



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Carrera Biología

Laboratorio de Oncología Celular

Expresión de Interleucina-15 y su receptor IL-15R  
en líneas celulares de Cáncer cervical

T E S I S

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta:

ESCOBAR CONTRERAS JORGE

Director de Tesis:

Dr. Leonardo Trujillo Cirilo



México, CDMX, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

A mi padre de quien he aprendido todo lo que se y siempre me ha apoyado en todo momento, sin el esto no hubiera sido posible, gracias por tu infinito amor y apoyo.

A mi madre quien siempre me brindo todo su amor, acompañamiento y apoyo para llegar hasta el final, sin ti esto no hubiera sido posible, gracias por todo.

A mis hermanos Leopoldo, Reynalda y Yuliana quienes siempre me apoyaron en cualquier circunstancia, estando para mí en todo momento, los amo, muchas gracias.

A mis amigos Edgar, Mario, Fernando y paloma quienes estuvieron en todo este camino desde el principio, gracias por cada risa, cada convivencia, pero sobre todo por su amistad incondicional, gracias.

## *AGRADECIEMTOS*

A la Dra. Rosalva Rangel Corona por aceptarme dentro de su proyecto de trabajo, así como brindarme todo su conocimiento, apoyo y tiempo, gracias por la confianza brindada

Al Dr. Leonardo Trujillo Cirilo por todo el conocimiento que me aportó durante toda mi estancia, así como el apoyo y el tiempo en este proyecto, gracias por la confianza, paciencia y dedicación que me brindó

Al M. en C. Edgar Iván Torres Corioriles por sus aportaciones a este trabajo, así como compartir su conocimiento conmigo, muchas gracias

A la Dra. María Teresa Corona Ortega y a la M. en C. Reynalda Roldán Pérez por sus aportaciones a este trabajo, muchas gracias

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular L-4 PB de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, bajo la dirección del Dr. Leonardo Trujillo Cirilo y la asesoría de la Dr. Rosalva Rangel Corona. Este trabajo conto con el apoyo financiero del programa PAPIIT de la DGAPA, clave del proyecto PAPIIT IN-222721

## Índice:

1. Resumen	7
2. Introducción	8
3. Marco teórico	9
3.1 Cáncer	9
3.2 Cáncer cervical	12
3.3 Citocinas	16
3.4 Interleucina-15	17
4. Antecedentes directos	22
5. Justificación	24
6. Hipótesis	25
7. Objetivo general	26
8. Objetivos particulares	26
9. Materiales y método	27
9.1 Cultivo celular	27
9.2 Extracción de ARN de líneas celulares de cáncer cervical	27
9.3 Cuantificación de ARN de líneas celulares de cáncer cervical	27
9.4 Gel de integridad de ARN	28
9.5 RT de líneas celulares de cáncer cervical	28
9.6 PCR y electroforesis en líneas celulares de cáncer cervical	28

10. Resultados	31
10.1. Integridad de ARN de líneas celulares de cáncer cervical.	31
10.2. Expresión de Interleucina-15 y su receptor IL-15R en Linfocitos como control positivo de expresión génica	32
10.3. Líneas celulares de cáncer cervical expresan IL-15	33
10.4. Líneas celulares de cáncer cervical expresan IL-15R $\alpha$	34
10.5. Líneas celulares de cáncer cervical expresan IL-15R $\beta$ y $\gamma$ c	35
10.6. Líneas celulares de cáncer cervical sobre expresan IL-15 en comparación de linfocitos	38
10.7. Líneas celulares de cáncer cervical sobre expresan IL-15R $\alpha$ en comparación de linfocitos	39
11. Discusión	42
12. Conclusiones	46
13. Perspectivas	47
14. Referencias	48

## 1. Resumen.

Uno de los cánceres con mayor incidencia y mortalidad en México es el cáncer cervical (CC), el cual se desarrolla por infecciones recurrentes del Virus del Papiloma Humano (VPH). A pesar de que el VPH es el principal factor de riesgo para el desarrollo de CC, se requieren factores adicionales durante el proceso carcinogénico para consolidar un tumor. El microambiente tumoral es uno de los factores que contribuye al desarrollo tumoral, las citocinas que están presentes en el microambiente permiten la comunicación entre las células tumorales y células no tumorales. Una de las citocinas que desempeña un papel importante durante la respuesta inmune es la Interleucina-15 (IL-15), esta desencadena sus efectos biológicos después de su interacción con su receptor IL-15R. Se ha reportado que la IL-15 tiene un papel pro-tumorigénico en diferentes tipos de cáncer, sin embargo, en el CC aun no queda claro si contribuye al desarrollo tumoral. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que las células de CC expresan el receptor de IL-2 (IL-2R) y la estimulación con IL-2 exógena promueve la proliferación de las células tumorales. Se ha descrito que la IL-15 e IL-2 desempeñan procesos similares en la respuesta inmune y comparten cadenas de su receptor, por lo que, la estrecha relación entre ambas citocinas y sus receptores nos sugiere que ambas tienen un papel importante en desarrollo tumoral. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar la expresión de IL-15 y su receptor IL-15R en diferentes líneas celulares de CC. Para lograr nuestro objetivo se obtuvo el ARN de las líneas celulares HeLa, SiHa, CaSki e INBL, y mediante la técnica de RT-PCR se analizó la expresión de IL-15 y las diferentes subunidades del IL-15R. Los resultados de este trabajo demuestran que las líneas celulares de CC expresan la IL-15 de manera basal y que sus niveles de expresión son superiores a los linfocitos. De manera general se observa una mayor expresión de IL-15 e IL-15R $\alpha$  en las líneas celulares de CC en comparación de los linfocitos. La expresión de IL-15 y su receptor en las células de CC nos sugiere que desempeña un papel importante en el desarrollo tumoral.



## 2. Introducción.

Uno de los factores determinantes para el desarrollo neoplásico es el microambiente tumoral, las citocinas del microambiente permiten la comunicación entre las células tumorales y las células del sistema inmune. Para que las células tumorales puedan responder a las citocinas del microambiente deben expresar los receptores correspondientes a las citocinas. Se ha demostrado que líneas celulares de cáncer cervical (CC) expresan la Interleucina-2 (IL-2) y su receptor IL-2R, además, la estimulación con IL-2 exógena promueve su proliferación. Por su parte, la Interleucina-15 (IL-15) es una citocina que sinergiza en diferentes funciones biológicas con IL-2, como son la proliferación, activación y diferenciación de células del sistema inmune. Además, el receptor de IL-15 (IL-15R) comparte la subunidad  $\beta$  con el IL-2R, y también activa la vía de señalización JAK/STAT.

Debido a la estrecha relación entre ambas citocinas, en este trabajo se analizó la expresión de IL-15 y su receptor IL-15R en diferentes líneas celulares de CC, lo que nos permitirá determinar el posible papel de esta citocina en la carcinogénesis cervical, así como su posible uso como marcador tumoral o blanco terapéutico.

