inmunovigilancia del SASP-siStat3, realizamos ensayos de neutralización con anticuerpos específicos dirigidos a los principales candidatos provenientes del arreglo de anticuerpos. La Figura 29 muestra que el bloqueo de CCL2, CCL5 e IL-15 redujo la proliferación de linfocitos T estimulada por MC-siStat3 de las células 4T1 y B16 a los niveles de MC-siControl. La neutralización de CXCR3 (receptor de CXCL10) también inhibió la actividad de proliferación de linfocitos T de MC-siStat3 de 4T1, pero el bloqueo del receptor de IFN α (IFNAR) no lo hizo. La neutralización de CXCR3 e IFNAR inhibió la actividad proliferativa del MC-siStat3 de células B16 por debajo del MC-siControl. Estos hallazgos están en línea con los resultados de CXCL10 obtenidos por ELISA (Figura 26), donde puede observarse que las células B16 producen niveles muy elevados de esta citoquina. Estos datos sugieren que múltiples factores secretados por células senescentes inducidas por silenciamiento de Stat3 pueden promover la proliferación de linfocitos T.

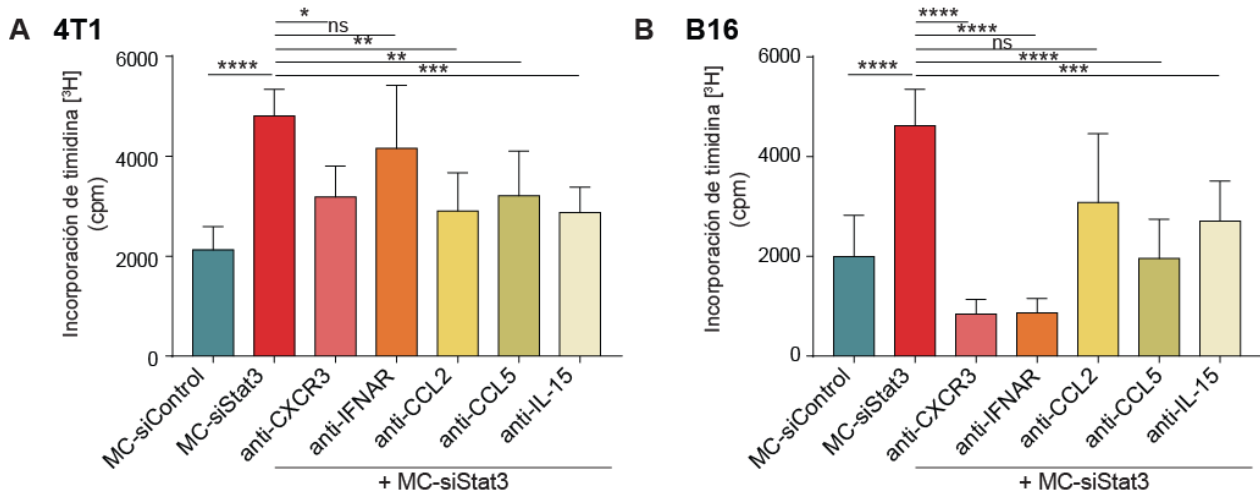


Figura 29. La actividad inmunoestimuladora del SASP inducido por silenciamiento de Stat3 depende de múltiples factores. Se purificaron linfocitos T de bazo de ratones BALB/c mediante selección negativa. Estos linfocitos se cultivaron durante 72 h con partículas magnéticas anti-CD3/CD28 y los MC indicados y se realizó un ensayo de proliferación por incorporación de timidina [³H]. ns: no , significativo, *p<0.05, **p<0,01, ***p<0,001****p<0,0001 vs MC-siControl o MC-siStat3. Datos presentados como media±EEM Experimento representativo de 4 realizados

4.2 Caracterización del SASP inducido por inhibición de Stat3 mediante proteómica cuantitativa

Hasta el momento, observamos que el SASP inducido por silenciamiento de Stat3 está enriquecido en citoquinas y quimioquinas que atraen y activan linfocitos T y células NK. Para tener un conocimiento más profundo de los factores presentes en el SASP inducido por silenciamiento de Stat3 decidimos realizar un análisis mediante proteómica. Para ello llevamos a cabo un estudio de proteómica cuantitativa utilizando la técnica de marcación con isótopos estables de aminoácidos en cultivo celular (SILAC por sus siglas en inglés *Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture*). Brevemente, cultivamos la línea celular 4T1 en medio de cultivo suplementado con isótopos “livianos” o “pesados” de los aminoácidos arginina y lisina, y luego de 8 repiques, corroboramos la correcta incorporación por espectrometría de masas (al menos del 90%). Una vez que las células estuvieron marcadas, las transfectamos con siRNA control o siRNA contra Stat3 y colectamos los MC como se describió en la sección Materiales y métodos. Los MC se

concentraron, cuantificaron y mezclaron en partes iguales para su posterior análisis por espectrometría de masas. Mediante esta técnica identificamos alrededor de 5000 proteínas secretadas en las tres réplicas biológicas, de las cuales 314 se encontraron moduladas significativamente ($p < 0,05$) en al menos una de las réplicas (Figura 30). Para descartar las proteínas que podían venir de células muertas, realizamos una comparación de las 314 proteínas identificadas con bases de datos disponibles. En primer lugar, hicimos un filtro por bases de datos online de proteínas secretadas por vías clásicas y no clásicas. Las proteínas restantes las comparamos con resultados publicados de experimentos de proteómica cuantitativa de exosomas de células 4T1 o exosomas provenientes células senescentes para ver si había proteínas que pudieran estar en exosomas.

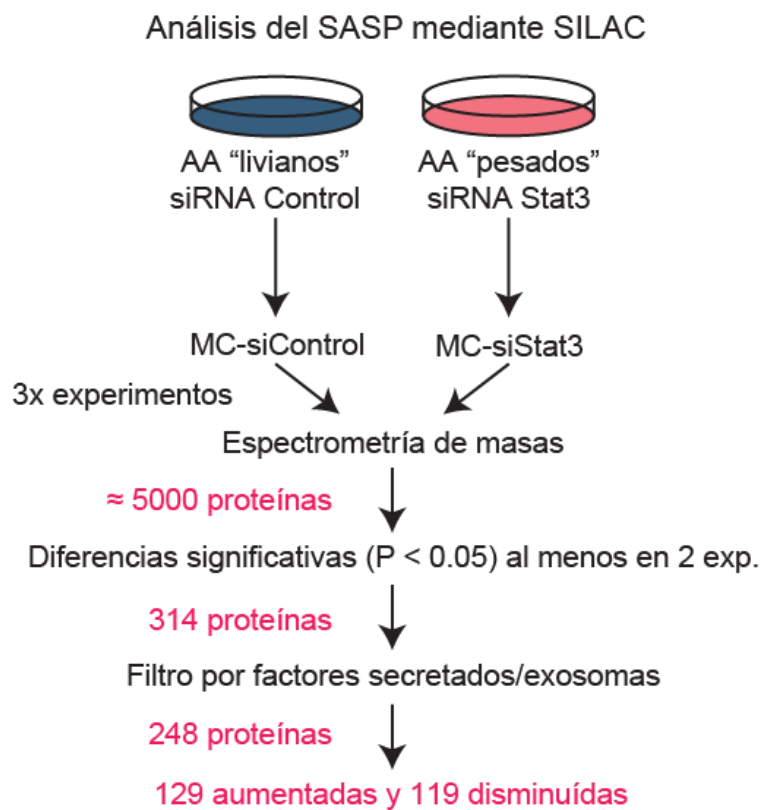


Figura 30. Determinación de proteínas presentes en el SASP inducido por silenciamiento de Stat3 mediante proteómica cuantitativa. Esquema de ensayo de proteómica cuantitativa mediante marcación por SILAC.

El análisis de rutas (*pathways*) de las 248 proteínas moduladas significativamente, reflejó que se encuentran involucradas en múltiples

procesos. En la Figura 31A puede observarse que dentro de las vías aumentadas se encuentra la vía de senescencia, el sistema inmune, el transporte mediado por vesículas, y también encontramos muchas proteínas vinculadas a los lisosomas y la organización de la matriz extracelular. En cuanto a las vías que se encuentran disminuidas, detectamos la vía de degradación de ARNm mediada por secuencias sin sentido que involucra múltiples proteínas ribosomales. Por otra parte observamos una disminución en la vía que vincula proteínas asociadas al ciclo celular, como era de esperarse, y una disminución en la vía de TNF- α y NF- κ B, ambos vinculados con la producción del SASP asociado a otros tipos de senescencia (Figura 31B)

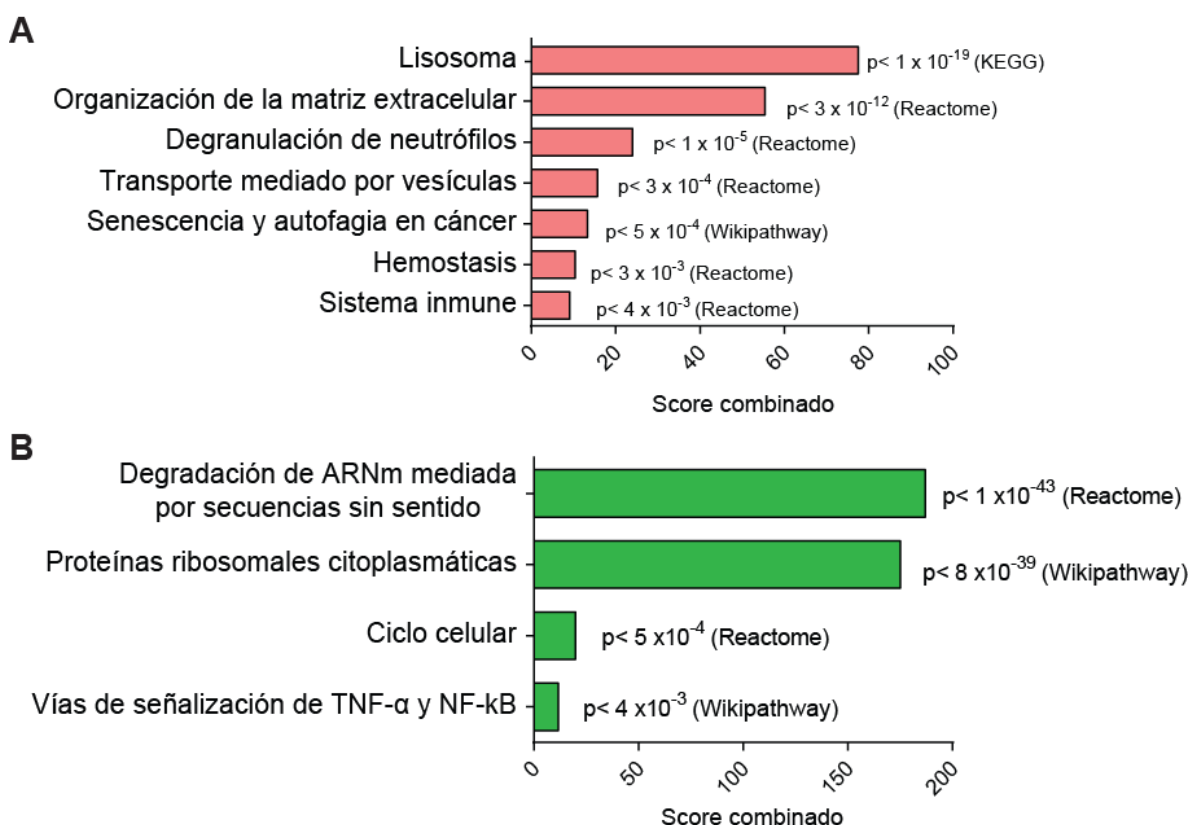


Figura 31. Análisis de rutas en base a los resultados de la proteómica cuantitativa. Las rutas enriquecidas (A) o disminuidas (B) tras el silenciamiento de Stat3 en células 4T1 e identificadas por proteómica cuantitativa, se enumeran con su valor p y fuente correspondientes.

En la sección Anexo, se encuentra la tabla con las proteínas moduladas (Anexo 1). Observando en detalle las proteínas moduladas en el MC-siStat3, encontramos la regulación positiva de la secreción de proteínas involucradas

en la senescencia, como la enzima β -galactosidasa y la regulación negativa de las proteínas reguladas por Stat3 como RACGAP1 (proteína activadora de rac GTPasa 1) y CXCL5 (quimioquina que recluta neutrófilos y promueve la angiogénesis). Curiosamente, entre las proteínas aumentadas en el MC-siStat3, observamos proteínas estimuladas por IFN tipo I. Estos son IFI35 (del inglés *interferon inducible protein 35*) e ISG15 (del inglés *interferon stimulated gene 15*) cuyo aumento de los niveles de expresión al silenciar Stat3 fue validado por WB en células 4T1 y B16 (Figura 32).

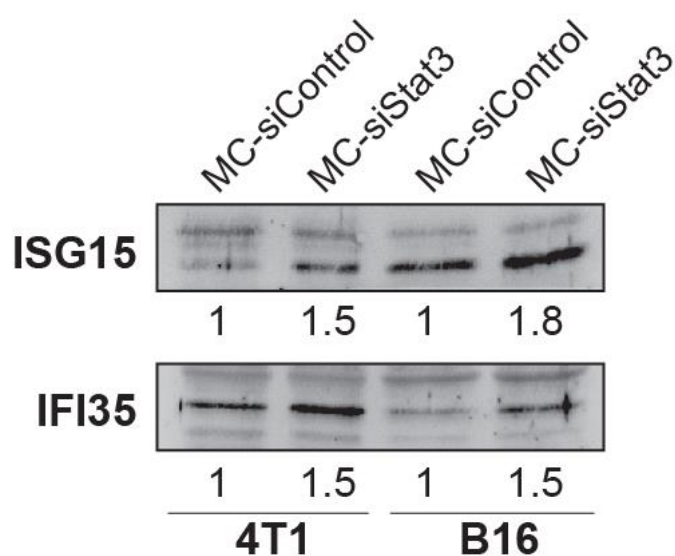


Figura 32. Determinación de expresión de ISG15 e IFI35 en el SASP inducido por silenciamiento de Stat3. Se determinó la expresión de ISG15 e IFI35 en el MC-siControl y MC-siStat3 de células 4T1 y B16 mediante WB. Los niveles de expresión fueron relativizados a la tinción de proteínas totales mediante Ponceau S. MC: medio condicionado.

Para interpretar los resultados de las proteínas moduladas por silenciamiento de Stat3, realizamos una comparación de los datos obtenidos en el experimento de proteómica cuantitativa con bases de datos disponibles del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA por sus siglas en inglés *The Cancer Genome Atlas*). Los resultados de la proteómica están expresados como la relación entre los niveles del MC-siStat3 en comparación con el MC-siControl de células 4T1. Las células 4T1 corresponden al subtipo de cáncer de mama triple negativo y quisimos ver si el silenciamiento de Stat3 modificaba su fenotipo. Para ello eso comparamos los cambios obtenidos en la relación MC-siStat3/MC-siControl de las 248 proteínas moduladas en la proteómica con las

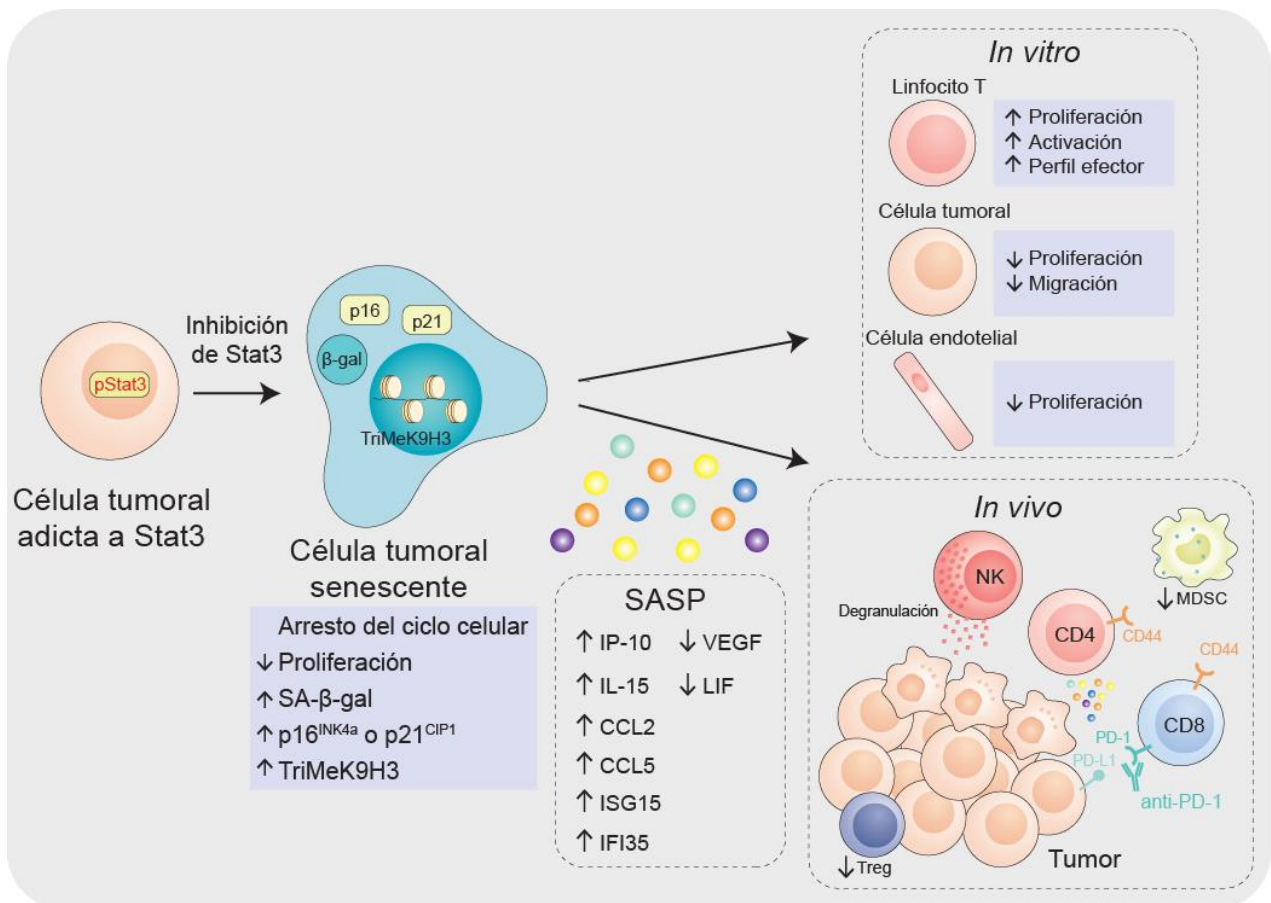
cambios de dichas proteínas o sus transcritos expresadas como relación entre los distintos subtipos de cáncer de mama) vs el subtipo basal (Luminal A/basal, Luminal B/basal, HER2 enriquecido/basal), de acuerdo con los datos del TCGA. Teniendo en cuenta que el 60% de los cánceres de mama triple negativo son basales, se eligió este subtipo como divisor en la relación. De esta forma pudimos comprobar que entre las proteínas que se encuentran aumentadas en el MC-siStat3 con respecto al MC-siControl, varias de ellas también se encuentran aumentadas en la relación Luminal A/Basal (Tabla 3). Del mismo modo, entre las proteínas del MC-siStat3 que se encuentran disminuidas en comparación al MC-siControl, también coinciden con las que se encuentran diferencialmente disminuidas entre los subtipos Luminal A y Basal. Ese paralelismo entre MC-siStat3 (en comparación con MC-siControl) y Luminal A (en comparación con Basal) se observó tanto a nivel transcriptómico (RNA-seq y Microarray) como a nivel proteómico (iTRAQ). Estos resultados nos permitieron hacer una tabla de contingencia, donde podemos observar que el p-valor es significativo en la comparación MC-siStat3/MC-siControl vs. Luminal A/Basal por las tres técnicas empleadas (Tabla 3). Estos resultados nos indican que la regulación de proteínas observada tras el silenciamiento de Stat3, concuerda con un cambio hacia un fenotipo más benigno, como es el subtipo luminal A (Maxmen, 2012).

Proteínas moduladas en MC-siStat3 / MC-siControl	Luminal A		Luminal B		HER2 positivo		Subtipo			
	Aumentadas	Disminuidas	Aumentadas	Disminuidas	Aumentadas	Disminuidas	Expresión en subtipo X / subtipo basal			
Aumentadas	23	26	p-valor	13	28	p-valor	4	7	p-valor	RNA-seq
Disminuidas	8	31	0,019	7	15	1	3	7	1	
Aumentadas	59	48	p-valor	48	52	p-valor	46	35	p-valor	Microarray
Disminuidas	39	64	0,018	33	44	0,597	30	45	0,053	
Aumentadas	10	7	p-valor	6	7	p-valor	2	1	p-valor	iTRAQ
Disminuidas	2	18	0,005	4	10	0,585	1	1	1	
										Método de determinación

Tabla 3. Comparación de la composición del MC-siStat3 mediante proteómica cuantitativa con datos de TCGA. Tabla de contingencia del número de proteínas reguladas por incremento y por disminución en MC-siStat3 de células 4T1 (en comparación con MC-siControl) y los diferentes subtipos intrínsecos de cáncer de mama luminal A, luminal B y HER2 positivo (en comparación con el subtipo de tipo basal) según los datos del TCGA de RNAseq, microarray y iTRAQ. Los valores de p se calcularon con una prueba de χ^2 o Fisher (según el número de eventos) para tablas de contingencia.

En esta cuarta parte de resultados observamos que:

- La senescencia celular inducida por inhibición de la adicción a Stat3 lleva a la producción de un SASP que tiene:
 - Mayores niveles de CXCL10, CCL2, CCL5 e IL-15 con respecto al control, que podrían explicar la activación de linfocitos T y células NK.
 - Menores niveles de VEGF y LIF con respecto al control, que podrían explicar la disminución en la actividad angiogénica.
 - Proteínas moduladas por la vía del IFN tipo I como ISG15 e IFI35.
- Además, el SASP inducido por silenciamiento de Stat3, tiene una composición muy diferente a otros tipos de senescencia.
- El silenciamiento de Stat3 en células 4T1, de cáncer de mama triple negativo, modifica su perfil de expresión de proteínas, asemejándose a un subtipo de cáncer de mama más benigno como es el luminal A.



DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Stat3 ha sido reconocido como un oncogén con actividad protumorigénica dual. De forma intrínseca, promueve la proliferación y supervivencia de las células tumorales y en un modo extrínseco, actúa como supresor de la respuesta inmune antitumoral. En esta Tesis aprovechamos el efecto paracrino del bloqueo de Stat3 para el desarrollo de una inmunoterapia. Observamos que el silenciamiento de Stat3 en células y tumores sólidos adictos a dicho oncogén induce un programa de senescencia celular *in vitro* e *in vivo*. Dichas células senescentes inducidas por silenciamiento de Stat3, secretan un SASP (SASP-siStat3) que tiene efecto antitumoral actuando a distintos niveles. Uno de los efectos se manifiesta a través de la inhibición de la proliferación, la migración y la actividad angiogénica de las células tumorales. El otro nivel de acción del SASP inducido por inhibición de Stat3 impacta sobre la activación y diferenciación de linfocitos T. Además, demostramos que dicho SASP se comportó como un adyuvante de una vacuna basada en la administración de células tumorales irradiadas que fue efectiva contra cáncer de mama y melanoma. También estudiamos la capacidad antitumoral del SASP-siStat3 en un modelo de melanoma murino resistente a la terapia con el anticuerpo bloqueante del punto de control inmunitario, anti-PD-1. Demostramos que la combinación de la inmunoterapia basada en el SASP-siStat3 y el anticuerpo anti-PD-1 tiene un efecto antitumoral sinérgico. Comprobamos que la inmunoterapia basada en el SASP-siStat3 activa los linfocitos T CD4⁺ y las células NK, mientras que el tratamiento con anti-PD-1 involucra a los linfocitos T CD8⁺ en la respuesta antitumoral. Finalmente, caracterizamos la composición del SASP inducido por silenciamiento de Stat3 y observamos un aumento en citoquinas, quimioquinas y proteínas vinculadas al reclutamiento y activación de linfocitos T y células NK, como CXCL10, IL-15, CCL2 y CCL5, que podrían explicar la capacidad del SASP de inducir inmunovigilancia.

Senescencia por inhibición de Stat3

En este trabajo demostramos que, dependiendo de sus niveles de activación de Stat3, la inhibición de dicho oncogén, puede desencadenar un

programa de senescencia denominado senescencia inducida por inactivación de oncogenes, en distintos tipos de tumores murinos y humanos. Son muy pocos los reportes que evalúan si la inhibición de Stat3 induce senescencia. El trabajo previo de nuestro laboratorio, es la única demostración de que la inhibición de Stat3 induce senescencia celular en cáncer, en la cual utilizamos modelos de cáncer de mama murino (Tkach et al., 2012). Otras evidencias relacionadas muestran que el tratamiento con curcumina induce senescencia con un aumento de p16^{INK4a} e inactivación de la vía de JAK2/Stat3 en fibroblastos asociados a tumor (Hendrayani et al., 2013). Asimismo, hay un estudio donde comprueban en las líneas celulares HCC1179 (cáncer de colon humano) y A549 (cáncer de pulmón humano), que el tratamiento con un agente que produce daño en el ADN, como etopósido o doxorubicina, activa la vía de IL-6/Stat3 mediada por gp-130 (Yun et al., 2012). Luego, al inhibir Stat3, IL-6 o gp-130 comprueban que dicha células senescen. En este trabajo, concluyen que la vía de IL-6/Stat3 tiene una función antisenescencia y protumoral (Yun et al., 2012).

En esta Tesis demostramos, por primera vez, que la inhibición de Stat3 *in vivo* con un inhibidor farmacológico induce senescencia en tumores murinos de cáncer de mama triple negativo y melanoma. Los resultados obtenidos 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 (Wu et al., 2007). Además, en dicho trabajo, se comprobó que tumores deficientes en p53 o p16^{INK4a} no presentan regresión completa del tumor tras la inactivación de MYC. De manera similar, la restauración de la expresión de la proteína p53 en las células tumorales ahora les permitió experimentar senescencia y regresión tumoral (Wu et al., 2007). Resultados preliminares de nuestro laboratorio (no mostrados) sugieren que la regresión del tumor 4T1 por inhibición de Stat3 dependería, en parte, del mecanismo de senescencia, ya que al silenciar la expresión de p16^{INK4a} en tumores tratados con JSI-124 se pierde parcialmente el efecto de inhibición del crecimiento tumoral. Estos estudios sugieren que la senescencia celular puede ser un mecanismo general importante, aunque no el único, mediante el cual las terapias dirigidas inducen la regresión tumoral.

En el trabajo previo de nuestro laboratorio demostramos que la inhibición de Stat3 además vuelve estas células inmunogénicas y activa una respuesta dependiente de linfocitos T CD4⁺ y células NK *in vivo* (Tkach et al., 2012). En esta Tesis, observamos que la respuesta mediada por linfocitos T CD4⁺ y células NK podría deberse a la activación de un mecanismo de senescencia. En el trabajo de Sui y colaboradores, demuestran que la inhibición de Stat3 en células de carcinoma hepatocelular, induce una respuesta antitumoral de células NK *in vitro* e *in vivo* (Sui et al., 2014). Además, observan que las células de carcinoma hepatocelular que tienen silenciado Stat3 producen menos citoquinas inmunosupresoras como TFG-β e IL-10 y más citoquinas que activan a las células NK como los IFN tipo I (Sui et al., 2014). A pesar de que en el mencionado trabajo no estudian si la inhibición de Stat3 induce senescencia, las células de carcinoma hepatocelular con las que trabajan poseen activación constitutiva de dicho oncogén, por lo que el mecanismo de senescencia por inhibición de Stat3 podría explicar el efecto observado.

Componentes del SASP

En esta Tesis demostramos que el SASP inducido silenciamiento de Stat3 produce una respuesta inmune antitumoral *in vitro* e *in vivo*. Dentro de los posibles factores responsables de este efecto, identificamos a CXCL10, CCL2, CCL5 e IL-15. CXCL10 es reconocida por el receptor CXCR3 que se expresa predominantemente en linfocitos T activados (Sallusto et al., 1998), células NK, células dendríticas, macrófagos y linfocitos B (Loetscher et al., 1998; Qin et al., 1998). Por otro lado, IL-15 induce la proliferación y supervivencia de las células T, promueve la proliferación y diferenciación de las células NK e induce la generación de linfocitos T citotóxicos (Berard et al., 2003; Bernardini et al., 2014; Grabstein et al., 1994). Por estos atributos, IL-15 fue clasificada en primer lugar por tener el mayor potencial de uso para inmunoterapia por el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos en 2008 (Cheever, 2008). Asimismo se ha identificado a IL-15 como una de las citoquinas vinculadas a la inmunovigilancia de células hepáticas senescentes (Xue et al., 2007). Por otra parte, la quimioquina CCL2 recluta monocitos, células dendríticas, linfocitos T y células NK al sitio de la inflamación (Carr et al., 1994; Grégoire et al., 2007; Xu

et al., 1996). También se ha observado que CCL2 tiene un rol muy importante en la inmunovigilancia de las células senescentes. Utilizando el modelo de carcinoma hepático donde la expresión de p53 *in vivo* induce senescencia, Iannello y colaboradores demostraron que la eliminación de los tumores senescentes por parte de las células NK, depende de la producción de CCL2 (Iannello et al., 2013). Otra quimioquina que observamos aumentada en el SASP inducido por silenciamiento de Stat3 fue CCL5. CCL5 actúa como un quimioattractante para muchos tipos de células como monocitos, células NK, linfocitos T de memoria, eosinófilos y células dendríticas (Dieu et al., 1998; Loetscher et al., 1996; Rot et al., 1992; Schall et al., 1990). En un trabajo reciente demuestran que la expresión intratumoral de CCL5 correlaciona con mayor infiltrado de células dendríticas y células NK y con mejor supervivencia de pacientes con melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón y cáncer de cabeza y cuello. Además, demuestran que CCL5 colabora en el reclutamiento de las células dendríticas convencionales tipo I que participan en el rechazo de los tumores y el éxito de la inmunoterapia (Böttcher et al., 2018). Por todo lo expuesto, los factores que encontramos modulados en el SASP, como CXCL10, IL-15, CCL2 y CCL5 podrían participar en la activación y reclutamiento de linfocitos T CD4⁺ y células NK mediados por la senescencia inducida por inhibición de Stat3. En el caso de la senescencia inducida por inactivación de otros oncogenes, la composición del SASP ha sido poco explorada. Los estudios disponibles muestran que la senescencia inducida por inactivación de Myc produce la regulación positiva de los factores antitumorales IFN γ , TNF α , eotaxina, IL-5 y CCL5 y la regulación negativa de los factores protumorales IL-6 y VEGF, en el linfoma linfoblástico agudo de células T establecido en animales inmunocompetentes (Rakhra et al., 2010). En particular, esta modulación de citoquinas y quimioquinas en células de linfoma *in vivo* dependía de la presencia de linfocitos T CD4⁺ y la eliminación del tumor era dependiente de la actividad de células NK (Rakhra et al., 2010). De acuerdo con este trabajo, hemos demostrado previamente que la inmunización con células tumorales que tienen Stat3 bloqueado desencadena una respuesta inmune dependiente de linfocitos T CD4⁺ y células NK (Tkach et al., 2012). A diferencia del trabajo de Rakhra y colaboradores, donde la producción de las citoquinas depende de la presencia de linfocitos T CD4⁺, en esta Tesis

demostramos que los factores presentes en el SASP inducido por silenciamiento de Stat3 en células tumorales es suficiente para activar linfocitos T CD4⁺ y células NK. En un trabajo muy reciente, se ha demostrado que los inhibidores de MAPK y de las quinasas CDK4/6, actúan en combinación para suprimir la proliferación de células de cáncer de pulmón al mismo tiempo inhiben el crecimiento tumoral de forma dependiente de células NK (Ruscetti et al., 2018). La combinación de ambos inhibidores induce senescencia y la producción de un SASP cuyos componentes TNF α y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) son necesarios para la inmunovigilancia mediada por las células NK (Ruscetti et al., 2018). A pesar de que las citoquinas y quimioquinas responsables del efecto observado son diferentes, tanto nuestro trabajo como los antes mencionados, tienen como punto común la activación o dependencia de las células NK para el efecto antitumoral *in vivo*.

Se ha demostrado que la respuesta de linfocitos T dirigida a los tumores de forma espontánea o la inducida por quimioterapia, depende del IFN tipo I, que es esencial para reclutar y activar células dendríticas para que presenten antígenos tumorales a los linfocitos T CD8⁺ (Diamond et al., 2011; Fuertes et al., 2011; Yang et al., 2015; Zitvogel et al., 2015). En esta Tesis observamos que el silenciamiento de Stat3 induce la secreción de quimioquinas y proteínas relacionadas a la vía del IFN tipo I, como CXCL10, ISG15 e IFI35. Dentro de los mecanismos por los cuales la inhibición de Stat3 puede modular la expresión de los IFN tipo I, se encuentra el balance entre la vía de Stat3/Stat1 (Ho & Ivashkiv, 2006). Asimismo se ha reportado que Stat3 regula de forma negativa la expresión de los IFN tipo I mediante la inhibición de la respuesta antiviral (Wang et al., 2011) o directamente por represión transcripcional (Lu et al., 2018). Interesantemente, durante el año 2017 se demostró que la senescencia provoca el escape de fragmentos de cromatina del núcleo, debido a la degradación de la lamina B1, lo cual activa una respuesta inmune innata de sensado de ADN en el citosol mediada por la sintetasa de GMP-AMP cíclico (cGAS) y el estimulador de genes de IFN (STING) (Dou et al., 2017; Glück et al., 2017; Yang et al., 2017). STING por su parte, puede activar dos vías principales: la producción de IFN de tipo I vía el factor regulador 3 del IFN (IRF3), y la de citoquinas inflamatorias mediadas por NF-kB (Chen et al., 2016). En la senescencia replicativa, inducida por quimioterapia o por activación de

oncogenes, se obtiene un perfil de SASP que es netamente inflamatorio, mientras que la producción de IFN de tipo I esta suprimida (Dou et al., 2017; Glück et al., 2017). En cambio, se ha reportado que el estrés oxidativo promueve un SASP rico en genes estimulados por IFN de tipo I, como CXCL10 pero también con presencia citoquinas inflamatorias como IL-6 (Glück et al., 2017). En todos los trabajos mencionados se demuestra que es esencial la vía de cGAS/STING para la producción del SASP. Además, se ha demostrado que la activación de la vía de cGAS/STING es necesaria para el efecto antitumoral de los anticuerpos contra puntos de control inmunitario (Yang et al., 2017). Por otra parte, un trabajo reciente ha demostrado que la activación de la vía de cGAS en las células tumorales es necesaria para la respuesta antitumoral *in vivo* mediada por las células NK (Marcus et al., 2018). A partir de nuestros resultados y los trabajos mencionados, podemos inferir que el silenciamiento de Stat3 podría modular la producción de IFN tipo I mediante distintos mecanismos: i) Bloqueo de la regulación negativa de la transcripción de IFN tipo I, ii) balance positivo hacia la vía de Stat1 y iii) activación de la vía de cGAS-STING.

Efecto del SASP en fisiopatología

Como se mencionó a lo largo de esta Tesis, las células senescentes producen un SASP que, dependiendo del inductor de senescencia, puede tener efectos opuestos. Por un lado, el SASP puede estimular una respuesta antitumoral inmune innata y adaptativa (inmunovigilancia) y por el otro puede promover la tumorigénesis. En nuestro caso, observamos que el SASP inducido por silenciamiento de Stat3 tiene un efecto inmunoestimulador y antitumoral *in vitro* e *in vivo*. A diferencia de lo observado por nosotros, numerosos trabajos del laboratorio de la Dra. Campisi describen que el SASP de líneas celulares de fibroblastos humanos sometidos a radiación, estrés oxidativo, expresión de RAS o pérdida de p53, tienen la propiedad de inducir la transición epitelio-mesenquimal y estimular la capacidad invasiva de células tumorales (Coppé et al., 2008). Además, la senescencia inducida por tratamiento con quimioterapia, puede promover la eliminación del tumor, pero las células senescentes pueden causar inflamación crónica, resistencia a las terapias y recaída de la enfermedad (Ewald et al, 2010; Yang et al., 2017). Un

hallazgo reciente muy interesante sobre la actividad de las células senescentes, es el hecho de que contribuyen a los efectos secundarios de la quimioterapia, como la inhibición de la médula ósea, la disfunción cardíaca, la recurrencia del cáncer y el estado físico general (Demaria et al., 2017). Usando un ratón transgénico que permite eliminar células senescentes, demostraron que estas células contribuyen a la inflamación local y sistémica por el tratamiento con quimioterapia (Demaria et al., 2017). Estos hallazgos sugieren que la senescencia puede ser un blanco para reducir la toxicidad de los tratamientos contra el cáncer. Como se mencionó anteriormente, las células senescentes pueden ser reconocidas y eliminadas por el sistema inmune. En este contexto, se ha observado que la expresión de NrasG12V en hígado de ratón, promueve senescencia inducida por activación de oncogenes, y la eliminación por el sistema inmune de las células pre-cancerígenas. Sin embargo, los hepatocitos senescentes remanentes, promueven la formación de carcinoma hepatocelular y el reclutamiento de células mieloides al tumor (Eggert et al., 2016). Por todo lo expuesto, a pesar de que las células senescentes no proliferan y pueden ser reconocidas por el sistema inmune, producen múltiples efectos adversos, principalmente debido a la actividad del SASP. A diferencia de estos trabajos, observamos que el SASP inducido por silenciamiento de Stat3, no favorece la proliferación ni la migración de las células tumorales y estimula la respuesta inmune contra el tumor.

Activación de Stat3 en senescencia

Es importante destacar que muchos inductores de senescencia tienen como punto común la activación de Stat3, ya sea de forma intrínseca o autocrina por la presencia de citoquinas como IL-6 en el SASP, tanto en cáncer como en otras patologías. Se ha observado que el tratamiento con quimioterapia induce senescencia en células de mesotelioma y el SASP producido por estas células favorece la transición epitelio mesenquimal, resistencia a quimioterapia y la activación de Stat3. Entre los factores aumentados en el SASP se encontraron: IL6, IL8 y VEGF (Canino et al., 2012). En el trabajo de Ohanna y colaboradores, demuestran que la depleción del factor de transcripción asociado a microftalmia o el tratamiento con quimioterapia inducen senescencia en melanoma (Ohanna et al., 2013). El

secretoma de estas células, induce la transición epitelio mesenquimal y activación de Stat3 células de melanoma no tratadas. El silenciamiento de Stat3 revierte el efecto negativo del SASP (Ohanna et al., 2013). En el caso de la senescencia inducida por radiación, se observó la producción de un SASP que promueve la migración, invasión y angiogénesis de las células vecinas a través de las vías de señalización de Stat3 (Huang et al., 2014; Philipp et al., 2017; Yu et al., 2013). Con respecto a la senescencia inducida por activación de oncogenes, se ha observado que la sobreexpresión de ErbB2 en cáncer de mama induce senescencia. El SASP derivado de estas células, presenta altos niveles de IL-6 y activación de la vía de Stat3 (Zacarias-Fluck et al., 2015). En un trabajo realizado en células madre mesenquimales observan que la senescencia inducida por agotamiento replicativo o estrés oxidativo induce un SASP que estimula la proliferación y migración de líneas celulares de cáncer de mama, al menos en parte, a través de la vía de IL-6/Stat3 (Di et al., 2014). Por otra parte, se ha vinculado a la senescencia y el SASP en el desarrollo de fibrosis en condiciones patológicas como la fibrosis tubulointersticial (Leung et al., 2017) o la fibrosis pulmonar idiopática (Waters et al., 2019). En ambos casos, se observó activación de Stat3 y producción de IL-6 en el SASP.