### 3. Marco teórico.

#### 3.1 Cáncer.

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación de células de manera descontrolada que puede aparecer prácticamente en cualquier parte del cuerpo, alterando los mecanismos de homeostasis celular donde las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir y las células nuevas se forman cuando no son necesarias (OMS 2018).

Se han descrito diferentes características distintivas del cáncer que contribuyen al desarrollo y mantenimiento de los tumores, como son, alteraciones en los mecanismos de control de la proliferación y homeostasis (Douglas Hanahan 2000), autosuficiencia en las señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitoras del crecimiento (anticrecimiento), evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis, invasión, metástasis (Douglas Hanahan 2000), reprogramación del metabolismo energético, evasión de la respuesta inmune, inestabilidad del genoma e inflamación (Douglas Hanahan 2000) (Fig. 1). Cada una de las características antes mencionadas se presenta en diferentes etapas del desarrollo tumoral, desde una lesión precancerosa hasta un tumor sólido y la metástasis (Douglas Hanahan 2000).

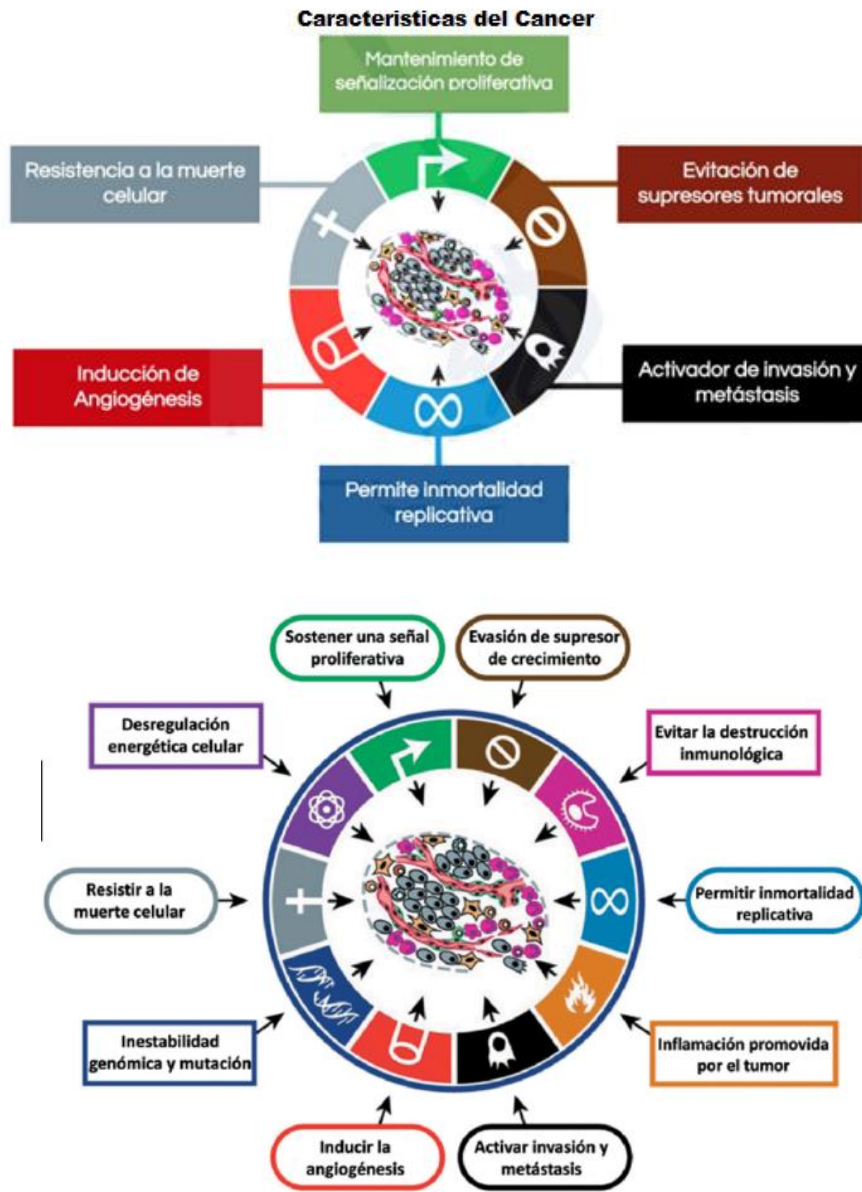


Fig.1. Representación en diagrama de la primera descripción de las características distintivas del cáncer (hallmarks) en 2001 con la actualización y postulación de 4 nuevas características en el 2011 por los mismos autores Hanahan D y Weinber.

Los cánceres se originan por alteraciones genéticas, tomando como punto de partida la expresión, sobreexpresión o baja expresión de genes que normalmente regulan procesos esenciales en las células como la división celular y supervivencia. Los proto-oncogenes son genes que se asocian al desarrollo de tumores, (Heidi Chial 2008) y se clasifican como oncogenes (OCG) o genes supresores de tumores (TSG) dependiendo si promueven o inhiben el desarrollo tumoral (Murali Dharan 2019).

Los oncogenes por lo general presentan mutaciones recurrentes en posiciones específicas denominadas puntos calientes “hot-spots”, generando una ganancia de función (Murali Dharan 2019). Por su parte, los genes supresores de tumores presentan mutaciones que generan una pérdida de función (Murali Dharan 2019). Las alteraciones genéticas en los oncogenes y genes supresores de tumores se pueden dar por factores físicos (radiaciones ultra violeta o ionizantes), químicos (aerosoles, tabaco y compuestos diversos), pre-disposiciones genéticas y biológicos como bacterias y virus (Heidi Chial 2008).

El 12,1% de los cánceres humanos se asocian a los virus (Adalucy Álvarez 2012), es importante mencionar que, de los siete principales virus oncogénicos, dos actúan como carcinógenos indirectos vía inflamación crónica: el Virus de Hepatitis B (VHB) y el Virus de Hepatitis C (VHC). El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) actúa como carcinógeno indirecto vía inmunosupresión crónica (Adalucy Álvarez 2012) y los cuatro restantes actúan como carcinógenos directos: el Virus linfotrópico de células T Humanas (HTLV-I), Virus de Epstein-Barr (VEB), Virus de Herpes Humano 8 (VHH8/VHKS) y el Virus de Papiloma

Humano (VPH). El VPH se encuentra en el 95% del CC, demostrando una estrecha relación del VPH con el desarrollo de esta neoplasia (Martha Eugenia 2012).

### 3.2 Cáncer cervical.

El cáncer cervical (CC) es una enfermedad que se desarrolla por infecciones recurrentes del Virus del Papiloma Humano (VPH) en la zona de transformación (unión escamo-columnar) del cuello uterino (Raffaella Ghittoni 2010). El CC tienen una patogenia distinta a los cánceres no virales debido al material genómico y las proteínas del virus (Brittany Holmes 2019).