La inflamación crónica se encuentra relacionada con frecuencia con el envejecimiento y enfermedades relacionadas con la edad. En el trabajo de (Xu et al., 2015), demuestran que los preadipocitos senescentes se acumulan en el tejido adiposo con el envejecimiento y desarrollan un SASP que induce la migración de macrófagos *in vitro* e inflamación en tejido adiposo sano. La administración de inhibidores de JAK a ratones de edad avanzada redujo la inflamación y mejoró el estado físico general, debido a una reducción en los componentes proinflamatorios del SASP como IL-6 (Xu et al., 2015). Estos hallazgos son consistentes con una posible contribución de las células senescentes y el SASP a la inflamación y la fragilidad relacionada con la edad. En el trabajo de Price y colaboradores, aunque no hablan del término senescencia, demuestran que, durante el envejecimiento, disminuye la capacidad regenerativa del músculo esquelético debido a una activación de Stat3 en las células satélite. La inhibición farmacológica de la actividad de Jak2 y Stat3 dio lugar a un aumento notable de la reparación muscular y la generación de fuerza (Price et al., 2014). En conjunto, estos resultados

sugieren que la vía de Stat3 y las células senescentes serían una vía terapéutica prometedora para el tratamiento de las enfermedades degenerativas asociadas a la edad.

Por todo lo expuesto, uno de los factores principales de la actividad protumoral e inmunosupresora del SASP, sería la vía de IL-6/Stat3, al menos en senescencia inducida por quimio o radioterapia, activación de oncogenes, estrés o envejecimiento. Precisamente, en esta Tesis estamos silenciando a Stat3, que es uno de los factores de transcripción principales responsables de la expresión de IL-6 (Heinrich et al., 2003). En línea con estas evidencias en esta Tesis, no observamos un aumento de esta citoquina en el SASP inducido por inhibición de Stat3 utilizando análisis por arreglo de anticuerpos y su posterior validación por ELISA. Es decir que una de las principales diferencias en la actividad del SASP inducido por silenciamiento de Stat3 y los otros tipos de senescencia, podría ser que, en este contexto, no se favorece la secreción de la citoquina IL-6 y su posterior regulación por Stat3 de forma autocrina y paracrina.

Drogas senolíticas y reprogramación del SASP

Debido a los efectos negativos discutidos que pueden tener las células senescentes y su SASP en distintas patologías, se ha desarrollado una herramienta prometedora para eliminar a las células senescentes, denominada drogas senolíticas (Childs et al., 2017). Hay distintas estrategias para eliminar las células senescentes como la inducción de la apoptosis en estas células mediante inhibidores de moléculas antiapoptóticas, como navitoclax (ABT263) o la quercetina, o el tratamiento con inhibidores de receptores tirosina quinasa como ruxolitinib y dasatinib. Estos tratamientos farmacológicos reducen el número de células senescentes *in vivo* y muestran actividad terapéutica contra enfermedades asociadas a la senescencia y el envejecimiento (Baar et al., 2017; Chang et al., 2016; Roos et al., 2016; Schafer et al., 2017; Yosef et al., 2016; Zhu et al., 2015). Los efectos adversos por el tratamiento con las drogas senolíticas, se deben a que las células senescentes son muy importantes en numerosos procesos biológicos, como la prevención de la fibrosis (Muñoz-Espín & Serrano, 2014) participan en la reparación de heridas (Demaria et al., 2014) y en la secreción de insulina (Helman et al., 2016). En nuestro caso, en

vez de eliminar las células senescentes, proponemos aprovechar su capacidad de generar inmunovigilancia, pero bloqueando sus efectos protumorales mediante la inhibición de Stat3. Esta estrategia se denomina “reprogramación” del SASP. Varios grupos han demostrado que las terapias que reprograman el SASP pueden mejorar el papel antitumoral de la senescencia en el cáncer y restringir los efectos negativos del SASP. En primer lugar, en el grupo del Dr. Alimonti, demostraron que la senescencia inducida por deficiencia de Pten en tumores de próstata, activa Stat3 (Kalathur et al., 2015). En un trabajo posterior de este laboratorio, demostraron que el SASP inducido por deficiencia de Pten en tumores de próstata, tiene actividad protumoral y genera resistencia a la quimioterapia (Toso et al., 2014). En estos tumores observaron nuevamente una activación de la vía de Jak2/Stat3. Lo más interesante, es que, inhibiendo a Jak2, pudieron reprogramar la actividad del SASP hacia una que tiene efectos antitumorales y además aumenta la eficacia de la quimioterapia con docetaxel. Por otro lado, demuestran que la reprogramación del SASP por inhibición de Jak2/Stat3 disminuye el infiltrado de células mieloides supresoras y aumenta el infiltrado de linfocitos T CD8⁺ y células NK. Comprueban que Stat3 no es esencial para el mecanismo de senescencia y la síntesis del SASP, sino que actuaría como un promotor de los componentes deletéreos del SASP (Toso et al., 2014). Este es el primer reporte de que el tratamiento con un inhibidor de Jak2 podría aumentar la eficacia de la quimioterapia, debido a la reprogramación del SASP. Otros compuestos que han sido efectivos para reprogramar los efectos negativos del SASP son la metformina (Moiseeva et al., 2013), la rapamicina (Laberge et al., 2015) y los glucocorticoides (Laberge et al., 2012). En conjunto, estos estudios resaltan la importancia de las estrategias dirigidas a la reprogramación del SASP como posibles terapias contra el cáncer. Por lo tanto, la identificación de compuestos que pueden atenuar el "lado oscuro" del SASP sin afectar su función supresora de tumores, podrían utilizarse en la clínica para mejorar la eficacia terapéutica de los compuestos que inducen senescencia, y en algunos casos la activación de Stat3. Un ejemplo claro del beneficio de la inhibición de Stat3 para optimizar el tratamiento con quimioterapia es el trabajo de Yang et al. Usando células MCA205, que no poseen activación constitutiva de Stat3, demostraron que el bloqueo de la actividad de Stat3 no tuvo impacto en el crecimiento tumoral

(Yang et al., 2015). En este trabajo, muestran nuevamente que el tratamiento con antraciclinas induce la activación de Stat3. Es por eso que cuando los animales que tenían tumores MCA205 se trataron con antraciclinas y un inhibidor de Stat3, surgió un efecto antitumoral dependiente de linfocitos T. Curiosamente, el tratamiento de células MCA205 Stat3^{-/-} con antraciclina muestra un aumento en la expresión de genes vinculados a la respuesta de interferón tipo 1, así como a los ligandos de CXCR3 (Yang et al., 2015). En este trabajo, no se refieren a la inducción de senescencia en las células tumorales, pero demuestra que la inhibición de Stat3 puede reprogramar los efectos negativos del tratamiento con doxorubicina para generar una respuesta inmune antitumoral dependiente de la vía de IFN tipo I. Teniendo en cuenta esta evidencia y nuestros resultados, podemos sugerir que la inhibición de Stat3 puede conducir a una respuesta inmune antitumoral con la inducción de genes mediados por IFN de tipo I, al menos en dos escenarios: i) en células tumorales que tienen Stat3 constitutivamente activado, ii) en células no adictas a Stat3, sometidas a un estímulo externo que debería conducir a la activación de Stat3 (por ejemplo, el tratamiento con antraciclinas).

Inhibidores de puntos de control inmunitario

Otro aspecto abordado en esta Tesis, fue la combinación de tratamientos para mejorar la respuesta a inhibidores de punto de control inmunitario. El uso de dichos inhibidores ha revolucionado el tratamiento del cáncer a partir año 2011, con la aprobación del ipilimumab (anti-CTLA4) para el tratamiento del melanoma (Ledford, 2011). A pesar de que estos agentes han mejorado la supervivencia de los pacientes, el éxito terapéutico se ve limitado debido a múltiples fenómenos de resistencia primaria o adquirida (Jenkins et al., 2018; Sharma et al., 2017). El desafío principal radica en definir las características de los pacientes respondedores y no respondedores, especialmente debido a la heterogeneidad que se encuentra dentro de cada grupo. Hay grandes esfuerzos por encontrar marcadores de respuesta y resistencia a la terapia con inhibidores de puntos de control inmunitario. Hasta el momento, uno de los marcadores predictivos es la carga mutacional del tumor, ya que los tumores altamente mutados presentan niveles más elevados de neoantígenos capaces de estimular una respuesta inmune antitumoral

(Chan et al., 2015; Rizvi et al., 2015; Roszik et al., 2016; Van Allen et al., 2015). Otro de los marcadores predictivos incluye la densidad y distribución de los linfocitos T CD8⁺, la expresión de PD-L1 y la clonalidad de las células T (Taube et al., 2014; Tumei et al., 2014). En esta Tesis demostramos que el SASP inducido por silenciamiento de Stat3 presenta un efecto sinérgico con el anticuerpo anti-PD-1 contra un tumor de melanoma resistente a dicha terapia. Dado que el tumor B16 es poco inmunogénico, la efectividad del anticuerpo anti-PD-1 en combinación con la inmunoterapia basada en el SASP-siStat3, podría deberse a que se produce un aumento en el infiltrado de linfocitos T en el microambiente tumoral. Sumado a este hecho, como demostramos en los tumores C4HD, 4T1 y B16, la inmunoterapia basada en el SASP-siStat3 induce la activación de los linfocitos T CD4⁺ y las células NK. Ambos factores podrían cooperar para que el anticuerpo anti-PD-1 permita la activación de los linfocitos T CD8⁺. A este respecto, un trabajo reciente ha demostrado que las células NK activadas expresan PD-1. El tratamiento *in vivo* con anticuerpos anti-PD-1/PD-L1 activa la respuesta antitumoral de estas células que es indispensable para el efecto completo del bloqueo de PD-1/PD-L1 (Hsu et al., 2018). El trabajo de Hsu, et al, fomenta la teoría de que la activación de las células NK mediada por el SASP puede potenciar la actividad del anticuerpo anti-PD-1.

Stat3 como blanco en inmunoterapia

En esta Tesis diseñamos una inmunoterapia contra cáncer de mama y melanoma, basada en el efecto paracrino inmunoestimulador que se produce por inhibición de Stat3. Esta inmunoterapia demostró ser efectiva de forma profiláctica y terapéutica contra cáncer de mama y melanoma. 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 delección genética en células tumorales o en células del sistema inmune, por la administración de inhibidores farmacológicos o el uso de oligonucleótidos antisentido (Hong et al., 2015; 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 antitumoral 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 de Stat3. En relación a esto, se ha desarrollado otra estrategia basada en el bloqueo *in vivo* de Stat3 tanto en células tumorales como células del sistema inmune mediante el uso de siRNAs u oligonucleótidos antisentido 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 o en el tumor y esto produce una respuesta inmune antitumoral (Kortylewski et al., 2009; Moreira et al., 2018). A pesar de que estas terapias han tenido muy buenos resultados preclínicos, uno de los principales problemas de las terapias basadas en el bloqueo sistémico de Stat3 es la toxicidad. La inhibición de Stat3 durante períodos de tiempo prolongados, de más de un mes, puede producir una sobreactivación del sistema inmune, que conduce a fenómenos como la colitis autoinmune, según se informó previamente (Alonzi et al., 2004; Welte et al., 2003). En nuestro caso, se induce una respuesta contra células tumorales que no mostró ningún efecto adverso en otros órganos (datos no mostrados).

Luego de discutir los beneficios de la inhibición de Stat3 en combinación con distintas terapias, resulta llamativa la falta de publicaciones donde se combinen estrategias de inhibición de Stat3 con anticuerpos contra los puntos de control inmunitario. Con respecto a este tema, hay una patente iniciada en el año 2014 donde se evalúa la efectividad de un oligonucleótido antisentido contra Stat3 en combinación con distintos anticuerpos bloqueantes de puntos de control inmunitario (Woessner et al., 2014). Dicha patente ha llevado a numerosos ensayos clínicos que se encuentran en fase I y II, donde se combina el oligonucleótido antisentido AZD9150 con tremelimumab (anti-CTLA4) en linfoma B difuso de célula grande o con durvalumab (anti-PD-L1) en pacientes con tumores sólidos como cáncer de páncreas, colorrectal, de pulmón y de cuello y cabeza (Huynh et al., 2018). Dado que estos ensayos clínicos son muy recientes, aún no hay resultados publicados. Sin embargo, los resultados preclínicos de la patente demuestran que el tratamiento con AZD9150 aumenta el infiltrado tumoral de linfocitos T y disminuye el infiltrado de macrófagos en el tumor. La combinación del bloqueo de Stat3 con anticuerpos anti-PD-L1, anti-CTLA4 o un agonista de OX40 reduce drásticamente el crecimiento del modelo de cáncer de colon murino CT26 y del

linfoma B murino A20. No obstante, el tratamiento con AZD9150 solo fue efectivo contra el tumor 4T1 en combinación con anti-CTLA4, mientras que anti-PD-L1 y el agonista de OX40 no presentaron efecto sinérgico.

Por último, en este trabajo decidimos extender la caracterización del SASP inducido por inhibición de Stat3 más allá del estudio de citoquinas y quimioquinas, y para eso realizamos un experimento de proteómica cuantitativa. Como se describió en la sección de resultados, encontramos una modulación de 248 proteínas por silenciamiento de Stat3 en la línea 4T1 de cáncer de mama triple negativo, las cuales estaban involucradas en múltiples procesos. Mediante análisis bioinformático de comparación de expresión génica o proteica de bases de dato de cáncer de mama del TCGA con las proteínas moduladas por silenciamiento de Stat3, encontramos que el perfil de expresión se asemeja al subtipo de cáncer de mama luminal A. Este el subtipo de cáncer de mama es el que tiene mejor pronóstico en relación al cáncer de mama luminal B, HER2 positivo y el subtipo basal, que representa la mayoría de los cánceres de mama triple negativo (Maxmen, 2012). En un trabajo que respalda este resultado realizaron un análisis bioinformático de datos de *microarray* y de matriz de proteínas de cáncer de mama humano para identificar patrones de expresión asociados con Stat3 en los distintos subtipos de cáncer de mama. Los tumores de cáncer de mama basales mostraron un patrón de expresión génica asociada a Stat3, que no se observó en los subtipos luminal A y luminal B. (Tell & Horvath, 2014). De la misma forma, Sirkisoon y colaboradores demostraron que la activación de Stat3 se encuentra mayoritariamente en muestras de pacientes con cáncer de mama triple negativo y ErbB2 positivo en comparación con el subtipo luminal. Asimismo, utilizando bases de datos disponibles, revelaron que patrones de genes activados por Stat3 se encuentran enriquecidos en tumores de los subtipos de cáncer de mama triple negativo y ErbB2 positivo, pero no en los luminales. Mediante las dos técnicas utilizadas, observaron que la activación de Stat3 correlaciona con peor pronóstico (Sirkisoon et al., 2018). En conclusión, Stat3 podría ser un factor importante en la malignidad de los distintos tipos de tumores de cáncer de mama, ya que los subtipos más agresivos presentan Stat3 activado de forma constitutiva o un patrón de expresión génica asociado a Stat3, y su silenciamiento modifica este patrón hacia un subtipo más benigno.

Conclusiones

Conforme a los antecedentes discutidos y nuestros resultados, pudimos comprobar la hipótesis de que la estimulación del sistema inmune tras la inhibición de Stat3 podría deberse, al menos en los tumores adictos a dicho oncogén, al efecto paracrino derivado de la inducción de un programa de senescencia celular. En conclusión, nuestros resultados demuestran que el bloqueo de Stat3 en tumores que son adictos a este oncogén da como resultado la inducción de senescencia celular con la producción de un SASP que tiene: 1) actividades antitumorales e inmunoestimuladoras *in vitro* e *in vivo*, 2) un efecto antitumoral sinérgico en combinación con anticuerpos anti-PD-1 y 3) una composición compleja siendo factores de la vía de IFN tipo I, IL-15, CCL2 y CCL5 posibles mediadores responsables de la inmunovigilancia.

Perspectivas

En base a los antecedentes y los resultados obtenidos en esta Tesis, podemos suponer que se presentarían dos situaciones cuando un paciente oncológico es diagnosticado. Por un lado, podemos encontrar tumores que tienen activación constitutiva de Stat3, que podría determinarse por la fosforilación de Tyr705 mediante inmunohistoquímica. Por el otro, habrá tumores con niveles bajos de fosforilación de Stat3, pero que las terapias administradas como quimio o radio terapia o terapias dirigidas, eventualmente conducirán a la inducción de senescencia, activación de Stat3 y fenómenos de resistencia. Asimismo, la caracterización de las vías responsables de la producción de IFN tipo I por inhibición de Stat3, como los niveles de Stat1 y/o expresión de cGAS/STING, permitirían en un futuro identificar qué pacientes se beneficiarían por el tratamiento con un inhibidor de Stat3. Dado que la falta de éxito de los tratamientos dirigidos a Stat3 se debe a efectos adversos asociados al tiempo del tratamiento, proponemos que la terapia dirigida a Stat3 debe ser en tiempos cortos y precisos. En el caso de los tumores con activación constitutiva de Stat3, el bloqueo de Stat3 podría inducir senescencia con la producción de un SASP con actividad antitumoral, que puede ser combinado con las terapias convencionales o bloqueantes de puntos de control inmunitario. Por otro lado, los tumores con niveles basales bajos de activación

de Stat3, el bloqueo de Stat3 podría aplicarse antes o durante el tratamiento con las otras terapias. De esta forma se podrá, prevenir o revertir la activación de Stat3 generado por terapias convencionales e inducir la reprogramación del SASP evitando fenómenos de resistencia.

Anexo 1. Proteínas identificadas mediante proteómica cuantitativa del MC-siControl y MC-siStat3 de células 4T1.

Proteína	Gen y símbolos	Relación MC-siStat3/MC-siControl			Descripción
		Secretoma 1	Secretoma 2	Secretoma 3	
P52795	Efnb1,Epl2,Eplg2,Lerk2,Stra1	1000	2,75	2,55	Ephrin-B1
Q71RI9	Ccbl2,Kat3	1000	2,55	2,29	Kynurenine--oxoglutarate transaminase 3
Q7TSG2	Ctdp1,Fcp1	1000		5,29	RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase
O08746	Matn2	5,88	4,33	3,78	Matrilin-2
Q62009	Postn,Osf2	4,08	4,36	2,88	Periostin
Q9Z0E6	Gbp2	3,59	3,80	5,03	Guanylate-binding protein 1
Q9D6Y7	Msra	3,04	2,37	1,59	Mitochondrial peptide methionine sulfoxide reductase
Q8R422	Cd109	2,79	1,98	1,51	CD109 antigen
Q9CQ58	Prl8a9,Prllpc2	2,70			Prolactin-8A9
Q04857	Col6a1	2,66	6,76	3,00	Collagen alpha-1(VI) chain
Q9D8C4	Ifi35	2,65	1,59	1,95	Interferon-induced 35 kDa protein homolog
Q61955	Klk8,Nrpn,Prss19	2,51	1,97	2,14	Kallikrein-8
P21981	Tgm2	2,43	2,99	1,82	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2
Q9JIE6	Tslp	2,31	2,98	2,35	Thymic stromal lymphopietin
P33435	Mmp13	2,30	2,91	1,92	Collagenase 3
P24270	Cat,Cas-1,Cas1	2,29	2,70	1,71	Catalase
Q99KC8	Vwa5a,Loh11cr2a	2,25	2,38	2,03	von Willebrand factor A domain-containing protein 5A
P97333	Nrp1,Nrp	2,23	2,71	1,19	Neuropilin-1
Q6NZZB1	Prmt6,Hrmt116	2,21	0,90	1,57	Protein arginine N-methyltransferase 6
P10923	Spp1,Eta-1,Op,Spp-1	2,17	2,00	1,47	Osteopontin
Q9D7V9	Naaa,Asahl	2,15	3,72	3,30	N-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase
Q8R2E9	Ero11b	2,14	1,95	2,90	ERO1-like protein beta
Q02257	Jup	2,14	1,36	1,22	Junction plakoglobin
Q06890	Clu,Apoj,Msgp-2	2,13	2,99	2,37	Clusterin
Q922P8	Tmem132a,Kiaa1583	2,12	2,18	2,01	Transmembrane protein 132A
Q00519	Xdh	2,09	1,45	1,94	Xanthine dehydrogenase/oxidase
Q61362	Chi3l1,Brp39	2,06	2,20	1,77	Chitinase-3-like protein 1
O88851	Rbbp9,Bog	2,00	1,59	1,15	Putative hydrolase RBBP9
Q9Z0M5	Lipa,Lip1	2,00	2,06	1,47	Lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase
Q63870	Col7a1	2,00	3,14	2,02	Collagen alpha-1(VII) chain
P41245	Mmp9,C1g4b	2,00	2,44	2,09	Matrix metalloproteinase-9
P28862	Mmp3	1,99	2,36	2,13	Stromelysin-1