Se han identificado más de 200 tipos de VPH, algunos son causantes de las verrugas comunes que crecen en manos y pies. Sin embargo, algunos VPH se asocian a genitales pudiendo dar origen a procesos neoplásicos. Existen VPHs que se han catalogado como de alto riesgo para el desarrollo de CC, como son el VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66 (Fig. 2) (Adalucy Álvarez 2012).

### Tipos de VPH



Fig.2. **Clasificación de los VPH.** Los diferentes VPH se clasifican en base a su potencial carcinogénico, algunos están catalogados como de alto o bajo riesgo oncogénico.

Dentro de los VPH de alto riesgo los tipos virales 16 y 18 son los más frecuentes en el CC, en países en vías de desarrollo se encuentran en el 50% y el 20% de los tumores respectivamente (Raffaella Ghittoni 2010). El VPH infecta las células epiteliales basales del cérvix mediante dos proteínas que se encuentran en su cápside viral, la proteína L1 (mayor) de 55 kDa que representa el 80% de la cápside, y la proteína L2 (menor) de 74 kDa (Adalucy Álvarez 2012).

Para iniciar la transformación de las células infectadas, el VPH necesita la expresión de sus proteínas. El genoma del VPH presenta un promotor temprano que controla la expresión de transcritos policistrónicos que codifican las proteínas virales E6, E7, E1, E2, E4 y E5 (Fig.3). También presenta un promotor tardío, que dirige la expresión de los transcritos que codifican las proteínas E1, E4, E5, L1 y L2. Estos promotores se activan durante la diferenciación de las células que son infectadas por el VPH. (Adalucy Álvarez 2012).

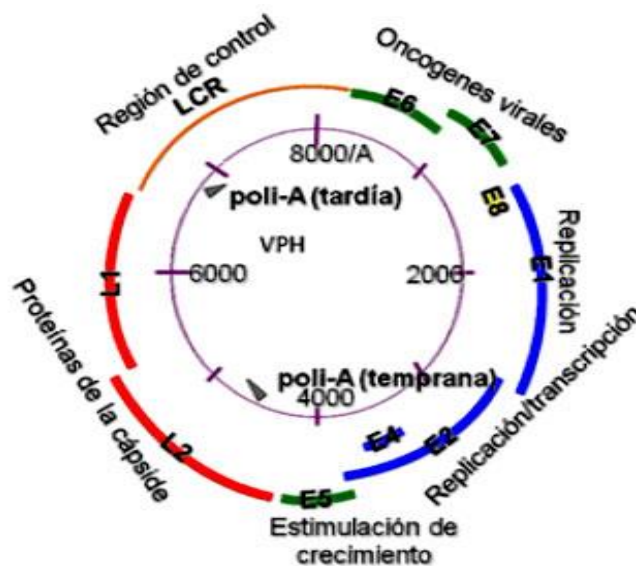


Fig.3. Imagen que representa el genoma del VPH con sus diferentes genes virales que interfieren en la transformación de las células infectadas

Después de una infección por el VPH las células infectadas activan mecanismos de defensa para eliminar la infección. Las células infectadas promueven la producción de IFN para activar el sistema inmune, la presentación de antígenos virales mediante el MHC y la revisión de la integridad del ADN (Audirac Chalifour 2016). La revisión de la integridad del ADN consiste en un escaneo de la secuencia genómica antes de dividirse para evitar la presencia de secuencias dañadas, mutaciones y material genético extraño. Cuando se detecta una alteración en el material genético de la célula, se activan mecanismos de muerte celular por apoptosis, dirigida por una cascada de proteínas entre las que se destacan p53 y Rb (Olga Rincón 2007).

El VPH utiliza principalmente las proteínas virales E6 y E7 para promover la proliferación celular, prolongar la progresión del ciclo celular y evitar la apoptosis y eliminación viral (Emma Crosbie 2013). E6 es una de las proteínas virales que se expresan al inicio de la infección por VPH, es una proteína de 151 aminoácidos con un peso molecular de 16 a 18 kDa que interacciona con diferentes moléculas de la célula huésped, una de las más importantes es p53 (Adalucy Álvarez 2012).

La proteína p53 se activa cuando el ADN celular sufre algún daño e induce la expresión de la proteína p21, esta es una proteína inhibidora de ciclinas dependientes de cinasas (CDK) que se une a los complejos de ciclina G1 CDK2, lo que conduce a la célula más allá del punto de control G1 del ciclo celular. La proteína p21 bloquea la actividad cinasa de estos complejos, evitando así la progresión de la célula a la fase S y la replicación del ADN. Las células que no progresan a la fase S del ciclo celular se arrestan en la fase G1 y/o morirán por apoptosis (Adalucy Álvarez 2012).

La proteína viral E6 interacciona con p53 e induce su degradación proteolítica mediada por ubiquitina. La degradación de p53 tiene como consecuencia la evasión del punto de control del ciclo celular G1/S, dando lugar a la desregulación del ciclo celular y evasión de la apoptosis (Mayra Vega 2018).

Por su parte, la proteína viral E7 posee aproximadamente 98 aminoácidos con un peso molecular de 10 kDa que interacciona preferentemente con la proteína pRB y sobre las proteínas asociadas p107 y p130 (Olga Rincón 2007). La proteína pRB interacciona de manera natural con el factor de transcripción E2F, este promueve la proliferación celular en presencia de factores de crecimiento. La unión de E7 con pRB conduce a la liberación de E2F de manera independiente a la presencia de factores de crecimiento externos, esto promueve el progreso de la fase S del ciclo celular y por tanto la proliferación celular (Mayra Vega 2018).

Las proteínas virales E6 y E7 son consideradas oncoproteínas virales debido a que se requieren durante el proceso de transformación celular, por un lado, inhiben la apoptosis y al mismo tiempo promueven la proliferación de las células infectadas por el VPH (Olga Rincón 2007). Generalmente las proteínas E6 y E7 del VPH 16 y 18 tienen una mayor actividad oncogénica que los VPH de bajo riesgo, ya que son fundamentales para el inicio, progresión y consolidación de los tumores de CC (Olga Rincón 2007) (Fig. 4).