O54879	Hmgb3,Hmg2a,Hmg4	1,97	1,64	1,51	High mobility group protein B3
O35309	Nmi	1,96	1,76	1,71	N-myc-interactor
Q99KR8	Fuca2	1,95	2,40	1,94	Plasma alpha-L-fucosidase
Q8K310	Matr3	1,94	1,24	0,96	Matrin-3
O54782	Man2b2,Kiaa0935	1,92	1,87	1,43	Epididymis-specific alpha-mannosidase
Q64339	Isg15,G1p2,Ucrp	1,92	2,61	2,59	RecName: Full=Ubiquitin-like protein ISG15; AltName: Full=Interferon-induced 15 kDa protein
Q64277	Bst1,Bp-3,Bp3,Ly65	1,92	2,06	2,45	ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase 2
Q63918	Sdpr,Sdr	1,90	2,17	1,49	Serum deprivation-response protein
Q64437	Adh7,Adh-3,Adh3	1,88	1,47	1,46	Alcohol dehydrogenase class 4 mu/sigma chain
Q3TJD7	Pdlim7,Enigma	1,87	4,60	2,26	PDZ and LIM domain protein 7
P28063	Psmb8,Lmp7,Mc13	1,86	1,43	1,62	Proteasome subunit beta type-8
Q9WTP7	Ak3,Ak3l,Ak3l1,Akl3l	1,81	1,26	1,39	GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial
Q8BNJ2	Adamts4	1,78	1,68	3,00	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4
P29533	Vcam1,Vcam-1	1,78	1,61	1,39	Vascular cell adhesion protein 1
P70399	Tp53bp1,Trp53bp1	1,78	1,82	2,03	Tumor suppressor p53-binding protein 1
Q6PE55	Pdgfrl	1,78	2,41	1,70	Platelet-derived growth factor receptor-like protein
O88968	Tcn2	1,77	2,30	1,73	Transcobalamin-2
Q8CJH3	Plxnb1,Kiaa0407	1,77	1,79	1,45	Plexin-B1
P97864	Casp7,Lice2,Mch3	1,76	1,90		Caspase-7
Q8CG14	C1sa,C1s	1,76	2,49	1,52	Complement C1s-A subcomponent
Q9JI75	Nqo2,Nmor2	1,75	1,95	1,42	Ribosyldihydronicotinamide dehydrogenase [quinone]
Q91VM9	Ppa2	1,75	1,49	1,22	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial
P70124	Serpinb5,Pi5,Spi5,Spi7	1,75	1,58	1,50	Serpin B5
Q64151	Sema4c,S4c,Semacl1,Semai	1,74	1,51	1,61	Semaphorin-4C
P35762	Cd81,Tapa1	1,74	0,80	1,69	CD81 antigen
Q3TCN2	Plbd2	1,72	1,79	1,67	Putative phospholipase B-like 2
P27641	Xrcc5,G22p2	1,72	2,13	1,40	X-ray repair cross-complementing protein 5
O08738	Casp6	1,71	1,33	1,72	Caspase-6
O70274	Ptp4a2,Prl2	1,70		1,51	Protein tyrosine phosphatase type IVA 2
Q99LJ1	Fuca1,Fuca	1,70	2,19	1,91	Tissue alpha-L-fucosidase
Q07113	Igf2r	1,69	1,48	1,55	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor
Q9JLV6	Pnkp	1,69	1,48	1,34	Bifunctional polynucleotide phosphatase/kinase
O08999	Ltbp2	1,69	2,25	2,06	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2
Q8BND5	Qsox1,Qscn6,Sox	1,69	1,69	1,42	Sulfhydryl oxidase 1
Q9Z0X1	Aifm1,Aif,Pdcd8	1,69	1,36	1,70	Apoptosis-inducing factor 1,

					mitochondrial
Q9CXI3	Moxd1,Dbhr,Mox	1,68	1,98	1,47	DBH-like monooxygenase protein 1
P11276	Fn1	1,68	2,27	1,66	Fibronectin
O89023	Tpp1,Cln2	1,67	1,66	1,78	Tripeptidyl-peptidase 1
P51569	Gla,Ags	1,66	1,82	1,94	Alpha-galactosidase A
P05063	Aldoc,Aldo3,Scrg2	1,66	1,92	1,63	Fructose-bisphosphate aldolase C
Q8BP40	Acp6,Acp11,Lpap	1,66	2,07	1,44	Lysophosphatidic acid phosphatase type 6
Q9QXX0	Jag1	1,65	2,04	2,67	Protein jagged-1
Q61207	Psap,Sgp1	1,62	1,72	1,55	Prosaposin
Q8BX70	Vps13c,Kiaa3021	1,62	1,29	1,72	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C
O89112	Lancl1,Gpr69a	1,62	1,46	1,34	LanC-like protein 1
Q9D0L7	Armc10	1,60	2,72	1,47	Armadillo repeat-containing protein 10
P56391	Cox6b1,Cox6b	1,60	1,74	1,69	Cytochrome c oxidase subunit 6B1
P15535	B4galt1,Ggtb,Ggtb2	1,58	1,84	1,47	Beta-1,4-galactosyltransferase 1
Q8BKG3	Ptk7	1,58	1,68	1,55	Inactive tyrosine-protein kinase 7
P56677	St14,Prss14	1,58	1,27	1,11	Suppressor of tumorigenicity 14 protein homolog
Q8K301	Ddx52,Rok1	1,57	0,21	0,41	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52
P06869	Plau	1,56	2,17	1,51	Urokinase-type plasminogen activator
P59017	Bcl2l13,Mil1	1,56	1,41	1,39	Bcl-2-like protein 13
O35310	Hs3st1,3ost,3ost1	1,56	2,79	2,22	Heparan sulfate glucosamine 3-O-sulfotransferase 1
O09159	Man2b1,Laman,Man2b,Manb	1,55	1,92	1,68	Lysosomal alpha-mannosidase
Q91ZX7	Lrp1,A2mr	1,55	1,60	1,71	Pro-low-density lipoprotein receptor-related protein 1
Q8R0F8	Fahd1,MNCb-4134	1,54	1,50	1,84	Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial
P50396	Gdi1,Rabgdia	1,54	1,47	1,68	Rab GDP dissociation inhibitor alpha
Q62426	Cstb,Cst6,Stfb	1,54	1,35	1,67	Cystatin-B
P49935	Ctsh	1,52	2,17	1,65	Pro-cathepsin H
P23780	Glb1,Bgl,Glb-1	1,52	1,76	1,59	Beta-galactosidase
Q3U7R1	Esyt1,Fam62a,Mbc2	1,52	1,75	1,42	Extended synaptotagmin-1
O88531	Ppt1,Ppt	1,52	1,62	1,55	Palmitoyl-protein thioesterase 1
O35516	Notch2	1,52	1,58	1,63	Neurogenic locus notch homolog protein 2
Q8CI70	Lrrc20	1,52	1,02	1,78	Leucine-rich repeat-containing protein 20
Q9QXK3	Copg2	1,52	1,12	1,25	Coatomer subunit gamma-2
Q6PB93	Galnt2	1,51	1,30	1,28	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2
P52800	Efnb2,Elf2,Epl5,Eplg5,Htkl,Le rk5	1,51	1,52	1,05	Ephrin-B2
Q6ZQ03	Fnbp4,Fbp30,Kiaa1014	1,51	1,61	1,49	Formin-binding protein 4
Q8JZK9	Hmgcs1	1,51	1,51	1,42	Hydroxymethylglutaryl-CoA

					synthase, cytoplasmic
P50429	Arsb,As1,As1-s	1,51	1,73	2,12	Arylsulfatase B
Q9CR09	Ufc1	1,50	1,17	1,60	Ubiquitin-fold modifier-conjugating enzyme 1
P35585	Ap1m1,Cltm	1,50	1,50	1,47	AP-1 complex subunit mu-1
Q9JLI6	Scly,Scl	1,50	1,89	1,51	Selenocysteine lyase
Q8BFR4	Gns	1,49	1,77	1,53	N-acetylglucosamine-6-sulfatase
P97821	Ctsc	1,48	1,68	1,17	Dipeptidyl peptidase 1
Q9EQH2	Erap1,Appils,Arts1	1,46	1,47	1,99	Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1
P53690	Mmp14,Mtmmp	1,46	1,82	1,32	Matrix metalloproteinase-14
P17426	Ap2a1,Adtaa,Clapa1	1,46	1,25	1,68	AP-2 complex subunit alpha-1
Q9D832	Dnajb4	1,46	1,54	1,47	DnaJ homolog subfamily B member 4
B0V2N1	Ptprs	1,45	1,56	1,49	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S
P10810	Cd14	1,45	1,57	1,66	Monocyte differentiation antigen CD14
P97464	Ext1	1,44	1,78	1,89	Exostosin-1
Q8K3X4	Irf2bp1,Eap1,Kiaa1865	1,44	1,32	1,61	Interferon regulatory factor 2-binding protein-like
Q07797	Lgals3bp,Cycap,Mama	1,43	1,44	1,62	Galectin-3-binding protein
Q922P9	Glyr1,Np60	1,43	1,60	1,52	Putative oxidoreductase GLYR1
P21619	Lmnb2	1,43	1,83	1,69	Lamin-B2
P07214	Sparc	1,41	1,77	1,13	SPARC
P98063	Bmp1	1,39	1,57	1,27	Bone morphogenetic protein 1
A2A8L5	Ptprf,Lar	1,37	1,74	1,28	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F
P22892	Ap1g1,Adtg,Clapg1	1,36	1,32	1,50	AP-1 complex subunit gamma-1
Q9JKF6	Pvrl1,Hvec,Prr1	1,36	1,55	1,13	Nectin-1
P62852	Rps25	1,36	1,11	0,58	40S ribosomal protein S25
Q8K2I4	Manba,Bmn	1,35	1,50	1,45	Beta-mannosidase
P15626	Gstm2	1,35	1,44	2,02	Glutathione S-transferase Mu 2
Q9WV91	Ptgfrn,Fprp	1,35	1,66	1,04	Prostaglandin F2 receptor negative regulator
P51660	Hsd17b4,Edh17b4	1,34	1,66	1,21	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2
P14733	Lmnb1	1,34	1,38	1,50	Lamin-B1
P35822	Ptprk,Ptpk	1,33	1,75	1,10	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase kappa
Q9D9V3	Echdc1	1,32	2,15	2,86	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase
P06797	Ctsl1,Ctsl	1,32	0,99	1,74	Cathepsin L1
Q91YI0	Asl	1,32	1,69	1,52	Argininosuccinate lyase
Q8R242	Ctbs	1,31	1,61	1,17	Di-N-acetylchitobiase
Q8CI51	Pdlim5,Enh	1,29	1,95	0,95	PDZ and LIM domain protein 5
P20060	Hexb	1,29	1,79	1,25	Beta-hexosaminidase subunit beta
Q61581	Igfbp7,Mac25	1,29	1,71	1,03	Insulin-like growth factor-binding protein 7
Q62465	Vat1,Vat-1	1,28	1,35	1,59	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog
Q60749	Khdrbs1	1,27	1,15	1,53	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-

					associated protein 1
Q60596	Xrcc1,Xrcc-1	1,27	2,57	1,53	DNA repair protein XRCC1
P54818	Galc	1,26	1,71	1,00	Galactocerebrosidase
Q9DBG3	Ap2b1,Clapb1	1,26	1,27	1,61	AP-2 complex subunit beta
P70452	Stx4,Stx4a	1,26	1,11	1,70	Syntaxin-4
Q91V76		1,25	1,66	2,30	Ester hydrolase C11orf54 homolog
P23249	Mov10,Gb110	1,24	1,58	1,30	Putative helicase MOV-10
Q8VCI5	Pex19,Pxf	1,24	1,35	1,65	Peroxisomal biogenesis factor 19
Q8VCF1	Cant1	1,24	1,60	1,26	Soluble calcium-activated nucleotidase 1
Q61147	Cp	1,21	1,59	1,16	Ceruloplasmin
Q9ESZ8	Gtf2i,Bap135,Diws1t	1,19	1,54	1,54	General transcription factor II-I
Q99L20	Gstt3	1,18	0,97	1,69	Glutathione S-transferase theta-3
Q9ER10	Prss22,Bssp4,Prss26	1,18	1,54	1,73	Brain-specific serine protease 4
P30999	Ctnnd1,Catns,Kiaa0384	1,18	1,51	1,24	Catenin delta-1
Q8CEC6	Ppwd1	1,17	1,39	1,62	Peptidylprolyl isomerase domain and WD repeat-containing protein 1
Q9DBC7	Prkar1a	1,15	1,68	1,52	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit
P37889	Fbln2	1,15	1,76	1,15	Fibulin-2
Q8CC12	Cdan1	1,14		0,57	Codanin-1
Q9Z0F8	Adam17,Tace	1,13	1,52	1,10	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 17
Q61398	Pcolce,Pcpe1	1,12	1,96	1,25	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1
Q8CIF4	Btd	1,07	1,56	1,09	Biotinidase
P14824	Anxa6,Anx6	1,07	1,53	1,23	Annexin A6
Q8VI78	Pla1a,Pspla1	0,98	1,43	2,21	Phospholipase A1 member A
P08122	Col4a2	1,06	0,96	0,42	Collagen alpha-2(IV) chain
O88653	Lamtor3,Map2k1ip1,Mapbp,M apksp1	1,02	0,60	1,03	Ragulator complex protein LAMTOR3
Q6A0A9	FAM120A,Kiaa0183,Ossa	0,97	0,51	0,75	Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1
Q9D0M1	Prpsap1	0,97	1,06	0,52	Phosphoribosyl pyrophosphate synthase-associated protein 1
Q8R1A4	Dock7,Gm430,Kiaa1771	0,96	0,73	0,52	Dedicator of cytokinesis protein 7
Q922Q6	Abhd14a,Dorz1	0,93	0,60	0,61	Protein ABHD14A
P14148	Rpl7	0,93	0,93	0,61	60S ribosomal protein L7
Q9CX00	Ist1,Kiaa0174	0,91	0,88	0,65	IST1 homolog
Q8VCN5	Cth	0,91	1,26	0,61	Cystathionine gamma-lyase
B1AY13	Usp24	0,89	0,73	0,58	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 24
Q3UQN2	Fcho2	0,88	0,53	0,65	F-BAR domain only protein 2
P21278	Gna11,Gna-11	0,87	0,65	0,79	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-11
P61255	Rpl26	0,85	0,55	1,60	60S ribosomal protein L26
P14206	Rpsa,Lamr1,P40-8	0,84	0,64	0,72	40S ribosomal protein SA

Q6P9L6	Kif15,Klp2,Kns17	0,84	0,52	0,68	Kinesin-like protein KIF15
Q99ME2	Wdr6	0,82	0,48	0,59	WD repeat-containing protein 6
Q8CDM8	Fam160b1,Kiaa1600	0,81	0,60	0,55	Protein FAM160B1
Q3UHX2	Pdap1	0,81	0,88	0,58	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein
Q62448	Eif4g2,Nat1	0,80	0,65	0,67	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2
Q9R0N0	Galk1,Galk,Glk	0,80	0,76	0,66	Galactokinase
Q80UM7	Mogs,Gcs1	0,80	0,74	0,65	Mannosyl-oligosaccharide glucosidase
Q8BP47	Nars	0,80	0,73	0,63	Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic
Q8R480	Nup85,Pcnt1	0,80	0,63	0,90	Nuclear pore complex protein Nup85
P25444	Rps2,Lrep3,Rps4	0,79	0,55	0,59	40S ribosomal protein S2
O08848	Trove2,Ssa2	0,79	0,55	0,58	60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein
P62245	Rps15a	0,78	0,59	0,54	40S ribosomal protein S15a
Q8R0W0	Eppk1	0,77	0,80	0,62	Epiplakin
Q9JMH6	Txnrd1,Trxr1	0,77	0,63	0,62	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic
P70700	Poir1b,Rpa2,Rpo1-2	0,77	0,38	0,40	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA2
P50431	Shmt1,Shmt	0,76	0,65	0,85	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic
P11440	Cdk1,Cdc2,Cdc2a,Cdkn1	0,76	0,70	0,63	Cyclin-dependent kinase 1
P70168	Kpnb1,Impnb	0,76	0,67	0,67	Importin subunit beta-1
P63037	Dnaja1,Dnaj2,Hsj2,Hspf4	0,76	0,66	0,78	DnaJ homolog subfamily A member 1
Q60949	Tbc1d1,Kiaa1108,Tbc1	0,76	0,51	0,78	TBC1 domain family member 1
Q9CQF6	Aasdhppt	0,76	0,61	0,74	L-aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase
P29268	Ctgf,Ccn2,Fisp-12,Fisp12,Hcs24	0,76	1,01	0,65	Connective tissue growth factor
Q91YS8	Camk1	0,76	0,62	1,04	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1
Q8K2Z4	Ncapd2,Capd2,Cnap1,Kiaa0159	0,75	0,78	0,65	Condensin complex subunit 1
Q8BUK6	Hook3	0,75	0,54	0,77	Protein Hook homolog 3
Q8VHX6	FlnC,Abpl,Fln2	0,75	0,63	0,72	Filamin-C
Q8CFE6	Slc38a2,Ata2,Kiaa1382,Sat2,Snat2	0,75	0,92	0,66	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 2
P63325	Rps10	0,75	0,72	0,46	40S ribosomal protein S10
P12970	Rpl7a,Surf-3,Surf3	0,75	0,57	0,60	60S ribosomal protein L7a
P62754	Rps6	0,73	0,65	0,61	40S ribosomal protein S6
P62908	Rps3	0,72	0,61	0,69	40S ribosomal protein S3
Q61753	Phgdh	0,72	0,65	0,60	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase
P62983	Rps27a,Uba80,Ubcep1	0,72	0,63	0,83	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a
Q9CZX8	Rps19	0,72	0,68	0,64	40S ribosomal protein S19

O55143	Atp2a2	0,71	0,66	0,66	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
Q9WVG5	Lipg	0,71	0,38	0,66	Endothelial lipase
Q61166	Mapre1	0,69	0,64	0,70	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1
Q9EPU0	Upf1,Rent1	0,69	0,64	0,71	Regulator of nonsense transcripts 1
Q3U2P1	Sec24a	0,69	0,50	0,76	Protein transport protein Sec24A
Q8BFY9	Tnpo1,Kpnb2	0,69	0,60	0,81	Transportin-1
P62281	Rps11	0,69	0,55	0,64	40S ribosomal protein S11
Q9CRT8	Xpot	0,69	0,59	0,61	Exportin-T
P62264	Rps14	0,69	0,76	0,58	40S ribosomal protein S14
P97351	Rps3a	0,68	0,62	0,57	40S ribosomal protein S3a
Q9D1Q6	Erp44,Kiaa0573,Txndc4	0,68	0,43	0,66	Endoplasmic reticulum resident protein 44
Q6ZWN5	Rps9	0,68	0,59	0,69	40S ribosomal protein S9
P62242	Rps8	0,68	0,61	0,64	40S ribosomal protein S8
Q7TNP2	Ppp2r1b	0,68	0,49	0,60	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 65 kDa regulatory subunit A beta isoform
Q8VDF2	Uhrf1,Np95	0,68	0,47	0,57	E3 ubiquitin-protein ligase UHRF1
Q3TXU5	Dhps	0,68	0,51	0,62	Deoxyhypusine synthase
Q8VI75	Ipo4,Imp4a,Ranbp4	0,68	0,70	0,66	Importin-4
Q62167	Ddx3x,D1Pas1-rs2,Ddx3,Dead3,Erh	0,67	0,72	0,63	ATP-dependent RNA helicase DDX3X
Q9JJI8	Rpl38	0,67	0,60	0,65	60S ribosomal protein L38
P48036	Anxa5,Anx5	0,67	0,95	0,86	Annexin A5
Q78PY7	Snd1	0,67	0,75	0,60	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1
P21956	Mfge8	0,66	0,60	0,55	Lactadherin
P62702	Rps4x,Rps4	0,66	0,65	0,63	40S ribosomal protein S4, X isoform
P31266	Rbpj,Igkjr1,Igkr1sbp,Rbpsuh	0,66	0,62	0,71	Recombining binding protein suppressor of hairless
Q8C7R4	Uba6,Ube112	0,66	0,54	0,58	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6
P27659	Rpl3	0,66	0,62	1,08	60S ribosomal protein L3
B1AZI6	Thoc2	0,66	0,72	0,77	THO complex subunit 2
A8C756	Thada,Kiaa1767	0,66	0,70	0,42	Thyroid adenoma-associated protein homolog
Q9WUU8	Tnip1,Abin,Naf1	0,66			TNFAIP3-interacting protein 1
Q62351	Tfrc,Trfr	0,66	0,54	0,78	Transferrin receptor protein 1
P61358	Rpl27	0,66	0,66	0,56	60S ribosomal protein L27
P35922	Fmr1,Fmr-1	0,66	0,55	0,70	Fragile X mental retardation protein 1 homolog
P62830	Rpl23	0,65	0,66	0,53	60S ribosomal protein L23
P97857	Adamts1	0,65	0,57	0,40	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1
A6H8H2	Dennd4c	0,65	0,48	0,56	DENN domain-containing protein 4C
Q9CQC6	Bzw1	0,65	0,79	0,72	Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1