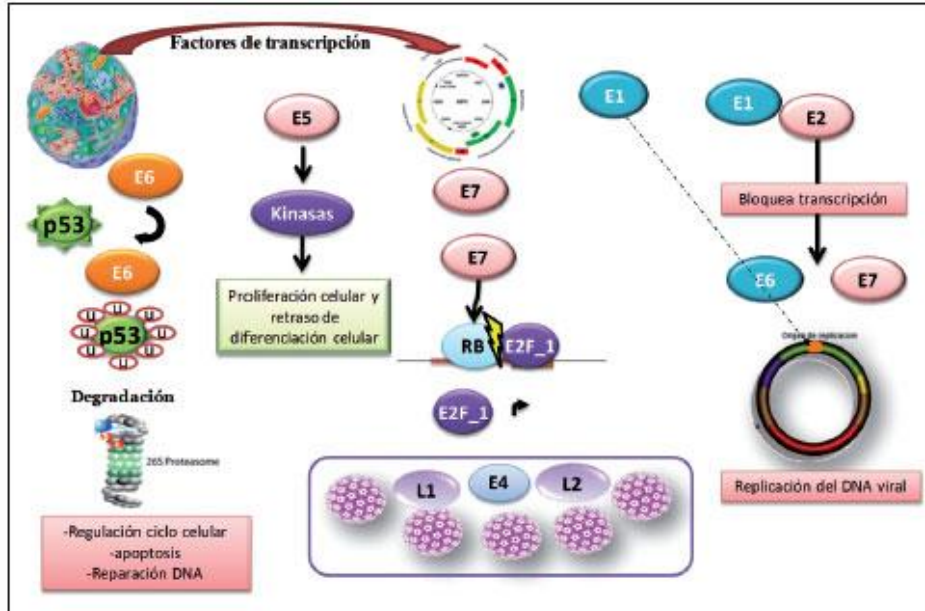


Fig.4. **Diagrama de cómo actúan las diferentes proteínas virales del VPH en las células infectadas.** Durante la transformación oncogénica las proteínas E6 y E7 interactúan con diferentes moléculas celulares como p53 y pRB inhibiendo su función, lo cual induce la transformación y división celular. A su vez la proteína E5 aumenta la acción de las cinasas y E4 regula las proteínas L1 y L2. Por su parte, E2 regula la transcripción de E6 y E7.

### 3.3 Citocinas

Durante el proceso de transformación mediado por E6 y E7 se ha demostrado que intervienen factores adicionales que contribuyen a la carcinogénesis cervical. Durante el desarrollo tumoral es vital la presencia de diferentes moléculas para modificar las condiciones normales del microambiente cervical, incluido la acidez vaginal y el patrón de citocinas que pueden conducir a un estado de inmunosupresión local que favorece las infecciones recurrentes de VPH (Audirac Chalifour 2016).

Las citocinas son elementos del sistema inmune que desempeñan un papel importante para la eliminación viral, sin embargo, bajo determinadas circunstancias se convierten en elementos que contribuyen al desarrollo tumoral. El microambiente del CC está compuesto de diferentes citocinas del sistema inmune, como son las citocinas inmunomoduladoras IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que favorecen la persistencia de la infección del VPH al suprimir la respuesta de las células efectoras del sistema inmune y generar un ambiente inflamatorio (AudiracChalifour 2016).

Las interleucinas se han catalogado como citocinas promotoras del desarrollo tumoral dependiendo del tipo de tumor y microambiente. Una de las interleucinas más estudiadas en el CC debido a sus múltiples funciones es Interleucina-2 (IL-2) (Rosalva Rangel 2004). La IL-2 es una citocina de 15,5 kDa producida principalmente por las células T CD4 que señala a través del receptor de IL-2 (IL-2R). Se ha reportado la expresión de IL-2 y su receptor en diferentes tumores como el cáncer de cabeza y cuello, linfomas y CC (Rosalva Rangel 2004). El IL-2R activa la vía de señalización JAK/STAT en el CC como lo hace en las células linfoides, sin embargo, en las células de CC se mantiene activa de manera constitutiva y además se amplifica en presencia de IL-2 exógena (Arturo Valle 2014).

### 3.4 Interleucina-15

Otra de las interleucinas que desempeña un papel importante en el microambiente tumoral y que se asocia a IL-2 es Interleucina-15 (IL-15). La IL-15 es una citocina de aproximadamente 12-14 KD (Fig.5) descubierta por Grabstein en 1994 (Qiyue Hu 2018). IL-15 es un factor de

crecimiento, desarrollo, supervivencia y activación de células asesinas naturales (NK), y mantiene a las células T de memoria. Además, IL-15 promueve la quimio-atracción de células T, producción de IFN- $\gamma$  y la maduración funcional de células dendríticas y macrófagos (Tsunao Kishida 2003). La IL-15 pertenece a la familia de citocinas tipo I, que presenta una estructura común de 4 alfa hélices antiparalelas, entre las que se encuentran también IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL13 e IL-21(Alicia Santos 2006)

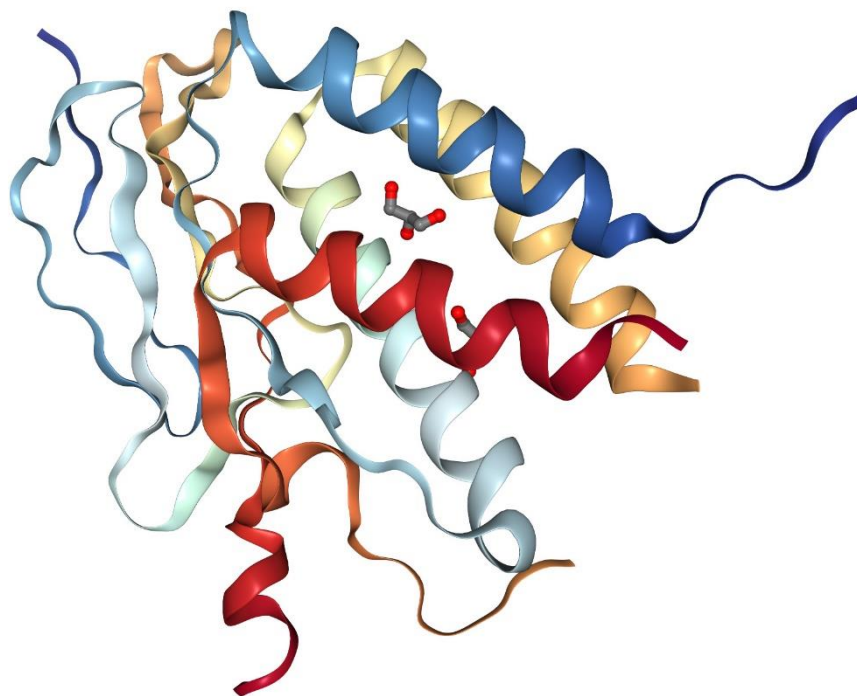


Fig.5. Estructura tridimensional de Interleucina-15 (IL-15) tomada de <https://www.sinobiological.com/>

Una característica importante de IL-15 es que comparte atributos funcionales con IL-2, presenta aproximadamente un 19% de homología de secuencia y propiedades biológicas (Yin Guo 2017), incluida la

proliferación, supervivencia y diferenciación de muchos tipos de células como NK, T y B (Cristina Bannwart 2007).

La IL-15 ejerce sus actividades biológicas mediante su unión a su receptor IL-15R, este es un receptor trimétrico compuesto por una subunidad alfa (IL-15R $\alpha$ ), una subunidad beta (IL-15R/IL-2R $\beta$ , (CD122)) que comparte con el receptor para IL-2 y la subunidad gama ( $\gamma_c$ , (CD132)) (Fig.6) que es común con varios receptores de citocinas (Alicia Santos 2006).