P62301	Rps13	0,65	0,60	0,55	40S ribosomal protein S13
Q9CPR4	Rpl17	0,65	0,82	0,60	60S ribosomal protein L17
Q9D2R0	Aacs	0,65	0,64	0,53	Acetoacetyl-CoA synthetase
Q08024	Cbfb,Pebp2b,Peppb2	0,65	0,48	0,55	Core-binding factor subunit beta
P14131	Rps16	0,65	0,65	0,60	40S ribosomal protein S16
Q00780	Col8a1	0,64	0,81	0,52	Collagen alpha-1(VIII) chain
E9PVA8	Gcn1,Gcn111	0,64	0,70	0,52	eIF-2-alpha kinase activator GCN1
Q61699	Hsph1,Hsp105,Hsp110,Kiaa0201	0,64	0,96	0,79	Heat shock protein 105 kDa
Q9Z222	B3GNT2,B3gnt1,Beta3gnt	0,64	0,98	0,65	N-acetyllactosaminide beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2
P62270	Rps18	0,63	0,69	0,69	40S ribosomal protein S18
P24547	Impdh2	0,63	0,73	0,66	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2
Q9D7X3	Dusp3	0,62	0,72	0,65	Dual specificity protein phosphatase 3
Q924Z4	Cers2,Lass2,Trh3	0,62	0,38	0,75	Ceramide synthase 2
E9Q735	Ube4a,Ufd2b	0,62	0,49	0,63	Ubiquitin conjugation factor E4 A
Q6A026	Pds5a,Kiaa0648	0,62	0,65	0,72	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A
Q922Q8	Lrrc59	0,62	0,65	0,83	Leucine-rich repeat-containing protein 59
P49025	Cit,Crik	0,62	0,65	0,56	Citron Rho-interacting kinase
Q8CG48	Smc2,Cape,Fin16,Smc2l1	0,62	0,75	0,75	Structural maintenance of chromosomes protein 2
Q91YR1	Twf1,Ptk9	0,62	0,61	0,71	Twinfilin-1
O54988	Slk,Kiaa0204,Stk2	0,62	0,60	0,75	STE20-like serine/threonine-protein kinase
P61025	Cks1b,Cks1,Sid1334	0,61	0,62	0,67	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1
Q9CZM2	Rpl15	0,61	0,37	0,63	60S ribosomal protein L15
Q8C1Z8	Trmt10a,Rg9mtd2	0,60	0,66	0,88	tRNA methyltransferase 10 homolog A
P60330	Esp1,Esp1,Kiaa0165	0,60	0,40	0,48	Separin
Q9EQP2	Ehd4,Past2	0,60	0,71	0,59	EH domain-containing protein 4
Q8R3C0	Mcmbp	0,60	0,55	0,71	Mini-chromosome maintenance complex-binding protein
Q810B6	Ankfy1,Ankhzn,Kiaa1255	0,60	0,77	0,52	Rabankyrin-5
P56390	Cks2	0,59	0,61	0,84	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2
Q60604	Scin	0,59	0,53	0,64	Adseverin
Q99104	Myo5a,Dilute	0,59	0,77	0,71	Unconventional myosin-Va
P10852	Slc3a2,Mdu1	0,59	0,74	0,52	4F2 cell-surface antigen heavy chain
Q9ESJ0	Xpo4,Kiaa1721	0,59	0,56	0,61	Exportin-4
Q8BWW9	Kiaa1524,Cip2a	0,58	0,54	0,48	Protein CIP2A
Q924C6	Loxl4,Loxc	0,58	0,72	0,54	Lysyl oxidase homolog 4
Q9CR57	Rpl14	0,58	0,54	0,54	60S ribosomal protein L14
P70275	Sema3e,Semah,Semh	0,58	0,61	0,58	Semaphorin-3E
O35134	Polr1a,Rpa1,Rpo1-4	0,56	0,82	0,46	DNA-directed RNA polymerase I subunit RPA1

Q60737	Csnk2a1,Ckiia	0,56	0,58	0,55	Casein kinase II subunit alpha
P12850	Cxcl1,Gro,Gro1,Mgsa,Scyb1	0,56	0,60	0,62	Growth-regulated alpha protein
P63276	Rps17	0,56	0,60	0,62	40S ribosomal protein S17
Q9QUJ7	Acsl4,Acs4,Facl4	0,56	0,66	0,75	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 4
Q6P9P6	Kif11	0,56	0,45	0,48	Kinesin-like protein KIF11
P07141	Csf1,Csfm	0,55	0,62	0,42	Macrophage colony-stimulating factor 1
P52293	Kpna1,Rch2	0,55	0,36	0,39	Importin subunit alpha-1
P62911	Rpl32	0,55	0,53	0,56	60S ribosomal protein L32
P62849	Rps24	0,54	0,56	0,71	40S ribosomal protein S24
P55012	Slc12a2,Nkcc1	0,54	0,66	0,66	Solute carrier family 12 member 2
Q91WN1	Dnajc9	0,54	0,55	0,64	DnaJ homolog subfamily C member 9
Q9CWM4	Pfdn1	0,54	0,99	0,78	Prefoldin subunit 1
Q9CRD0	Ociad1,Asrij	0,54	0,47		OClA domain-containing protein 1
P47856	Gfpt1,Gfpt	0,52	0,44	0,52	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizing] 1
Q64516	Gk,Gyk	0,52	0,41	0,53	Glycerol kinase
Q8VDL4	Adpgk	0,51	0,59	0,58	ADP-dependent glucokinase
P43346	Dck	0,51	0,46	0,86	Deoxycytidine kinase
Q69ZR2	Hectd1,Kiaa1131,Opm	0,51	0,64	0,88	E3 ubiquitin-protein ligase HECTD1
Q9D8L5	Ccdc91,Ggabp	0,51	0,44	0,80	Coiled-coil domain-containing protein 91
P03975	lap	0,50	0,37	0,61	IgE-binding protein
Q9JJ78	Pbk,Topk	0,50	0,54	0,47	Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase
Q8BX90	Fndc3a,D14Ertd453e,Fndc3,Kiaa0970	0,47	0,24	0,55	Fibronectin type-III domain-containing protein 3A
P50228	Cxcl5,Scyb5	0,46	0,47	0,62	C-X-C motif chemokine 5
Q9D1C1	Ube2c,Ubch10	0,45	0,52	0,49	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C
E9Q5G3	Kif23	0,44	0,55	0,47	Kinesin-like protein KIF23
P11157	Rrm2	0,40	0,30	0,60	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2
P18406	Cyr61,Ccn1,Igfbp10	0,40	0,43	0,52	Protein CYR61
Q9WVM1	Racgap1,Mgcracgap	0,39	0,57	0,48	Rac GTPase-activating protein 1
Q01320	Top2a,Top-2,Top2	0,36	0,37	0,62	DNA topoisomerase 2-alpha
Q8C166	Cpne1	0,33	0,49	0,49	Copine-1
P42227	Stat3,Apf	0,22	0,29	0,04	Signal transducer and activator of transcription 3

MC-siControl: medio condicionado obtenido de células transfectadas con siRNA Control, MC-siStat3 medio condicionado obtenido de células transfectadas con siRNA contra Stat3. Secretoma 1, 2 y 3 corresponde a 3 réplicas experimentales.

REFERENCIAS

- Achuthan, S., Santhoshkumar, T. R., Prabhakar, J., Nair, S. A., & Pillai, M. R. (2011). Drug-induced senescence generates chemoresistant stemlike cells with low reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(43), 37813–37829.
- Acosta, J. C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J. P., Athineos, D., Kang, T.-W., Lasitschka, F., Andrulis, M., Pascual, G., Morris, K. J., Khan, S., Jin, H., Dharmalingam, G., Snijders, A. P., Carroll, T., Capper, D., Pritchard, C., Inman, G. J., Longerich, T., Sansom, O. J., Benitah, S. A., Zender, L., & Gil, J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology*, *15*(8), 978–990.
- Acosta, J. C., O’Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M. V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., Takatsu, Y., Melamed, J., d’Adda di Fagagna, F., Bernard, D., Hernando, E., & Gil, J. (2008). Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. *Cell*, *133*(6), 1006–1018.
- Alimonti, A., Nardella, C., Chen, Z., Clohessy, J. G., Carracedo, A., Trotman, L. C., Cheng, K., Varmeh, S., Kozma, S. C., Thomas, G., Rosivatz, E., Woscholski, R., Cognetti, F., Scher, H. I., & Pandolfi, P. P. (2010). A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(3), 681–693.
- Alonzi, T., Newton, I. P., Bryce, P. J., Di Carlo, E., Lattanzio, G., Tripodi, M., Musiani, P., & Poli, V. (2004). Induced somatic inactivation of STAT3 in mice triggers the development of a fulminant form of enterocolitis. *Cytokine*, *26*(2), 45–56.
- Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagné, F., Ugolini, S., & Vivier, E. (2006). Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity*, *25*(2), 331–342.
- Antonangeli, F., Soriani, A., Ricci, B., Ponzetta, A., Benigni, G., Morrone, S., Bernardini, G., & Santoni, A. (2016). Natural killer cell recognition of *in vivo* drug-induced senescent multiple myeloma cells. *Oncotarget*, *5*(10), e1218105.
- Ascierto, P. A., Kirkwood, J. M., Grob, J.-J., Simeone, E., Grimaldi, A. M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F. M., & Mozzillo, N. (2012). The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of Translational Medicine*, *10*(1), 10–85.
- Baar, M. P., Brandt, R. M. C., Putavet, D. A., Klein, J. D. D., Derks, K. W. J., Bourgeois, B. R. M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D. A., van der Pluijm, I., Essers, J., van Cappellen, W. A., van IJcken, W. F., Houtsmuller, A. B., Pothof, J., de Bruin, R. W. F., Madl, T., Hoeijmakers, J. H. J., Campisi, J., & de Keizer, P. L. J. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell*, *169*(1), 132–147.e16.
- Bailey, S. R., Nelson, M. H., Himes, R. A., Li, Z., Mehrotra, S., & Paulos, C. M. (2014). Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. *Frontiers in Immunology*, *5*, 5–276.

- Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., A. Saltness, R., Jeganathan, K. B., Verzosa, G. C., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J. D., & van Deursen, J. M. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, *530*(7589), 184–189.
- Baker, D. J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N. K., Childs, B. G., van de Sluis, B., Kirkland, J. L., & van Deursen, J. M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, *479*(7372), 232–236.
- Balañá, M. E., Labriola, L., Salatino, M., Movsichoff, F., Peters, G., Charreau, E. H., & Elizalde, P. V. (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.
- Barrio, M. M., de Motta, P. T., Kaplan, J., von Euw, E. M., Bravo, A. I., Chacón, R. D., & Mordoh, J. (2006). A Phase I Study of an Allogeneic Cell Vaccine (VACCIMEL) With GM-CSF in Melanoma Patients. *Journal of Immunotherapy*, *29*(4), 444–454.
- Barry, M., & Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews Immunology*, *2*(6), 401–409.
- Basu, D., Reyes-Mugica, M., & Rebbaa, A. (2012). Role of the Beta Catenin Destruction Complex in Mediating Chemotherapy-Induced Senescence-Associated Secretory Phenotype. *PLoS One*, *7*(12), e52188.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J Roy Stat Soc B*, *57*, 289–300.
- Berard, M., Brandt, K., Bulfone-Paus, S., & Tough, D. F. (2003). IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *170*(10), 5018–5026.
- Bernardini, G., Benigni, G., Antonangeli, F., Ponzetta, A., & Santoni, A. (2014). Multiple levels of chemokine receptor regulation in the control of mouse natural killer cell development. *Frontiers in Immunology*, *5*(44), 1–6.
- Biswas, S. K., & Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology*, *11*(10), 889–896.
- Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, *6*(8), 611–622.
- Blaskovich, M. A., Sun, J., Cantor, A., Turkson, J., Jove, R., & Sefti, S. M. (2003). Discovery of JSI-124 (cucurbitacin I), a selective Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway inhibitor with potent antitumor activity against human and murine cancer cells in mice. *Cancer Research*, *63*(6), 1270–1279.
- Böttcher, J. P., Bonavita, E., Chakravarty, P., Blees, H., Cabeza-Cabrero, M., Sammicheli, S., Rogers, N. C., Sahai, E., Zelenay, S., & Reis e Sousa, C. (2018). NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell*, *172*(5), 1022–1037.e14.
- Bowman, T., & Jove, R. (1999). 4. Stat Proteins and Cancer. *Cancer Control*, *6*(6), 615–619.
- Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., Ranta, F., Ullrich, S.,

- Mocikat, R., Braungart, K., Mehra, T., Fehrenbacher, B., Berdel, J., Niessner, H., Meier, F., van den Broek, M., Häring, H.-U., Handgretinger, R., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F., Pesic, M., Bauer, J., Zender, L., Schaller, M., Schulze-Osthoff, K., & Röcken, M. (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, *494*(7437), 361–365.
- Bromberg, J., & Darnell, J. E. (2000). The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene*, *19*(21), 2468–2473.
- Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Besser, D., Lathem, W. W., & Darnell, J. E. (1998). Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Molecular and Cellular Biology*, *18*(5), 2553–2558.
- Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., & Darnell, J. E. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell*, *98*(3), 295–303.
- Brunet, J.-F., Denizot, F., Luciani, M.-F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M.-G., & Golstein, P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature*, *328*(6127), 267–270.
- Bunt, S. K., Yang, L., Sinha, P., Clements, V. K., Leips, J., & Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Reduced Inflammation in the Tumor Microenvironment Delays the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Limits Tumor Progression. *Cancer Research*, *67*(20), 10019–10026.
- Burd, C. E., Sorrentino, J. A., Clark, K. S., Darr, D. B., Krishnamurthy, J., Deal, A. M., Bardeesy, N., Castrillon, D. H., Beach, D. H., & Sharpless, N. E. (2013). Monitoring Tumorigenesis and Senescence In Vivo with a p16INK4a-Luciferase Model. *Cell*, *152*(1–2), 340–351.
- Burdelya, L., Kujawski, M., Niu, G., Zhong, B., Wang, T., Zhang, S., Kortylewski, M., Shain, K., Kay, H., Djeu, J., Dalton, W., Pardoll, D., Wei, S., & Yu, H. (2005). Stat3 activity in melanoma cells affects migration of immune effector cells and nitric oxide-mediated antitumor effects. *Journal of Immunology*, *174*(7), 3925–3931.
- Cahu, J., Bustany, S., & Sola, B. (2012). Senescence-associated secretory phenotype favors the emergence of cancer stem-like cells. *Cell Death & Disease*, *3*(12), e446–e446.
- Canino, C., Mori, F., Cambria, A., Diamantini, A., Germoni, S., Alessandrini, G., Borsellino, G., Galati, R., Battistini, L., Blandino, R., Facciolo, F., Citro, G., Strano, S., Muti, P., Blandino, G., & Cioce, M. (2012). SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells. *Oncogene*, *31*(26), 3148–3163.
- Carnevale, R. P., Proietti, C. J., Salatino, M., Urtreger, A., Peluffo, G., Edwards, D. P., Boonyaratanakornkit, V., Charreau, E. H., de Kier Joffé, E. B., Schillaci, R., & Elizalde, P. V. (2007). Progesterin 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), 1335–1358.
- Carpenter, R. L., & Lo, H.-W. (2014). STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers*, *6*(2), 897–925.
- Carr, M. W., Roth, S. J., Luther, E., Rose, S. S., & Springer, T. A. (1994). Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(9),

3652–3656.

- Cassell, D., & Forman, J. (1988). Linked recognition of helper and cytotoxic antigenic determinants for the generation of cytotoxic T lymphocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 532, 51–60.
- Chan, T. A., Wolchok, J. D., & Snyder, A. (2015). Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 373(20), 1984–1984.
- Chandra, T., & Kirschner, K. (2016). Chromosome organisation during ageing and senescence. *Current Opinion in Cell Biology*, 40, 161–167.
- Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N. E., Ding, S., Feng, W., Luo, Y., Wang, X., Aykin-Burns, N., Krager, K., Ponnappan, U., Hauer-Jensen, M., Meng, A., & Zhou, D. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature Medicine*, 22(1), 78–83.
- Cheever, M. A. (2008). Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunological Reviews*, 222(1), 357–368.
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity*, 39(1), 1–10.
- Chen, Q., Sun, L., & Chen, Z. J. (2016). Regulation and function of the cGAS–STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nature Immunology*, 17(10), 1142–1149.
- Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J., & van Deursen, J. M. (2014). Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? *EMBO Reports*, 15(11), 1139–1153.
- Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R.-M., Marquess, D., Dananberg, J., & van Deursen, J. M. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(10), 718–735.
- Choi, A., O’Leary, M., Fong, Y., & Chen, N. (2016). From Benchtop to Bedside: A Review of Oncolytic Virotherapy. *Biomedicines*, 4, 3–18.
- Cieri, N., Camisa, B., Cocchiarella, F., Forcato, M., Oliveira, G., Provasi, E., Bondanza, A., Bordignon, C., Peccatori, J., Ciceri, F., Lupo-Stanghellini, M. T., Mavilio, F., Mondino, A., Biciato, S., Recchia, A., & Bonini, C. (2013). IL-7 and IL-15 instruct the generation of human memory stem T cells from naive precursors. *Blood*, 121(4), 573–584.
- Claman, H. N., Chaperon, E. A., & Triplett, R. F. (1966). Thymus-marrow cell combinations. Synergism in antibody production. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, 122(4), 1167–1171.
- Coley, W. B. (1910). The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 3(Surg Sect), 1–48.
- Coley, W. B. (1991). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, (262), 3–11.

- Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A. J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., Beach, D., & Serrano, M. (2005). Senescence in premalignant tumours. *Nature*, *436*(7051), 642–642.
- Collado, M., & Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Reviews Cancer*, *10*(1), 51–57.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, *22*(11), 633–640.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Fuchs, A., Colonna, M., & Caligiuri, M. A. (2004). NK cell and DC interactions. *Trends in Immunology*, *25*(1), 47–52.
- Coppé, J.-P., Kauser, K., Campisi, J., & Beauséjour, C. M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(40), 29568–29574.
- Coppé, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P.-Y., & Campisi, J. (2008). Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biology*, *6*(12), e301.
- Cordo Russo, R. I., Béguelin, W., Díaz Flaqué, M. C., Proietti, C. J., Venturutti, L., Galigniana, N., Tkach, M., Guzmán, P., Roa, J. C., O'Brien, N. A., Charreau, E. H., Schillaci, R., & Elizalde, P. V. (2015). Targeting ErbB-2 nuclear localization and function inhibits breast cancer growth and overcomes trastuzumab resistance. *Oncogene*, *34*(26), 3413–3428.
- Corthay, A., Skovseth, D. K., Lundin, K. U., Røsjø, E., Omholt, H., Hofgaard, P. O., Haraldsen, G., & Bogen, B. (2005). Primary Antitumor Immune Response Mediated by CD4+ T Cells. *Immunity*, *22*(3), 371–383.
- Darnell, J. E., Kerr, I. M., & Stark, G. R. (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, *264*(5164), 1415–1421.
- Delorme, E. J., & Alexander, P. (1964). Treatment of primary fibrosarcoma in the rat with immune lymphocytes. *Lancet (London, England)*, *2*(7351), 117–120.
- Demaria, M., O'Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., Koenig, K., Le, C., Mitin, N., Deal, A. M., Alston, S., Academia, E. C., Kilmarx, S., Valdovinos, A., Wang, B., de Bruin, A., Kennedy, B. K., Melov, S., Zhou, D., Sharpless, N. E., Muss, H., & Campisi, J. (2017). Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discovery*, *7*(2), 165–176.
- Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R.-M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dollé, M. E. T., Hoeijmakers, J. H. J., de Bruin, A., Hara, E., & Campisi, J. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell*, *31*(6), 722–733.
- Di, G.-H., Liu, Y., Lu, Y., Liu, J., Wu, C., & Duan, H.-F. (2014). IL-6 secreted from senescent mesenchymal stem cells promotes proliferation and migration of breast cancer cells. *PLoS One*, *9*(11), e113572.
- Di Mitri, D., Toso, A., Chen, J. J., Sarti, M., Pinton, S., Jost, T. R., D'Antuono, R., Montani, E., Garcia-Escudero, R., Guccini, I., Da Silva-Alvarez, S., Collado, M., Eisenberger, M., Zhang, Z., Catapano, C., Grassi, F., & Alimonti, A. (2014).