IL-15 presenta diferentes formas funcionales, la forma soluble es secretada a bajas concentraciones por las células presentadoras de antígenos (PA), puede asociarse y activar a células que expresan el receptor de alta afinidad (IL15R $\alpha$ , IL-15R/IL-2R $\beta$ ,  $\gamma_c$ ) (Julien Giron 2011).

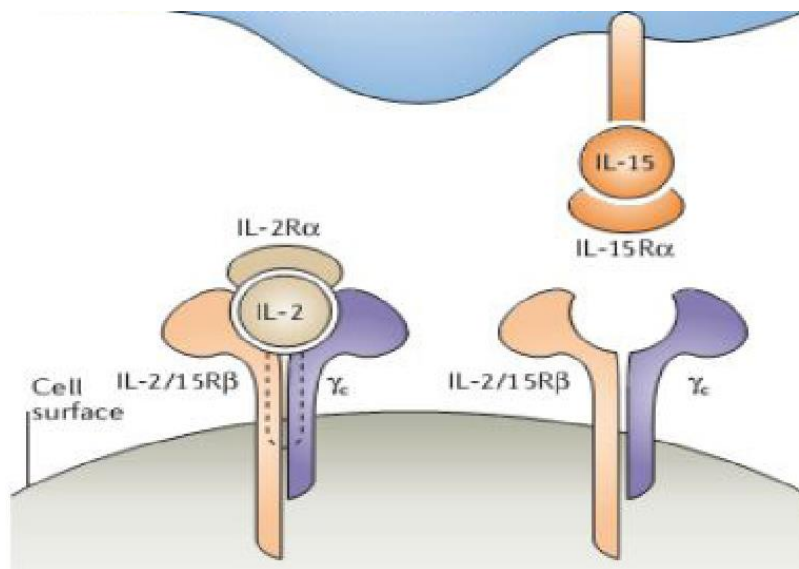


Fig.6. **Unión de IL-2 e IL-15 a su receptor.** IL-2 se une a su receptor trimétrico IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  y  $\gamma_c$ . La IL-15 comparte la subunidad IL-2R $\beta$  y  $\gamma_c$  con IL-2 y puede señalizar en forma de transpresentación uniéndose a la subunidad IL-15R $\alpha$ .

Por otro lado, la forma unida a membrana de IL-15 (MB-IL15) está anclada a través de la cadena IL15R $\alpha$ , conformado un IL-15R de baja afinidad (Sebastian Wittnebel 2007). Cuando la IL-15 está anclada a la membrana e interactúa con células que expresan el receptor de alta y baja afinidad puede emitir una señal inversa a la de las células presentadoras (Julien Giron 2011).

Las diferentes cadenas de IL15R pueden expresarse individualmente o juntas, sin embargo, la cadena IL-15R $\alpha$  es exclusiva del receptor y es la que le da especificidad a IL-15. La subunidad IL-15R $\alpha$  es una proteína transmembrana con una afinidad muy alta por IL-15 que facilita el tráfico de IL-15 desde el retículo endoplásmico (ER) a través del citoplasma hasta la conformación del complejo IL-15/IL-15R $\alpha$  en la superficie celular, debido a que permanece asociada fuertemente (Tanya Robinson 2017). La IL-15R $\alpha$  se transporta a la superficie celular como un complejo con IL-15 que estimula eficientemente las células vecinas que presenten las cadenas IL-15R $\beta$  y  $\gamma c$  a través de un mecanismo de transpresentación (Fig.6) (Rosa Santana 2018).

La señalización mediada por IL-15 se debe en gran parte a la cadena IL-15R $\beta$  que comparte con el IL-2R. La activación de la cadena  $\beta$  favorece el reclutamiento de JAK1 mientras que la cadena  $\gamma c$  activa JAK3, lo que a su vez resulta en la fosforilación y activación del transductor de señal y activador de transcripción 5 (STAT5) (Cristina Bannwart 2007). La fosforilación de STAT5 permite la formación de dímeros de STAT5 que luego se trasladan al núcleo donde activan la transcripción de la proteína

antiapoptótica bcl-2 y los protooncogenes c-myc, c-fos, c-jun, Mcl-1, NF-Kb (Anjali Mishra 2014).

La IL-15 también puede unirse al receptor de afinidad intermedia IL-15R $\beta$ / $\gamma$ c en ausencia de la subunidad IL-15R $\alpha$ , lo que resulta en la activación de las tirosinas cinasas Lck, Fyn, Lyn, Syk y la señalización cruzada con las vías PI3K y MAPK (Yin Guo 2017).

Cada una de las vías de señalización activadas por IL-15 favorece la proliferación, supervivencia, diferenciación y activación celular. Algunas células estimuladas con IL-15 presentan mecanismos de retroalimentación positiva a través de NF-kB e IRF-E, ambas vías regulan la expresión de IL-15 (Anjali Mishra 2014).

La IL-15 es una citocina que se expresa constitutivamente en una gran variedad de tipos de células, como monocitos/macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y células no linfoides (Tanya Robinson 2017) de la placenta, el músculo esquelético, el riñón, el pulmón y el corazón (Anjali Mishra 2014). Sin embargo, en el CC aún no se ha determinado la presencia y el papel de IL-15 en la carcinogénesis cervical. Por tanto, en este trabajo se analizó la expresión de IL-15 y su receptor en diferentes líneas celulares de CC.

#### 4. Antecedentes directos.

En diversos estudios se ha propuesto que la IL-15 puede conducir a una transformación maligna debido a la modulación del microambiente y de las células del sistema inmune. Además, se ha reportado que la expresión crónica de IL-15 es un factor que favorece la carcinogénesis en diversos tumores (Anjali Mishra 2014).

De igual forma se ha demostrado la presencia de IL-15 en la Leucemia de células B (B-CLL), Linfoma folicular (FL), Linfoma de Hodgkin (HL), Linfoma cutáneo de células T (CTC), Mieloma múltiple (MM), Linfoma de células T asociado a enteropatía (EATL) y Leucemia de células T adultas (ATL) (Marina Fabbi 2016).

A su vez en líneas celulares de melanoma humano se ha encontrado la expresión de receptores para IL-2 e IL-15 (Yu Guang He 2004). Además, la presencia de IL-2 e IL-15 producida por linfocitos y macrófagos que se infiltran en los tumores pueden afectar el comportamiento maligno del melanoma humano al estimular su proliferación y reducir la susceptibilidad de las células del melanoma a la citólisis mediada por células NK y la apoptosis inducida por cisplatino (Yu Guang He 2004).

En el cáncer de colon se ha informado que IL15 actúa de forma autocrina y paracrina promoviendo la proliferación, motilidad, capacidad de invasión y aumento de tolerancia a la apoptosis (Hiroki Kuniyasu 2003).