Tumour-infiltrating Gr-1+ myeloid cells antagonize senescence in cancer. *Nature*, 515(7525), 134–137.

- Diamond, M. S., Kinder, M., Matsushita, H., Mashayekhi, M., Dunn, G. P., Archambault, J. M., Lee, H., Arthur, C. D., White, J. M., Kalinke, U., Murphy, K. M., & Schreiber, R. D. (2011). Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(10), 1989–2003.
- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Aït-Yahia, S., Brière, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., & Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(2), 373–386.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (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), 9363–9367.
- Dolled-Filhart, M., Camp, R. L., Kowalski, D. P., Smith, B. L., & Rimm, D. L. (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: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(2), 594–600.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., & Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature Medicine*, 5(12), 1365–1369.
- Dou, Z., Ghosh, K., Vizioli, M. G., Zhu, J., Sen, P., Wangenstein, K. J., Simithy, J., Lan, Y., Lin, Y., Zhou, Z., Capell, B. C., Xu, C., Xu, M., Kieckhafer, J. E., Jiang, T., Shoshkes-Carmel, M., Tanim, K. M. A. Al, Barber, G. N., Seykora, J. T., Millar, S. E., Kaestner, K. H., Garcia, B. A., Adams, P. D., & Berger, S. L. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature*, 550(7676), 402–406.
- Dran, G., Luthy, I. A., Molinolo, A. A., Montecchia, F., Charreau, E. H., Pasqualini, C. D., & Lanari, C. (1995). Effect of medroxyprogesterone acetate (MPA) and serum factors on cell proliferation in primary cultures of an MPA-induced mammary adenocarcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment*, 35(2), 173–186.
- Dudley, M. E., Yang, J. C., Sherry, R., Hughes, M. S., Royal, R., Kammula, U., Robbins, P. F., Huang, J., Citrin, D. E., Leitman, S. F., Wunderlich, J., Restifo, N. P., Thomasian, A., Downey, S. G., Smith, F. O., Klapper, J., Morton, K., Laurencot, C., White, D. E., & Rosenberg, S. A. (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, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 329–360.
- Eggert, T., Wolter, K., Ji, J., Ma, C., Yevsa, T., Klotz, S., Medina-Echeverez, J., Longerich, T., Forgues, M., Reisinger, F., Heikenwalder, M., Wang, X. W., Zender, L., & Greten, T. F. (2016). Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell*,

30(4), 533–547.

- Erdmann, F., Lortet-Tieulent, J., Schüz, J., Zeeb, H., Greinert, R., Breitbart, E. W., & Bray, F. (2013). International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008—are recent generations at higher or lower risk? *International Journal of Cancer*, *132*(2), 385–400.
- Ewald, J. A., Desotelle, J. A., Wilding, G., & Jarrard, D. F. (2010). Therapy-Induced Senescence in Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *102*(20), 1536–1546.
- Fagagna, F. d'Adda di, Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., & Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, *426*(6963), 194–198.
- Felsher, D. W., & Bishop, J. M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Molecular Cell*, *4*(2), 199–207.
- Felsher, D. W., Weinstein, I. B., & Joe, A. (2008). Oncogene Addiction versus Oncogene Amnesia: Perhaps More than Just a Bad Habit? *Cancer Research*, *68*(9), 3081–3086.
- Fielding, C. A., Jones, G. W., McLoughlin, R. M., McLeod, L., Hammond, V. J., Uceda, J., Williams, A. S., Lambie, M., Foster, T. L., Liao, C.-T., Rice, C. M., Greenhill, C. J., Colmont, C. S., Hams, E., Coles, B., Kift-Morgan, A., Newton, Z., Craig, K. J., Williams, J. D., Williams, G. T., Davies, S. J., Humphreys, I. R., O'Donnell, V. B., Taylor, P. R., Jenkins, B. J., Topley, N., & Jones, S. A. (2014). Interleukin-6 Signaling Drives Fibrosis in Unresolved Inflammation. *Immunity*, *40*(1), 40–50.
- Foersch, S., Sperka, T., Lindner, C., Taut, A., Rudolph, K. L., Breier, G., Boxberger, F., Rau, T. T., Hartmann, A., Stürzl, M., Wittkopf, N., Haep, L., Wirtz, S., Neurath, M. F., & Waldner, M. J. (2015). VEGFR2 Signaling Prevents Colorectal Cancer Cell Senescence to Promote Tumorigenesis in Mice With Colitis. *Gastroenterology*, *149*(1), 177–189.e10.
- Forbes, L. R., Milner, J., & Haddad, E. (2016). Signal transducer and activator of transcription 3: a year in review. *Current Opinion in Hematology*, *23*(1), 7–23.
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., & Honjo, T. (2000). Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *Journal of Experimental Medicine*, *192*(7), 1027–1034.
- Fresno, C., González, G. A., Llera, A. S. & Fernández, E. A. (2018). Pbcmc: Permutation-Based Confidence for Molecular Classification.
- Frey, N., Venturelli, S., Zender, L., & Bitzer, M. (2017). Cellular senescence in gastrointestinal diseases: from pathogenesis to therapeutics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *15*(2), 81–95.
- Fuertes, M. B., Kacha, A. K., Kline, J., Woo, S.-R., Kranz, D. M., Murphy, K. M., & Gajewski, T. F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8⁺ T cell responses through CD8α⁺ dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(10), 2005–2016.

- Fuhrmann-Stroissnigg, H., Ling, Y. Y., Zhao, J., McGowan, S. J., Zhu, Y., Brooks, R. W., Grassi, D., Gregg, S. Q., Stripay, J. L., Dorronsoro, A., Corbo, L., Tang, P., Bukata, C., Ring, N., Giacca, M., Li, X., Tchkonja, T., Kirkland, J. L., Niedernhofer, L. J., & Robbins, P. D. (2017). Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nature Communications*, 8(422), 1–14.
- Gabrilovich, D. I. (2017). Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunology Research*, 5(1), 3–8.
- Gardner, T., Elzey, B., & Hahn, N. M. (2012). Sipuleucel-T (Provenge) autologous vaccine approved for treatment of men with asymptomatic or minimally symptomatic castrate-resistant metastatic prostate cancer. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8(4), 534–539.
- Garland, S. M., Hernandez-Avila, M., Wheeler, C. M., Perez, G., Harper, D. M., Leodolter, S., Tang, G. W. K., Ferris, D. G., Steben, M., Bryan, J., Taddeo, F. J., Railkar, R., Esser, M. T., Sings, H. L., Nelson, M., Boslego, J., Sattler, C., Barr, E., Koutsky, L. A., & Females United to Unilaterally Reduce Endo/Ectocervical Disease (FUTURE) I Investigators. (2007). Quadrivalent Vaccine against Human Papillomavirus to Prevent Anogenital Diseases. *New England Journal of Medicine*, 356(19), 1928–1943.
- Gianni, L., Eiermann, W., Semiglazov, V., Lluch, A., Tjulandin, S., Zambetti, M., Moliterni, A., Vazquez, F., Byakhov, M. J., Lichinitser, M., Climent, M. A., Ciruelos, E., Ojeda, B., Mansutti, M., Bozhok, A., Magazzù, D., Heinzmann, D., Steinseifer, J., Valagussa, P., & Baselga, J. (2014). Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *The Lancet Oncology*, 15(6), 640–647.
- Giuriato, S., Ryeom, S., Fan, A. C., Bachireddy, P., Lynch, R. C., Rieth, M. J., van Riggelen, J., Kopelman, A. M., Passegue, E., Tang, F., Folkman, J., & Felsher, D. W. (2006). Sustained regression of tumors upon MYC inactivation requires p53 or thrombospondin-1 to reverse the angiogenic switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), 16266–16271.
- Giurisato, E., Xu, Q., Lonardi, S., Telfer, B., Russo, I., Pearson, A., Finegan, K. G., Wang, W., Wang, J., Gray, N. S., Vermi, W., Xia, Z., & Tournier, C. (2018). Myeloid ERK5 deficiency suppresses tumor growth by blocking protumor macrophage polarization via STAT3 inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(12), E2801–E2810.
- GLOBOCAN. (2012). [Http://globocan.iarc.fr/Default.aspx](http://globocan.iarc.fr/Default.aspx).
- Glück, S., Guey, B., Gulen, M. F., Wolter, K., Kang, T.-W., Schmacke, N. A., Bridgeman, A., Rehwinkel, J., Zender, L., & Ablasser, A. (2017). Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nature Cell Biology*, 19(9), 1061–1070.
- Gotthardt, D., Putz, E. M., Straka, E., Kudweis, P., Biaggio, M., Poli, V., Strobl, B., Müller, M., & Sexl, V. (2014). Loss of STAT3 in murine NK cells enhances NK cell-dependent tumor surveillance. *Blood*, 124(15), 2370–2379.
- Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M. A., & Ahdieh, M. (1994). Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5161), 965–968.

- Green, J., Fuge, O., Allchorne, P., & Vasdev, N. (2015). Immunotherapy for bladder cancer. *Research and Reports in Urology*, 7, 65–79.
- Grégoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., & Walzer, T. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunological Reviews*, 220(1), 169–182.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6), 883–899.
- Guillerey, C., Huntington, N. D., & Smyth, M. J. (2016). Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nature Immunology*, 17(9), 1025–1036.
- Haabeth, O. A. W., Lorvik, K. B., Hammarström, C., Donaldson, I. M., Haraldsen, G., Bogen, B., & Corthay, A. (2011). Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nature Communications*, 2(240), 1–12.
- Hadrup, S., Donia, M., & thor Straten, P. (2013). Effector CD4 and CD8 T Cells and Their Role in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment*, 6(2), 123–133.
- Hall, B. M., Balan, V., Gleiberman, A. S., Strom, E., Krasnov, P., Virtuoso, L. P., Rydkina, E., Vujcic, S., Balan, K., Gitlin, I., Leonova, K., Polinsky, A., Chernova, O. B., & Gudkov, A. V. (2016). Aging of mice is associated with p16(Ink4a)- and β -galactosidase-positive macrophage accumulation that can be induced in young mice by senescent cells. *Aging*, 8(7), 1294–1315.
- Hall, R. D., & Kudchadkar, R. R. (2014). BRAF mutations: signaling, epidemiology, and clinical experience in multiple malignancies. *Cancer Control: Journal of the Moffitt Cancer Center*, 21(3), 221–230.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37, 614–636.
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., Schaper, & Fred. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical Journal*, 374(1), 1–20.
- Helman, A., Klochendler, A., Azazmeh, N., Gabai, Y., Horwitz, E., Anzi, S., Swisa, A., Condiotti, R., Granit, R. Z., Nevo, Y., Fixler, Y., Shreibman, D., Zamir, A., Tornovsky-Babeay, S., Dai, C., Glaser, B., Powers, A. C., Shapiro, A. M. J., Magnuson, M. A., Dor, Y., & Ben-Porath, I. (2016). P16Ink4a-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nature Medicine*, 22(4), 412–420.
- Hendrayani, S.-F., Al-Khalaf, H. H., & Aboussekhra, A. (2013). Curcumin triggers p16-dependent senescence in active breast cancer-associated fibroblasts and suppresses their paracrine procarcinogenic effects. *Neoplasia*, 15(6), 631–640.
- Hernandez-Segura, A., de Jong, T. V, Melov, S., Guryev, V., Campisi, J., & Demaria, M. (2017). Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Current Biology: CB*, 27(17), 2652–2660.e4.

- Herrmann, A., Priceman, S. J., Kujawski, M., Xin, H., Cherryholmes, G. A., Zhang, W., Zhang, C., Lahtz, C., Kowolik, C., Forman, S. J., Kortylewski, M., Yu, H., & Yu, H. (2014). CTLA4 aptamer delivers STAT3 siRNA to tumor-associated and malignant T cells. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(7), 2977–2987.
- Ho, H. H., & Ivashkiv, L. B. (2006). Role of STAT3 in type I interferon responses. Negative regulation of STAT1-dependent inflammatory gene activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *281*(20), 14111–14118.
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J. M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J. I., Wolchok, J. D., Weber, J. S., Tian, J., Yellin, M. J., Nichol, G. M., Hoos, A., & Urba, W. J. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*, *363*(8), 711–723.
- Hong, D., Kurzrock, R., Kim, Y., Woessner, R., Younes, A., Nemunaitis, J., Fowler, N., Zhou, T., Schmidt, J., Jo, M., Lee, S. J., Yamashita, M., Hughes, S. G., Fayad, L., Piha-Paul, S., Nadella, M. V. P., Mohseni, M., Lawson, D., Reimer, C., Blakey, D. C., Xiao, X., Hsu, J., Revenko, A., Monia, B. P., & MacLeod, A. R. (2015). AZD9150, a next-generation antisense oligonucleotide inhibitor of STAT3 with early evidence of clinical activity in lymphoma and lung cancer. *Science Translational Medicine*, *7*(314), 1–23.
- Hossain, D. M. S., Pal, S. K., Moreira, D., Duttagupta, P., Zhang, Q., Won, H., Jones, J., D'Apuzzo, M., Forman, S., & Kortylewski, M. (2015). TLR9-Targeted STAT3 Silencing Abrogates Immunosuppressive Activity of Myeloid-Derived Suppressor Cells from Prostate Cancer Patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *21*(16), 3771–3782.
- Hsiao, J.-R., Jin, Y.-T., Tsai, S.-T., Shiau, A.-L., Wu, C.-L., & Su, W.-C. (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), 344–349.
- Hsu, J., Hodgins, J. J., Marathe, M., Nicolai, C. J., Bourgeois-Daigneault, M.-C., Trevino, T. N., Azimi, C. S., Scheer, A. K., Randolph, H. E., Thompson, T. W., Zhang, L., Iannello, A., Mathur, N., Jardine, K. E., Kirn, G. A., Bell, J. C., McBurney, M. W., Raulet, D. H., & Ardolino, M. (2018). Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(10), 4654–4668.
- Hsu, P., Santner-Nanan, B., Hu, M., Skarratt, K., Lee, C. H., Stormon, M., Wong, M., Fuller, S. J., & Nanan, R. (2015). IL-10 Potentiates Differentiation of Human Induced Regulatory T Cells via STAT3 and Foxo1. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *195*(8), 3665–3674.
- Huang, Y.-H., Yang, P.-M., Chuah, Q.-Y., Lee, Y.-J., Hsieh, Y.-F., Peng, C.-W., & Chiu, S.-J. (2014). Autophagy promotes radiation-induced senescence but inhibits bystander effects in human breast cancer cells. *Autophagy*, *10*(7), 1212–1228.
- Huynh, J., Chand, A., Gough, D., & Ernst, M. (2018). Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer - using tissue repair as a road map. *Nature Reviews. Cancer*, *19*(2), 82–96.
- Iannello, A., Thompson, T. W., Ardolino, M., Lowe, S. W., & Raulet, D. H. (2013). P53-

dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine*, 210(10), 2057–2069.

Instituto Nacional del Cáncer. (n.d.). [Http://msal.gov.ar/inc/](http://msal.gov.ar/inc/).

Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K., & Honjo, T. (1992). Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal*, 11(11), 3887–3895.

Ivanov, A., Pawlikowski, J., Manoharan, I., Tuyn, J. van, Nelson, D. M., Rai, T. S., Shah, P. P., Hewitt, G., Korolchuk, V. I., Passos, J. F., Wu, H., Berger, S. L., & Adams, P. D. (2013). Lysosome-mediated processing of chromatin in senescence. *J Cell Biol*, 202(1), 129–143.

Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G., & Schoenberger, S. P. (2003). CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature*, 421(6925), 852–856.

Jenkins, R. W., Barbie, D. A., & Flaherty, K. T. (2018). Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *British Journal of Cancer*, 118(1), 9–16.

Jeon, O. H., Kim, C., Laberge, R.-M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A. P., Chung, J. W., Kim, D. H., Poon, Y., David, N., Baker, D. J., van Deursen, J. M., Campisi, J., & Elisseeff, J. H. (2017). Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nature Medicine*, 23(6), 775–781.

Joselow, A., Lynn, D., Terzian, T., & Box, N. F. (2017). Senescence-Like Phenotypes in Human Nevi. In *Methods in molecular biology* (Vol. 1534, pp. 175–184).

Jung, Y.-S., Qian, Y., & Chen, X. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cellular Signalling*, 22(7), 1003–1012.

Kaiser, J. (2017). Personalized tumor vaccines keep cancer in check. *Science*, 356(6334), 122–122.

Kalathur, M., Toso, A., Chen, J., Revandkar, A., Danzer-Baltzer, C., Guccini, I., Alajati, A., Sarti, M., Pinton, S., Brambilla, L., Di Mitri, D., Carbone, G., Garcia-Escudero, R., Padova, A., Magnoni, L., Tarditi, A., Maccari, L., Malusa, F., Kalathur, R. K. R., A. Pinna, L., Cozza, G., Ruzzene, M., Delaleu, N., Catapano, C. V., Frew, I. J., & Alimonti, A. (2015). A chemogenomic screening identifies CK2 as a target for pro-senescence therapy in PTEN-deficient tumours. *Nature Communications*, 6(7227), 1–12.

Kang, T.-W., Yevesa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., Iken, M., Vucur, M., Weiss, S., Heikenwalder, M., Khan, S., Gil, J., Bruder, D., Manns, M., Schirmacher, P., Tacke, F., Ott, M., Luedde, T., Longerich, T., Kubicka, S., & Zender, L. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, 479(7374), 547–551.

Kenter, G. G., Welters, M. J. P., Valentijn, A. R. P. M., Lowik, M. J. G., Berends-van der Meer, D. M. A., Vloon, A. P. G., Essahsah, F., Fathors, L. M., Offringa, R., Drijfhout, J. W., Wafelman, A. R., Oostendorp, J., Fleuren, G. J., van der Burg, S. H., & Melief, C. J. M. (2009). Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar

- intraepithelial neoplasia. *The New England Journal of Medicine*, 361(19), 1838–1847.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., & Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 485–517.
- Kortylewski, M., Kujawski, M., Wang, T., Wei, S., Zhang, S., Pilon-Thomas, S., Niu, G., Kay, H., Mulé, J., Kerr, W. G., Jove, R., Pardoll, D., & Yu, H. (2005). Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nature Medicine*, 11(12), 1314–1321.
- Kortylewski, M., Xin, H., Kujawski, M., Lee, H., Liu, Y., Harris, T., Drake, C., Pardoll, D., & Yu, H. (2009). Regulation of the IL-23 and IL-12 balance by Stat3 signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 15(2), 114–123.
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., Yee, H., Zender, L., & Lowe, S. W. (2008). Senescence of Activated Stellate Cells Limits Liver Fibrosis. *Cell*, 134(4), 657–667.
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (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), 12072–12077.
- Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(2), 459–465.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C. J., Aarden, L. A., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2008). Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell*, 133(6), 1019–1031.
- Kumamoto, T., Huang, E. K., Paek, H. J., Morita, A., Matsue, H., Valentini, R. F., & Takashima, A. (2002). Induction of tumor-specific protective immunity by in situ Langerhans cell vaccine. *Nature Biotechnology*, 20(1), 64–69.
- Laberge, R.-M., Sun, Y., Orjalo, A. V., Patil, C. K., Freund, A., Zhou, L., Curran, S. C., Davalos, A. R., Wilson-Edell, K. A., Liu, S., Limbad, C., Demaria, M., Li, P., Hubbard, G. B., Ikeno, Y., Javors, M., Desprez, P.-Y., Benz, C. C., Kapahi, P., Nelson, P. S., & Campisi, J. (2015). mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature Cell Biology*, 17(8), 1049–1061.
- Laberge, R.-M., Zhou, L., Sarantos, M. R., Rodier, F., Freund, A., de Keizer, P. L. J., Liu, S., Demaria, M., Cong, Y.-S., Kapahi, P., Desprez, P.-Y., Hughes, R. E., & Campisi, J. (2012). Glucocorticoids suppress selected components of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell*, 11(4), 569–578.
- Labriola, L., Salatino, M., Proietti, C. J., Pecci, A., Coso, O. A., Kornblihtt, A. R., Charreau, E. H., & Elizalde, P. V. (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. *Molecular and Cellular Biology*, 23(3), 1095–1111.
- Lanari, C., Molinolo, A. A., & Pasqualini, C. D. (1986). Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice.