Por su parte, en células de cáncer renal (CCR) se ha encontrado la expresión de IL-15 (Peter Trinder 1999). La IL-15 en CCR se expresa en 2 isoformas, la primera isoforma está anclada a la membrana celular a través

de la cadena IL-15R $\alpha$  y actúa sobre las células circundantes que expresan IL-15R $\alpha$  (Huaqin Yuan 2015), mientras que la segunda isoforma está anclada a través de un mecanismo independiente que puede dar una señal inversa en respuesta a su ligando S-IL-15R $\alpha$  (Huaqin Yuan 2015). Al ser estimuladas de esta forma, las células adquieren propiedades migratorias e invasoras que favorecen la transición epitelio-mesenquimal (EMT) (Huaqin Yuan 2015).

También se ha encontrado la expresión de IL-15 en tejidos de Hiperplasia Benigna de Próstata (BPH) (Chantal Mengus 2011) donde ocasiona una inflamación crónica que promueve una hiperproliferación del estroma y del epitelio. Además, el IFN- $\gamma$  un producto de los linfocitos T estimula la producción de IL-15 prostática (Alessandra Handisurya 2001). Lo anterior sugiere que la IL-15 tiene un papel importante en lesiones pre-malignas que pueden derivar a un cáncer de próstata (CaP) (Alessandra Handisurya 2001).

Estos antecedentes refuerzan la hipótesis de que la IL-15 y su receptor tienen un papel importante en el desarrollo tumoral, sin embargo, en el CC no hay evidencias del papel de IL-15. Como ya se ha mencionó las células de CC expresan IL-2 y su receptor IL-2R, y la estimulación con IL-2 exógena promueve su proliferación. Esto demuestra que IL-2 actúa como un factor de proliferación para las células tumorales de CC (Rosálva Rangel 2004). Este antecedente y la similitud de acción de IL-15 nos sugiere que las células de CC podrían expresar a IL-15 y su receptor, desempeñando un papel similar a IL-2.



## 5. Justificación.

EL cáncer cervical (CC) es un grave problema de salud pública a nivel mundial, principalmente en países en vías de desarrollo como los de América Latina. En México se estiman 13,960 nuevos casos de CC según la secretaria de salud (SDS 2015), siendo la segunda causa de muerte en mujeres, esto debido a las diferencias económicas y sociales que limitan su identificación y tratamiento oportuno. A pesar del diseño de nuevas herramientas y tratamientos como la vacuna contra el VPH la cual promete disminuir la incidencia y mortalidad aún no se ha podido erradicar. Por tanto, se requieren más estudios de los mecanismos que contribuyen al desarrollo del CC para poder proponer estrategias más eficaces para su tratamiento. Es importante tener en cuenta que la vacuna contra VPH solo es eficiente cuando nunca se ha tenido contacto con el virus y, por otro lado, la vacuna aún no se aplica de manera rutinaria en la población general. Por lo cual, el estudio de la expresión del complejo IL-15 e IL-15R permitirá tener un mayor entendimiento de los factores adicionales que contribuyen al CC y proponer su uso en estrategias de detección y tratamiento oportuno.

## 6. Hipótesis.

La IL-15 es una citocina secretada principalmente por los linfocitos T que sinérgiza con IL-2 en diferentes procesos celulares como la proliferación, activación y diferenciación de células del sistema inmune de forma autocrina y paracrina. Se ha reportado que las células de cáncer cervical (CC) expresan el receptor de IL-2 (IL-2R) y la estimulación con IL-2 exógena regula su proliferación. El IL-2R comparte la subunidad  $\beta$  con el IL-15R y se requiere la presencia de ambas interleucinas para una correcta activación de los procesos celulares. *Por tanto, al analizar la expresión de IL-15 e IL-15R en diferentes líneas celulares CC, se observará la presencia de transcritos para IL-15 y las diferentes subunidades de IL-15R.*

## 7. Objetivo general.

Analizar la expresión de IL-15 y su receptor IL-15R en líneas celulares de cáncer cervical mediante la técnica de RT-PCR.

## 8. Objetivos particulares.

- Cultivar las líneas celulares de cáncer cervical: HeLa, SiHa, CaSki e INBL hasta obtener un número adecuado de células para el estudio.
- Realizar la extracción de ARN total de las líneas celulares; HeLa, SiHa, CaSki e INBL y determinar su integridad por electroforesis.
- Diseñar sondas específicas para IL-15 y las diferentes subunidades de IL-15R.
- Analizar la expresión de IL-15 y su receptor IL-15R por la técnica de RT-PCR y validar la amplificación por electroforesis.

## 9. Material y Métodos.

### 9.1 Cultivo celular.

Se realizó el cultivo de las líneas celulares de CC; HeLa, SiHa, CaSki e INBL en cajas de cultivo de 25ml con medio RPMI 1640 y suero fetal bovino (SFB) al 10% en una incubadora con regulación de CO<sub>2</sub> al 5%. Las líneas celulares fueron obtenidas del banco de crio-preservación del Laboratorio de Oncología Celular de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza CII.

### 9.2 Extracción de ARN de líneas celulares de cáncer cervical.

Se cultivaron  $2 \times 10^6$  de células de cada línea celular en cajas Petri de 10cm con medio de cultivo RPMI 1640 con 10% de SFB y se incubaron durante 24hrs. Pasado el tiempo de incubación se retiró el medio de cultivo y realizó un lavado con PBS para posteriormente agregar 1ml de Trizol™ realizando lavados para lisar las células adheridas a la caja petri y el lisado de la mezcla se colocó en un tubo eppendorf (2 mL). Se adicionaron 200  $\mu$ L de cloroformo y centrifugó a 15000rpm durante 15 min a 4°C, se tomó la fase acuosa y se precipito el ARN agregando 500  $\mu$ L de isopropanol (frío) para posteriormente centrifugar a 1200rpm durante 15 min. El botón de ARN se lavó con 1mL de etanol al 75% realizando una última centrifugación a 9500rpm durante 5 min, y se re-suspendió el botón en 200  $\mu$ L de agua inyectable

### 9.3 Cuantificación de ARN de líneas celulares de cáncer cervical.

Se tomó 2  $\mu$ L de ARN total y 98  $\mu$ L de agua inyectable para realizar una dilución de las muestras. La lectura de la concentración de ARN se

realizó en un espectrofotómetro a 260 nm, tomando como prueba de pureza el factor 260/280 en un rango de 1.5-2.

#### **9.4 Gel de integridad de ARN.**

Para determinar la integridad del ARN de cada una de las muestras, se preparó un gel de agarosa al 1% en solución TBE al 1X calentando la mezcla para una mejor disolución, se agregó 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bromuro de etidio. Las muestras de ARN se mezclaron con buffer Green 5x y se realizó un corrimiento a 75 volts por 30-40 minutos. Las muestras se visualizaron en un transiluminador bajo luz UV.

#### **9.5 RT de líneas celulares de cáncer cervical.**

La retro-transcripción (RT) se realizó para una mezcla total de 25 $\mu\text{L}$ , agregando 5  $\mu\text{g}$  de ARN, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Oligo DT, 0.5mM de Mixs dNTPs. Se mezcló ligeramente y se incubo en un termociclador a 65° durante 5 minutos. Una vez transcurrido el primer ciclo se le agregó 1X de buffer 5X First-strand y 1 mM de MDTT, se mezcló ligeramente y coloco la muestra en el termociclador a 37°C por 2 min. Por último, se agregó 1 U/ $\mu\text{L}$  de enzima M-MLV (Invitrogen™) y se Incubo durante 50 min a 37°C.

#### **9.6 PCR y electroforesis en líneas celulares de cáncer cervical.**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó para una mezcla de reacción de 25  $\mu\text{L}$  totales, utilizando las sondas para IL-15, IL-15R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  e IL-15R $\gamma\text{c}$ . La amplificación por PCR de cada sonda especifica se realizó con 10 ng/mL de ADNc utilizando el kit Gotaq Hot Start (Promega™) con 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM de dNTPs, 1.4X de

buffer 5X, 1  $\mu$ M de cada sonda, 0.5U de Hot Star polymerase (5U/ $\mu$ L) y un cambio de temperaturas de 2 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 50 segundos a 95°C, 50 segundos a 50-55°C y 2 minutos a a 72°C.

Sonda	secuencia
IL-15-R	5'-ACT TTG CAA CTG GGG TGA AC-3'
IL-15-F	5'-ATT TTG GGC TGT TTC AGT GC-3'
IL-15 $\alpha$ -R	5'-GCT CC TGG AGT ACA AGC TG-3'
IL-15 $\alpha$ -F	5'-GAC TTT GCC CAC TCT CTT CG-3'
IL-15R $\beta$ -R	5'-TGT CCC TCTCCA GCA CTT CT-3'
IL-15R $\beta$ -F	5'-GCT GAT CAA CTG CAG GAA CA-3'
$\gamma$ c-R	5'-TCC GTT CCA GCC AGA ATT AC-3'
$\gamma$ c-F	5'-GTG CTC AGC ATT GGA GTG AA-3'
$\beta$ -actina-R	5'- AGG TCT TTG CGG ATG TCC ACG T-3'
$\beta$ -actina-F	5'-CAC CAT TGG CAA TGA GCG GTT C-3'

Para la electroforesis de los productos de ampliación se realizó un gel de agarosa al 1% con TBE 1X y 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bromuro de etidio. Se realizó un corrimiento a 120 volts por 30-40 minutos. Las muestras se visualizaron en un transiluminador bajo luz UV y verificaron los productos de ampliación con respecto a un marcador de pares de bases (pb).

## 10. Resultados.

### 10.1. Integridad del ARN de líneas celulares de cáncer cervical.

Para los estudios de expresión génica es fundamental un ARN de buena calidad que permita generar resultados confiables. Para verificar la integridad del ARN de las muestras de CC se realizó un gel de electroforesis con 5  $\mu\text{g}$  de ARN total. Se observa la presencia de las bandas 28s y 18s del ARN ribosomal (ARNr) en todas las líneas células de CC y linfocitos. Las bandas de ARNr son claras y nítidas, donde la banda 28s es aproximadamente dos veces más intensa que la banda 18s (Fig. 7). Estos resultados nos demuestran que el ARN obtenido de las células de CC es adecuado para el análisis de expresión génica mediante RT-PCR. Adicionalmente se cuantifico ARN total a 260 nm para confirmar la eficiencia del método de extracción y para contar con una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para realizar la RT. Las diferentes muestras de ARN presentaron una relación 260/280 en el rango de 1.5 a 2 que confirma la pureza de las muestras y concentraciones desde 4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  hasta 4.9  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .





**Fig.7. Gel de integridad de ARN obtenido de líneas celulares de cáncer cervical.** Se extrajo el ARN total de las líneas celulares de CC; HeLa, CaSki, SiHa, INBL y Linfocitos de Sangre Periférica (LSP) por el método de Trizol™. Se visualizó el ARN mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2% con 5  $\mu$ L de bromuro de etidio a 75 volt, se observan las subunidades 28s y 18s del ARN ribosomal.

## 10.2. Expresión de Interlequina-15 y su receptor IL-15R en Linfocitos de Sangre Periférica.

Para confirmar el diseño de las sondas para IL-15, IL-15R $\alpha$ , IL-15R $\beta$ , y las condiciones de la RT-PCR se evaluó la expresión de cada uno de los genes antes mencionados en linfocitos de sangre periférica (LSP). De manera normal los linfocitos y las células del sistema inmune expresan IL-15, IL-15R $\alpha$ , IL-15R $\beta$  y  $\gamma$ c durante los procesos de activación del sistema inmune, por tanto, nos sirve como un control positivo de la expresión de dichos genes. Los resultados nos muestran un producto de amplificación de 183 pb para IL-15R $\alpha$ , 206 pb para IL-15R $\beta$ , 159 pb para IL-15R $\gamma$ c y 152 pb para IL-15 (Fig. 8). Se utilizó la expresión de  $\beta$ -actina como control interno de la técnica de RT-PCR. Estos resultados demuestran que los LSP mantienen una expresión estable de IL-15, IL-15R $\alpha$ , IL-15 $\beta$  y  $\gamma$ c en condiciones de cultivo *in vitro*

y que las condiciones de la técnica de RT-PCR y el diseño de las sondas son adecuados para analizar la expresión de IL-15, IL-15R $\alpha$ , IL-15 $\beta$  y  $\gamma$ c en las líneas celulares de CC.