- Cancer Letters*, 33(2), 215–223.
- Lanzavecchia, A. (1985). Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature*, 314(6011), 537–539.
- Lauritzsen, G. F., Weiss, S., & Bogen, B. (1993). Anti-tumour activity of idiotype-specific, MHC-restricted Th1 and Th2 clones in vitro and in vivo. *Scandinavian Journal of Immunology*, 37(1), 77–85.
- Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271(5256), 1734–1736.
- Ledford, H. (2011). Melanoma drug wins US approval. *Nature*, 471(7340), e561.
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195.
- Leslie, K., Lang, C., Devgan, G., Azare, J., Berishaj, M., Gerald, W., Kim, Y. B., Paz, K., Darnell, J. E., Albanese, C., Sakamaki, T., Pestell, R., & Bromberg, J. (2006). Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Research*, 66(5), 2544–2552.
- Leung, J. Y., Wilson, H. L., Voltzke, K. J., Williams, L. A., Lee, H. J., Wobker, S. E., & Kim, W. Y. (2017). Sav1 Loss Induces Senescence and Stat3 Activation Coinciding with Tubulointerstitial Fibrosis. *Molecular and Cellular Biology*, 37(12), e00565-16.
- Lipson, E. J., Sharfman, W. H., Chen, S., McMiller, T. L., Pritchard, T. S., Salas, J. T., Sartorius-Mergenthaler, S., Freed, I., Ravi, S., Wang, H., Lubner, B., Sproul, J. D., Taube, J. M., Pardoll, D. M., & Topalian, S. L. (2015). Safety and immunologic correlates of Melanoma GVAX, a GM-CSF secreting allogeneic melanoma cell vaccine administered in the adjuvant setting. *Journal of Translational Medicine*, 13(214), 1–14.
- Liu, D., & Hornsby, P. J. (2007). Senescent Human Fibroblasts Increase the Early Growth of Xenograft Tumors via Matrix Metalloproteinase Secretion. *Cancer Research*, 67(7), 3117–3126.
- Liu, L., Nam, S., Tian, Y., Yang, F., Wu, J., Wang, Y., Scuto, A., Polychronopoulos, P., Magiatis, P., Skaltsounis, L., & Jove, R. (2011). 6-Bromoindirubin-3'-oxime inhibits JAK/STAT3 signaling and induces apoptosis of human melanoma cells. *Cancer Research*, 71(11), 3972–3979.
- Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E., & Moser, B. (1998). Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *European Journal of Immunology*, 28(11), 3696–3705.
- Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., & Moser, B. (1996). Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(1), 322–327.
- Lu, L., Zhu, F., Zhang, M., Li, Y., Drennan, A. C., Kimpara, S., Rumball, I., Selzer, C., Cameron, H., Kellicut, A., Kelm, A., Wang, F., Waldmann, T. A., & Rui, L. (2018). Gene regulation and suppression of type I interferon signaling by STAT3 in diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(3), E498–E505.

- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D., & Xia, B. (2012). CD4⁺ T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–12.
- Lujambio, A., Akkari, L., Simon, J., Grace, D., Tschaharganeh, D. F., Bolden, J. E., Zhao, Z., Thapar, V., Joyce, J. A., Krizhanovsky, V., & Lowe, S. W. (2013). Non-Cell-Autonomous Tumor Suppression by p53. *Cell*, 153(2), 449–460.
- Mace, T. A., Ameen, Z., Collins, A., Wojcik, S., Mair, M., Young, G. S., Fuchs, J. R., Eubank, T. D., Frankel, W. L., Bekaii-Saab, T., Bloomston, M., & Lesinski, G. B. (2013). Pancreatic cancer-associated stellate cells promote differentiation of myeloid-derived suppressor cells in a STAT3-dependent manner. *Cancer Research*, 73(10), 3007–3018.
- Marcus, A., Mao, A. J., Lensink-Vasan, M., Wang, L., Vance, R. E., & Raulet, D. H. (2018). Tumor-Derived cGAMP Triggers a STING-Mediated Interferon Response in Non-tumor Cells to Activate the NK Cell Response. *Immunity*, 49(4), 754–763.e4.
- Mark, A., Thompson, R., Afrasiabi, C. & Wu, C. (2018). Mygene: Access MyGene.Info_services.
- Maxmen, A. (2012). The hard facts. *Nature*, 485(7400), S50–S51.
- McGeachy, M. J., & Cua, D. J. (2008). Th17 Cell Differentiation: The Long and Winding Road. *Immunity*, 28(4), 445–453.
- Mertins, P., Mani, D. R., Ruggles, K. V., Gillette, M. A., Clauser, K. R., Wang, P., Wang, X., Qiao, J. W., Cao, S., Petralia, F., Kawaler, E., Mundt, F., Krug, K., Tu, Z., Lei, J. T., Gatza, M. L., Wilkerson, M., Perou, C. M., Yellapantula, V., Huang, K., Lin, C., McLellan, M. D., Yan, P., Davies, S. R., Townsend, R. R., Skates, S. J., Wang, J., Zhang, B., Kinsinger, C. R., Mesri, M., Rodriguez, H., Ding, L., Paulovich, A. G., Fenyö, D., Ellis, M. J., Carr, S. A., & NCI CPTAC. (2016). Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature*, 534(7605), 55–62.
- Moiseeva, O., Deschênes-Simard, X., St-Germain, E., Igelmann, S., Huot, G., Cadar, A. E., Bourdeau, V., Pollak, M. N., & Ferbeyre, G. (2013). Metformin inhibits the senescence-associated secretory phenotype by interfering with IKK/NF-κB activation. *Aging Cell*, 12(3), 489–498.
- Molavi, O., Ma, Z., Hamdy, S., Lai, R., Lavasanifar, A., & Samuel, J. (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), 506–514.
- Molinolo, A. A., Lanari, C., Charreau, E. H., Sanjuan, N., & Pasqualini, C. D. (1987). Mouse mammary tumors induced by medroxyprogesterone acetate: immunohistochemistry and hormonal receptors. *Journal of the National Cancer Institute*, 79(6), 1341–1350.
- Monjazeb, A. M., Hsiao, H.-H., Sckisel, G. D., & Murphy, W. J. (2012). The role of antigen-specific and non-specific immunotherapy in the treatment of cancer. *Journal of Immunotoxicology*, 9(3), 248–258.
- Mora, L. B., Buettner, R., Seigne, J., Diaz, J., Ahmad, N., Garcia, R., Bowman, T., Falcone, R., Fairclough, R., Cantor, A., Muro-Cacho, C., Livingston, S., Karras, J.,

- Pow-Sang, J., & Jove, R. (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*(22), 6659–6666.
- Mordoh, J., Pampena, M. B., Aris, M., Blanco, P. A., Lombardo, M., von Euw, E. M., Mac Keon, S., Yépez Crow, M., Bravo, A. I., O'Connor, J. M., Orlando, A. G., Ramello, F., Levy, E. M., & Barrio, M. M. (2017). Phase II Study of Adjuvant Immunotherapy with the CSF-470 Vaccine Plus Bacillus Calmette–Guerin Plus Recombinant Human Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor vs Medium-Dose Interferon Alpha 2B in Stages IIB, IIC, and III Cutaneous Melanoma Patie. *Frontiers in Immunology*, *8*(625), 1–15.
- Moreira, D., Adamus, T., Zhao, X., Su, Y.-L., Zhang, Z., White, S. V., Swiderski, P., Lu, X., DePinho, R. A., Pal, S. K., & Kortylewski, M. (2018). STAT3 Inhibition Combined with CpG Immunostimulation Activates Antitumor Immunity to Eradicate Genetically Distinct Castration-Resistant Prostate Cancers. *Clinical Cancer Research*, *24*(23), 5948–5962.
- Moretta, A. (2002). Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nature Reviews Immunology*, *2*(12), 957–965.
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review of Immunology*, *7*(1), 145–173.
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, *8*(12), 958–969.
- Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marión, R. M., Chondronasiou, D., Rovira, M., Fernandez-Marcos, P. J., Muñoz-Martin, M., Blanco-Aparicio, C., Pastor, J., Gómez-López, G., De Martino, A., Blasco, M. A., Abad, M., & Serrano, M. (2016). Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science*, *354*(6315), aaf4445 1-10.
- Muñoz-Espín, D., & Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *15*(7), 482–496.
- Muranski, P., & Restifo, N. P. (2009). Adoptive immunotherapy of cancer using CD4+ T cells. *Current Opinion in Immunology*, *21*(2), 200–208.
- Nagathihalli, N. S., Castellanos, J. A., Shi, C., Beesetty, Y., Reyzer, M. L., Caprioli, R., Chen, X., Walsh, A. J., Skala, M. C., Moses, H. L., & Merchant, N. B. (2015). Signal Transducer and Activator of Transcription 3, Mediated Remodeling of the Tumor Microenvironment Results in Enhanced Tumor Drug Delivery in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Gastroenterology*, *149*(7), 1932–1943.e9.
- Nagpal, J. K., Mishra, R., & Das, B. R. (2002). Activation of Stat-3 as one of the early events in tobacco chewing-mediated oral carcinogenesis. *Cancer*, *94*(9), 2393–2400.
- Narita, M., Núñez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J., & Lowe, S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, *113*(6), 703–716.
- National Cancer Institute, U. (n.d.). <https://www.cancer.gov/>.
- Newman, K. C., & Riley, E. M. (2007). Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens. *Nature Reviews Immunology*,

7(4), 279–291.

- Ning, Y., Manegold, P. C., Hong, Y. K., Zhang, W., Pohl, A., Lurje, G., Winder, T., Yang, D., LaBonte, M. J., Wilson, P. M., Ladner, R. D., & Lenz, H.-J. (2011). Interleukin-8 is associated with proliferation, migration, angiogenesis and chemosensitivity in vitro and in vivo in colon cancer cell line models. *International Journal of Cancer*, *128*(9), 2038–2049.
- Nishimura, T., Iwakabe, K., Sekimoto, M., Ohmi, Y., Yahata, T., Nakui, M., Sato, T., Habu, S., Tashiro, H., Sato, M., & Ohta, A. (1999). Distinct Role of Antigen-Specific T Helper Type 1 (Th1) and Th2 Cells in Tumor Eradication in Vivo. *Journal of Experimental Medicine*, *190*(5), 617–628.
- Niu, G., Heller, R., Catlett-Falcone, R., Coppola, D., Jaroszeski, M., Dalton, W., Jove, R., & Yu, H. (1999). Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Research*, *59*(20), 5059–5063.
- Niu, G., Wright, K. L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D., Heller, R., Ellis, L. M., Karras, J., Bromberg, J., Pardoll, D., Jove, R., & Yu, H. (2002). Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*, *21*(13), 2000–2008.
- Ohanna, M., Cheli, Y., Bonet, C., Bonazzi, V. F., Allegra, M., Giuliano, S., Bille, K., Bahadoran, P., Giaccherio, D., Lacour, J. P., Boyle, G. M., Hayward, N. F., Bertolotto, C., & Ballotti, R. (2013). Secretome from senescent melanoma engages the STAT3 pathway to favor reprogramming of naive melanoma towards a tumor-initiating cell phenotype. *Oncotarget*, *4*(12), 2212–2224.
- Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S., & Honjo, T. (2013). A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nature Immunology*, *14*(12), 1212–1218.
- Olayioye, M. A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J. M., & Hynes, N. E. (1999). ErbB receptor-induced activation of stat transcription factors is mediated by Src tyrosine kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(24), 17209–17218.
- Organización Mundial de la Salud. (n.d.). [Http://www.who.int/es/](http://www.who.int/es/).
- Ostuni, R., Kratochvill, F., Murray, P. J., & Natoli, G. (2015). Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends in Immunology*, *36*(4), 229–239.
- Pandis, N., Heim, S., Bardi, G., Limon, J., Mandahl, N., & Mitelman, F. (1992). Improved technique for short-term culture and cytogenetic analysis of human breast cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *5*(1), 14–20.
- Panopoulos, A. D., Zhang, L., Snow, J. W., Jones, D. M., Smith, A. M., El Kasmi, K. C., Liu, F., Goldsmith, M. A., Link, D. C., Murray, P. J., & Watowich, S. S. (2006). STAT3 governs distinct pathways in emergency granulopoiesis and mature neutrophils. *Blood*, *108*(12), 3682–3690.
- Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C. U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., Quackenbush, J. F., Stijleman, I. J., Palazzo, J., Marron, J. S., Nobel, A. B., Mardis, E., Nielsen, T. O., Ellis, M. J., Perou, C. M., & Bernard, P. S. (2009). Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(8), 1160–1167.

- Perez, E. A., Romond, E. H., Suman, V. J., Jeong, J.-H., Sledge, G., Geyer, C. E., Martino, S., Rastogi, P., Gralow, J., Swain, S. M., Winer, E. P., Colon-Otero, G., Davidson, N. E., Mamounas, E., Zujewski, J. A., & Wolmark, N. (2014). Trastuzumab Plus Adjuvant Chemotherapy for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer: Planned Joint Analysis of Overall Survival From NSABP B-31 and NCCTG N9831. *Journal of Clinical Oncology*, *32*(33), 3744–3752.
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797), 747–752.
- Petrova, N. V., Velichko, A. K., Razin, S. V., & Kantidze, O. L. (2016). Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell*, *15*(6), 999–1017.
- Philipp, J., Azimzadeh, O., Subramanian, V., Merl-Pham, J., Lowe, D., Hladik, D., Erbelinger, N., Ktitareva, S., Fournier, C., Atkinson, M. J., Raj, K., & Tapio, S. (2017). Radiation-Induced Endothelial Inflammation Is Transferred via the Secretome to Recipient Cells in a STAT-Mediated Process. *Journal of Proteome Research*, *16*(10), 3903–3916.
- Pouillet, P., Carpentier, S., & Barillot, E. (2007). MyProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *Proteomics*, *7*(15), 2553–2556.
- Price, F. D., von Maltzahn, J., Bentzinger, C. F., Dumont, N. A., Yin, H., Chang, N. C., Wilson, D. H., Frenette, J., & Rudnicki, M. A. (2014). Inhibition of JAK-STAT signaling stimulates adult satellite cell function. *Nature Medicine*, *20*(10), 1174–1181.
- Proietti, C. J., Rosembli, C., Beguelin, W., Rivas, M. A., Diaz Flaque, M. C., Charreau, E. H., Schillaci, R., & Elizalde, P. V. (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), 1249–1265.
- Proietti, C., Salatino, M., Rosembli, C., Carnevale, R., Pecci, A., Kornblihtt, A. R., Molinolo, A. A., Frahm, I., Charreau, E. H., Schillaci, R., & Elizalde, P. V. (2005). Progesterins 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.
- Qin, S., Rottman, J. B., Myers, P., Kassam, N., Weinblatt, M., Loetscher, M., Koch, A. E., Moser, B., & Mackay, C. R. (1998). The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *Journal of Clinical Investigation*, *101*(4), 746–754.
- Raja, J., Ludwig, J. M., Gettinger, S. N., Schalper, K. A., & Kim, H. S. (2018). Oncolytic virus immunotherapy: future prospects for oncology. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *6*(140), 1–13.
- Rakhra, K., Bachireddy, P., Zabuawala, T., Zeiser, R., Xu, L., Kopelman, A., Fan, A. C., Yang, Q., Braunstein, L., Crosby, E., Ryeom, S., & Felsher, D. W. (2010). CD4(+) T cells contribute to the remodeling of the microenvironment required for sustained tumor regression upon oncogene inactivation. *Cancer Cell*, *18*(5), 485–498.

- Reichman, H., Karo-Atar, D., & Munitz, A. (2016). Emerging Roles for Eosinophils in the Tumor Microenvironment. *Trends in Cancer*, 2(11), 664–675.
- Ren, Y., Yu, K., Sun, S., Li, Z., Yuan, J., Han, X. D., Shi, J., & Zhen, L. (2014). JSI124 inhibits breast cancer cell growth by suppressing the function of B cells via the downregulation of signal transducer and activator of transcription 3. *Oncology Letters*, 8(2), 928–932.
- Ren, Z., & Schaefer, T. S. (2002). ErbB-2 Activates Stat3 α in a Src- and JAK2-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38486–38493.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47–e47.
- Ritschka, B., Storer, M., Mas, A., Heinzmann, F., Ortells, M. C., Morton, J. P., Sansom, O. J., Zender, L., & Keyes, W. M. (2017). The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes & Development*, 31(2), 172–183.
- Rivas, M. A., Venturutti, L., Huang, Y.-W., Schillaci, R., Huang, T. H.-M., & Elizalde, P. V. (2012). Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progesterin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development. *Breast Cancer Research*, 14(R77), 1–20.
- Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J. J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T. S., Miller, M. L., Rekhtman, N., Moreira, A. L., Ibrahim, F., Bruggeman, C., Gasmi, B., Zappasodi, R., Maeda, Y., Sander, C., Garon, E. B., Merghoub, T., Wolchok, J. D., Schumacher, T. N., & Chan, T. A. (2015). Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*, 348(6230), 124–128.
- Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., Weber, J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J.-F., Testori, A., Grob, J.-J., Davidson, N., Richards, J., Maio, M., Hauschild, A., Miller, W. H., Gascon, P., Lotem, M., Harmankaya, K., Ibrahim, R., Francis, S., Chen, T.-T., Humphrey, R., Hoos, A., & Wolchok, J. D. (2011). Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 364(26), 2517–2526.
- Rodier, F., Coppé, J.-P., Patil, C. K., Hoeijmakers, W. A. M., Muñoz, D. P., Raza, S. R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A. R., & Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nature Cell Biology*, 11(8), 973–979.
- Roos, C. M., Zhang, B., Palmer, A. K., Ogrodnik, M. B., Pirtskhalava, T., Thalji, N. M., Hagler, M., Jurk, D., Smith, L. A., Casacang-Verzosa, G., Zhu, Y., Schafer, M. J., Tchkonja, T., Kirkland, J. L., & Miller, J. D. (2016). Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell*, 15(5), 973–977.
- Rosenberg, S. A., Packard, B. S., Aebersold, P. M., Solomon, D., Topalian, S. L., Toy, S. T., Simon, P., Lotze, M. T., Yang, J. C., Seipp, C. A., Simpson, C., Carter, C., Bock, S., Schwartzentruber, D., Wei, J. P., & White, D. E. (1988). Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 319(25), 1676–1680.
- Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A., & Dudley, M. E. (2008).

- Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 8(4), 299–308.
- Rosenberg, S. A., Spiess, P., & Lafreniere, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 233(4770), 1318–1321.
- Roszik, J., Haydu, L. E., Hess, K. R., Oba, J., Joon, A. Y., Siroy, A. E., Karpinets, T. V., Stingo, F. C., Baladandayuthapani, V., Tetzlaff, M. T., Wargo, J. A., Chen, K., Forget, M.-A., Haymaker, C. L., Chen, J. Q., Meric-Bernstam, F., Eterovic, A. K., Shaw, K. R., Mills, G. B., Gershenwald, J. E., Radvanyi, L. G., Hwu, P., Futreal, P. A., Gibbons, D. L., Lazar, A. J., Bernatchez, C., Davies, M. A., & Woodman, S. E. (2016). Novel algorithmic approach predicts tumor mutation load and correlates with immunotherapy clinical outcomes using a defined gene mutation set. *BMC Medicine*, 14(168), 1–8.
- Rot, A., Krieger, M., Brunner, T., Bischoff, S. C., Schall, T. J., & Dahinden, C. A. (1992). RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(6), 1489–1495.
- Ruhland, M. K., Loza, A. J., Capietto, A.-H., Luo, X., Knolhoff, B. L., Flanagan, K. C., Belt, B. A., Alspach, E., Leahy, K., Luo, J., Schaffer, A., Edwards, J. R., Longmore, G., Faccio, R., DeNardo, D. G., & Stewart, S. A. (2016). Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis. *Nature Communications*, 7(11762), 1–18.
- Ruscetti, M., Leibold, J., Bott, M. J., Fennell, M., Kulick, A., Salgado, N. R., Chen, C.-C., Ho, Y., Sanchez-Rivera, F. J., Feucht, J., Baslan, T., Tian, S., Chen, H.-A., Romesser, P. B., Poirier, J. T., Rudin, C. M., de Stanchina, E., Machado, E., Sherr, C. J., & Lowe, S. W. (2018). NK cell-mediated cytotoxicity contributes to tumor control by a cytostatic drug combination. *Science*, 362(6421), 1416–1422.
- Ryu, S. J., Oh, Y. S., & Park, S. C. (2007). Failure of stress-induced downregulation of Bcl-2 contributes to apoptosis resistance in senescent human diploid fibroblasts. *Cell Death and Differentiation*, 14(5), 1020–1028.
- Sadaie, M., Salama, R., Carroll, T., Tomimatsu, K., Chandra, T., Young, A. R. J., Narita, M., Pérez-Mancera, P. A., Bennett, D. C., Chong, H., Kimura, H., & Narita, M. (2013). Redistribution of the Lamin B1 genomic binding profile affects rearrangement of heterochromatic domains and SAHF formation during senescence. *Genes & Development*, 27(16), 1800–1808.
- Sagiv, A., Burton, D. G. A., Moshayev, Z., Vadai, E., Wensveen, F., Ben-Dor, S., Golani, O., Polic, B., & Krizhanovsky, V. (2016). NKG2D ligands mediate immunosurveillance of senescent cells. *Aging*, 8(2), 328–344.
- Sagiv, A., & Krizhanovsky, V. (2013). Immunosurveillance of senescent cells: the bright side of the senescence program. *Biogerontology*, 14(6), 617–628.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., & Takahashi, T. (2001). Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological Reviews*, 182, 18–32.
- Salatino, M., Schillaci, R., Proietti, C. J., Carnevale, R., Frahm, I., Molinolo, A. A.,

- Iribarren, A., Charreau, E. H., & Elizalde, P. V. (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 activity. *Oncogene*, 23(30), 5161–5174.
- Sallusto, F. (2016). Heterogeneity of Human CD4⁺ T Cells Against Microbes. *Annual Review of Immunology*, 34(1), 317–334.
- Sallusto, F., Geginat, J., & Lanzavecchia, A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annual Review of Immunology*, 22(1), 745–763.
- Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R., & Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(6), 875–883.
- Sanders, Y. Y., Liu, H., Zhang, X., Hecker, L., Bernard, K., Desai, L., Liu, G., & Thannickal, V. J. (2013). Histone Modifications in Senescence-Associated Resistance to Apoptosis by Oxidative Stress. *Redox Biology*, 1(1), 8–16.
- Schafer, M. J., White, T. A., Iijima, K., Haak, A. J., Ligresti, G., Atkinson, E. J., Oberg, A. L., Birch, J., Salmonowicz, H., Zhu, Y., Mazula, D. L., Brooks, R. W., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Pirtskhalava, T., Prakash, Y. S., Tchkonja, T., Robbins, P. D., Aubry, M. C., Passos, J. F., Kirkland, J. L., Tschumperlin, D. J., Kita, H., & LeBrasseur, N. K. (2017). Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nature Communications*, 8(14532), 1–11.
- Schall, T. J., Bacon, K., Toy, K. J., & Goeddel, D. V. (1990). Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature*, 347(6294), 669–671.
- Schmetterer, K. G., Neunkirchner, A., Wojta-Stremayr, D., Leitner, J., Steinberger, P., & Pickl, W. F. (2015). STAT3 governs hyporesponsiveness and granzyme B-dependent suppressive capacity in human CD4⁺ T cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(3), 759–771.
- Schmid, P., Adams, S., Rugo, H. S., Schneeweiss, A., Barrios, C. H., Iwata, H., Diéras, V., Hegg, R., Im, S.-A., Shaw Wright, G., Henschel, V., Molinero, L., Chui, S. Y., Funke, R., Husain, A., Winer, E. P., Loi, S., Emens, L. A., & IMpassion130 Trial Investigators. (2018). Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 379(22), 2108–2121.
- Schmidt, A., Oberle, N., & Krammer, P. H. (2012). Molecular Mechanisms of Treg-Mediated T Cell Suppression. *Frontiers in Immunology*, 3(51), 1–20.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6024), 1565–1570.
- Scott, A. M., Allison, J. P., & Wolchok, J. D. (2012). Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer Immunity*, 12(14), 1–8.

- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, *88*(5), 593–602.
- Shachaf, C. M., Kopelman, A. M., Arvanitis, C., Karlsson, A., Beer, S., Mandl, S., Bachmann, M. H., Borowsky, A. D., Ruebner, B., Cardiff, R. D., Yang, Q., Bishop, J. M., Contag, C. H., & Felsher, D. W. (2004). MYC inactivation uncovers pluripotent differentiation and tumour dormancy in hepatocellular cancer. *Nature*, *431*(7012), 1112–1117.
- Shamma, A., Takegami, Y., Miki, T., Kitajima, S., Noda, M., Obara, T., Okamoto, T., & Takahashi, C. (2009). Rb Regulates DNA Damage Response and Cellular Senescence through E2F-Dependent Suppression of N-Ras Isoprenylation. *Cancer Cell*, *15*(4), 255–269.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, *410*(6832), 1107–1111.
- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., & Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, *168*(4), 707–723.
- Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Reviews Cancer*, *15*(7), 397–408.
- Shelton, D. N., Chang, E., Whittier, P. S., Choi, D., & Funk, W. D. (1999). Microarray analysis of replicative senescence. *Current Biology : CB*, *9*(17), 939–945.
- Shiloh, Y. (2006). The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends in Biochemical Sciences*, *31*(7), 402–410.
- Shuai, K. (2000). Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene*, *19*(21), 2638–2644.
- Silva, C. M. (2004). Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene*, *23*(48), 8017–8023.
- Silvennoinen, O., Schindler, C., Schlessinger, J., & Levy, D. E. (1993). Ras-independent growth factor signaling by transcription factor tyrosine phosphorylation. *Science*, *261*(5129), 1736–1739.
- Simms, P. E., & Ellis, T. M. (1996). Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, *3*(3), 301–304.
- Sirkisoon, S. R., Carpenter, R. L., Rimkus, T., Anderson, A., Harrison, A., Lange, A. M., Jin, G., Watabe, K., & Lo, H.-W. (2018). Interaction between STAT3 and GLI1/tGLI1 oncogenic transcription factors promotes the aggressiveness of triple-negative breast cancers and HER2-enriched breast cancer. *Oncogene*, *37*(19), 2502–2514.
- Smith, A. J., Oertle, J., Warren, D., & Prato, D. (2016). Chimeric antigen receptor (CAR) T cell therapy for malignant cancers: Summary and perspective. *Journal of Cellular Immunotherapy*, *2*(2), 59–68.
- Speiser, D. E., Ho, P.-C., & Verdeil, G. (2016). Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nature Reviews Immunology*, *16*(10), 599–611.

- 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. *Nature Medicine*, *13*(2), 139–145.
- Sui, Q., Zhang, J., Sun, X., Zhang, C., Han, Q., & Tian, Z. (2014). NK cells are the crucial antitumor mediators when STAT3-mediated immunosuppression is blocked in hepatocellular carcinoma. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *193*(4), 2016–2023.
- Taga, T., & Kishimoto, T. (1997). Gp 130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annual Review of Immunology*, *15*(1), 797–819.
- Taube, J. M., Klein, A., Brahmer, J. R., Xu, H., Pan, X., Kim, J. H., Chen, L., Pardoll, D. M., Topalian, S. L., & Anders, R. A. (2014). Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *20*(19), 5064–5074.
- Tell, R. W., & Horvath, C. M. (2014). Bioinformatic analysis reveals a pattern of STAT3-associated gene expression specific to basal-like breast cancers in human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(35), 12787–12792.
- Tkach, M., Coria, L., Rosemblyt, C., Rivas, M. A., Proietti, C. J., Diaz Flaque, M. C., Beguelin, W., Frahm, I., Charreau, E. H., Cassataro, J., Elizalde, P. V., & Schillaci, R. (2012). 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. *The Journal of Immunology*, *189*(3), 1162–1172.
- Toso, A., Revandkar, A., Di Mitri, D., Guccini, I., Proietti, M., Sarti, M., Pinton, S., Zhang, J., Kalathur, M., Civenni, G., Jarrossay, D., Montani, E., Marini, C., Garcia-Escudero, R., Scanziani, E., Grassi, F., Pandolfi, P. P., Catapano, C. V., & Alimonti, A. (2014). Enhancing Chemotherapy Efficacy in Pten -Deficient Prostate Tumors by Activating the Senescence-Associated Antitumor Immunity. *Cell Reports*, *9*(1), 75–89.
- Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J. M., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., West, A. N., Carmona, M., Kivork, C., Seja, E., Cherry, G., Gutierrez, A. J., Grogan, T. R., Mateus, C., Tomasic, G., Glaspy, J. A., Emerson, R. O., Robins, H., Pierce, R. H., Elashoff, D. A., Robert, C., & Ribas, A. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, *515*(7528), 568–571.
- Van Allen, E. M., Miao, D., Schilling, B., Shukla, S. A., Blank, C., Zimmer, L., Sucker, A., Hillen, U., Geukes Foppen, M. H., Goldinger, S. M., Utikal, J., Hassel, J. C., Weide, B., Kaehler, K. C., Loquai, C., Mohr, P., Gutzmer, R., Dummer, R., Gabriel, S., Wu, C. J., Schadendorf, D., & Garraway, L. A. (2015). Genomic correlates of response to CTLA-4 blockade in metastatic melanoma. *Science*, *350*(6257), 207–211.
- van Tuyn, J., Jaber-Hijazi, F., MacKenzie, D., Cole, J. J., Mann, E., Pawlikowski, J. S., Rai, T. S., Nelson, D. M., McBryan, T., Ivanov, A., Blyth, K., Wu, H., Milling, S., & Adams, P. D. (2017). Oncogene-Expressing Senescent Melanocytes Up-Regulate MHC Class II, a Candidate Melanoma Suppressor Function. *The Journal of Investigative Dermatology*, *137*(10), 2197–2207.

- Vasquez-Dunddel, D., Pan, F., Zeng, Q., Gorbounov, M., Albesiano, E., Fu, J., Blosser, R. L., Tam, A. J., Bruno, T., Zhang, H., Pardoll, D., & Kim, Y. (2013). STAT3 regulates arginase-I in myeloid-derived suppressor cells from cancer patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(4), 1580–1589.
- Vizioli, M. G., Santos, J., Pilotti, S., Mazzoni, M., Anania, M. C., Miranda, C., Pagliardini, S., Pierotti, M. A., Gil, J., Greco, A., Vizioli, M. G., Santos, J., Pilotti, S., Mazzoni, M., Anania, M. C., Miranda, C., Pagliardini, S., Pierotti, M. A., Gil, J., & Greco, A. (2014). Oncogenic <i>RAS</i>-induced senescence in human primary thyrocytes: molecular effectors and inflammatory secretome involved. *Oncotarget*, 5(18), 8270–8283.
- von Euw, E. M., Barrio, M. M., Furman, D., Levy, E. M., Bianchini, M., Peguillet, I., Lantz, O., Vellice, A., Kohan, A., Chacón, M., Yee, C., Wainstok, R., & Mordoh, J. (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 disease. *Journal of Translational Medicine*, 6(6), 1–14.
- Wallden, B., Storhoff, J., Nielsen, T., Dowidar, N., Schaper, C., Ferree, S., Liu, S., Leung, S., Geiss, G., Snider, J., Vickery, T., Davies, S. R., Mardis, E. R., Gnant, M., Sestak, I., Ellis, M. J., Perou, C. M., Bernard, P. S., & Parker, J. S. (2015). Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay. *BMC Medical Genomics*, 8(1), 54.
- Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabilovich, D., Heller, R., Coppola, D., Dalton, W., Jove, R., Pardoll, D., & Yu, H. (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nature Medicine*, 10(1), 48–54.
- Wang, W.-B., Levy, D. E., & Lee, C.-K. (2011). STAT3 Negatively Regulates Type I IFN-Mediated Antiviral Response. *The Journal of Immunology*, 187(5), 2578–2585.
- Waters, D. W., Blokland, K. E. C., Pathinayake, P. S., Wei, L., Schuliga, M., Jaffar, J., Westall, G. P., Hansbro, P. M., Prele, C. M., Mutsaers, S. E., Bartlett, N. W., Burgess, J. K., Grainge, C. L., & Knight, D. A. (2019). STAT3 Regulates the Onset of Oxidant-Induced Senescence in Lung Fibroblasts. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 03280C, 1–45.
- Watson, C. J. (2001). Stat transcription factors in mammary gland development and tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 6(1), 115–127.
- Wei, L., Jin, Z., Yang, S., Xu, Y., Zhu, Y., & Ji, Y. (2018). TCGA-assembler 2: software pipeline for retrieval and processing of TCGA/CPTAC data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 34(9), 1615–1617.
- Weinstein, I. B. (2002). CANCER: Enhanced: Addiction to Oncogenes--the Achilles Heal of Cancer. *Science*, 297(5578), 63–64.
- Weinstein, J. N., Collisson, E. A., Mills, G. B., Shaw, K. R. M., Ozenberger, B. A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., Stuart, J. M., & Stuart, J. M. (2013). The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nature Genetics*, 45(10), 1113–1120.
- Welte, T., Zhang, S. S. M., Wang, T., Zhang, Z., Hesslein, D. G. T., Yin, Z., Kano, A., Iwamoto, Y., Li, E., Craft, J. E., Bothwell, A. L. M., Fikrig, E., Koni, P. A., Flavell,

- R. A., & Fu, X.-Y. (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*, *100*(4), 1879–1884.
- Wiśniewski, J. R., Zougman, A., & Mann, M. (2009). Combination of FASP and StageTip-Based Fractionation Allows In-Depth Analysis of the Hippocampal Membrane Proteome. *Journal of Proteome Research*, *8*(12), 5674–5678.
- Woessner, Richard Mccoon, P. E., Lyne, P. D., & Astrazeneca. (2014). Combination WO2016062722A1.
- Wölfle, S. J., Strebovsky, J., Bartz, H., Sähr, A., Arnold, C., Kaiser, C., Dalpke, A. H., & Heeg, K. (2011). PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *European Journal of Immunology*, *41*(2), 413–424.
- Wu, C.-H., van Riggelen, J., Yetil, A., Fan, A. C., Bachireddy, P., & Felsher, D. W. (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), 13028–13033.
- Xu, L. L., Warren, M. K., Rose, W. L., Gong, W., & Wang, J. M. (1996). Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, *60*(3), 365–371.
- Xu, M., Tchkonina, T., Ding, H., Ogrodnik, M., Lubbers, E. R., Pirtskhalava, T., White, T. A., Johnson, K. O., Stout, M. B., Mezera, V., Giorgadze, N., Jensen, M. D., LeBrasseur, N. K., & Kirkland, J. L. (2015). JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(46), E6301-10.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R. A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., & Lowe, S. W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, *445*(7128), 656–660.
- Yang, H., Wang, H., Ren, J., Chen, Q., & Chen, Z. J. (2017). CGAS is essential for cellular senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(23), E4612–E4620.
- Yang, H., Yamazaki, T., Pietrocola, F., Zhou, H., Zitvogel, L., Ma, Y., & Kroemer, G. (2015). STAT3 Inhibition Enhances the Therapeutic Efficacy of Immunogenic Chemotherapy by Stimulating Type 1 Interferon Production by Cancer Cells. *Cancer Research*, *75*(18), 3812–3822.
- Yang, L., Fang, J., & Chen, J. (2017). Tumor cell senescence response produces aggressive variants. *Cell Death Discovery*, *3*, e17049.
- Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahar, E., Condiotti, R., Ben-Porath, I., & Krizhanovsky, V. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature Communications*, *7*(11190), 1–11.
- Younos, I., Donkor, M., Hoke, T., Dafferner, A., Samson, H., Westphal, S., & Talmadge, J. (2011). Tumor- and organ-dependent infiltration by myeloid-derived suppressor cells. *International Immunopharmacology*, *11*(7), 816–826.

- Yu, H., & Jove, R. (2004). The STATs of cancer — new molecular targets come of age. *Nature Reviews Cancer*, 4(2), 97–105.
- Yu, H., Kortylewski, M., & Pardoll, D. (2007). Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*, 7(1), 41–51.
- Yu, Y.-C., Yang, P.-M., Chuah, Q.-Y., Huang, Y.-H., Peng, C.-W., Lee, Y.-J., & Chiu, S.-J. (2013). Radiation-induced senescence in securin-deficient cancer cells promotes cell invasion involving the IL-6/STAT3 and PDGF-BB/PDGFR pathways. *Scientific Reports*, 3(1675), 1–11.
- Yue, C., Shen, S., Deng, J., Priceman, S. J., Li, W., Huang, A., & Yu, H. (2015). STAT3 in CD8+ T Cells Inhibits Their Tumor Accumulation by Downregulating CXCR3/CXCL10 Axis. *Cancer Immunology Research*, 3(8), 864–870.
- Yun, M. H., Davaapil, H., & Brockes, J. P. (2015). Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. *ELife*, 4, e05505.
- Yun, U. J., Park, S. E., Jo, Y. S., Kim, J., & Shin, D. Y. (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), 155–160.
- Zacarias-Fluck, M. F., Morancho, B., Vicario, R., Luque Garcia, A., Escorihuela, M., Villanueva, J., Rubio, I. T., & Arribas, J. (2015). Effect of cellular senescence on the growth of HER2-positive breast cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(5), edjv020.
- Zhang, N., & Bevan, M. J. (2011). CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*, 35(2), 161–168.
- Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., & Bishop, J. M. (1998). Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes & Development*, 12(19), 2997–3007.
- Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annual Review of Immunology*, 28(1), 445–489.
- Zhu, Y., Tchkonja, T., Pirtskhalava, T., Gower, A. C., Ding, H., Giorgadze, N., Palmer, A. K., Ikeno, Y., Hubbard, G. B., Lenburg, M., O'Hara, S. P., LaRusso, N. F., Miller, J. D., Roos, C. M., Verzosa, G. C., LeBrasseur, N. K., Wren, J. D., Farr, J. N., Khosla, S., Stout, M. B., McGowan, S. J., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Gurkar, A. U., Zhao, J., Colangelo, D., Dorronsoro, A., Ling, Y. Y., Barghouthy, A. S., Navarro, D. C., Sano, T., Robbins, P. D., Niedernhofer, L. J., & Kirkland, J. L. (2015). The Achilles' heel of senescent cells: from transcriptome to senolytic drugs. *Aging Cell*, 14(4), 644–658.
- Ziblat, A., Nuñez, S. Y., Raffo Iraolagoitia, X. L., Spallanzani, R. G., Torres, N. I., Sierra, J. M., Secchiari, F., Domaica, C. I., Fuertes, M. B., & Zwirner, N. W. (2017). Interleukin (IL)-23 Stimulates IFN- γ Secretion by CD56bright Natural Killer Cells and Enhances IL-18-Driven Dendritic Cells Activation. *Frontiers in Immunology*, 8, 1959.
- Ziegler, S. F., Ramsdell, F., Hjerrild, K. A., Armitage, R. J., Grabstein, K. H., Hennen, K. B., Farrah, T., Fanslow, W. C., Shevach, E. M., & Alderson, M. R. (1993). Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. *European Journal of Immunology*, 23(7), 1643–1648.

- Zitvogel, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Smyth, M. J., & Kroemer, G. (2015). Type I interferons in anticancer immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 15(7), 405–414.
- Zou, W., Wolchok, J. D., & Chen, L. (2016). PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Science Translational Medicine*, 8(328), 1–34.