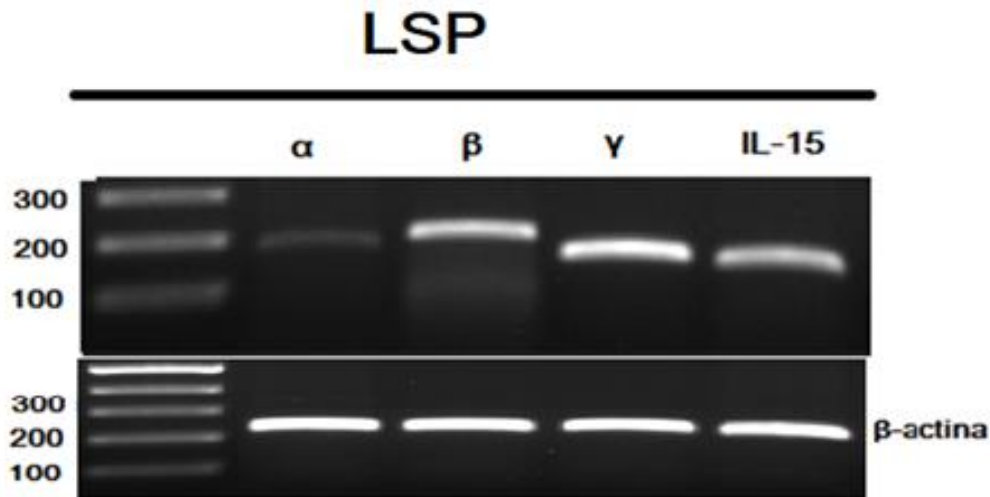


Fig.8. **Expresión de IL-15 e IL-15R en linfocitos de sangre periférica.** Los linfocitos de sangre periférica se aislaron de un donante sano y fueron purificados mediante Histopaque-1077 para posteriormente ser cultivados durante 24 horas en condiciones de cultivo *in vitro*. Se extrajo el ARN total por el método de Trizol™ y se analizó la expresión de IL-15 (152 pb), IL-15R $\alpha$  (183 pb), IL-15R $\beta$  (206 pb) y  $\gamma$ c (159 pb) mediante la técnica de RT-PCR con sondas específicas. Los productos de amplificación se visualizado mediante gel de agarosa al 2% con 5  $\mu$ L de bromuro de etidio y una electroforesis a 120 volts. Se muestra  $\beta$ -actina (234 pb) como control interno de la técnica de RT-PCR.

### 10.3. Líneas celulares de cáncer cervical expresan IL-15.

Después de haber validado la expresión de IL-15 en LSP, se procedió analizar la expresión de IL-15 en las líneas celulares de CC, HeLa, SiHa, CaSki e INBL. Los resultados de la PCR demuestran que todas las líneas celulares de CC expresan IL-15, con un producto de amplificación de 152

pb (Fig. 9). Los niveles de expresión son muy parecidos en todas las líneas celulares, con una relativa mayor expresión en la línea celular CaSki. Estos resultados demuestran que las líneas celulares de CC expresan a IL-15 de manera basal, sugiriendo que puede tener un papel importante en el desarrollo tumoral.



Fig.9. **Expresión de IL-15 en líneas celulares de cáncer cervical.** La expresión de IL-15 se analizó en las líneas celulares HeLa, CaSki, SiHa e INBL mediante la técnica de RT-PCR. Los productos de amplificación (152 pb) se visualizan mediante una electroforesis con un gel de agarosa al 2% con 5  $\mu$ L de bromuro de etidio y una electroforesis a 120 volts. Se muestra  $\beta$ -actina (234 pb) como control interno de la técnica de RT-PCR

#### 10.4. Líneas celulares de cáncer cervical expresan la subunidad IL-15R $\alpha$ .

El receptor de IL-15 este compuesto por tres subunidades, la subunidad IL-15R $\alpha$ , la subunidad IL-15 $\beta$  y la subunidad  $\gamma$ c (Alicia Santos 2006). Cuando se analiza la expresión de la subunidad IL-15R $\alpha$  en las líneas celulares de CC, HeLa, SiHa, CaSki e INBL los resultados nos muestran

un producto amplificado de 183 pb en todas las líneas celulares. Se observa una mayor expresión de IL-15R $\alpha$  en la línea celular HeLa (Fig. 10). Estos resultados demuestran que las líneas celulares de CC, HeLa, SiHa, CaSki e INBL presentan una expresión basal de la subunidad IL-15R $\alpha$ . Dado que la subunidad IL-15R $\alpha$  le da especificidad al receptor por IL-15 y el que las células de CC expresen ambos componentes, nos sugiere que las células de CC pudieran activar esta vía de señalización para promover el desarrollo tumoral.

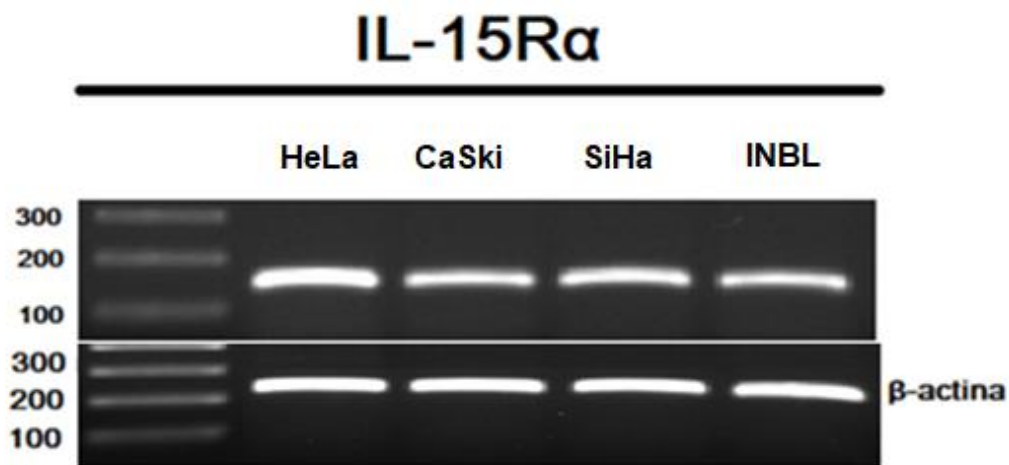


Fig.10. **Expresión de IL-15R $\alpha$  en líneas celulares de cáncer cervical.** Se analizó la expresión de IL-15R $\alpha$  en las líneas celulares de CC, HeLa, SiHa, CaSki e INBL mediante la técnica de RT-PCR. Los productos de amplificación (182 pb) se visualizaron en un gel de agarosa al 2% con 5  $\mu$ L bromuro de etidio y una electroforesis a 120 volts, se utilizó a  $\beta$ -actina (234 pb) como control interno de la técnica de RT-PCR

### 10.5. Líneas celulares de cáncer cervical expresan la subunidad IL-15R $\beta$ y $\gamma$ c.

La expresión de las tres subunidades del IL-15R es necesaria para una correcta activación del receptor, por tanto, se analizó la expresión de la

subunidad IL-15R $\beta$  y  $\gamma_c$  en las líneas celulares de CC, HeLa, SiHa, CaSki e INBL. Los resultados nos demuestran que todas las líneas celulares expresan la subunidad IL-15R $\beta$  con un producto de amplificación de 206 pb. De igual forma, todas las líneas celulares expresan la subunidad  $\gamma_c$  (159 pb) (Fig. 11). Cabe mencionar que la subunidad IL-15R $\beta$  se comparte con el receptor de IL-2 y la subunidad  $\gamma_c$  forma parte de diferentes receptores de citocinas (Alicia Santos 2006). Estos resultados nos demuestran que las líneas celulares de CC expresan las tres subunidades del IL-15R, manteniendo una expresión similar para todas las líneas celulares. El que las células de CC expresen el IL-15R e IL-15 nos sugiere que esta vía de señalización pudiera ser importante en el microambiente tumoral, utilizando la IL-15 de forma autocrina o paracrina de manera similar a lo que sucede con IL-2 (Rosalva Rangel 2004).

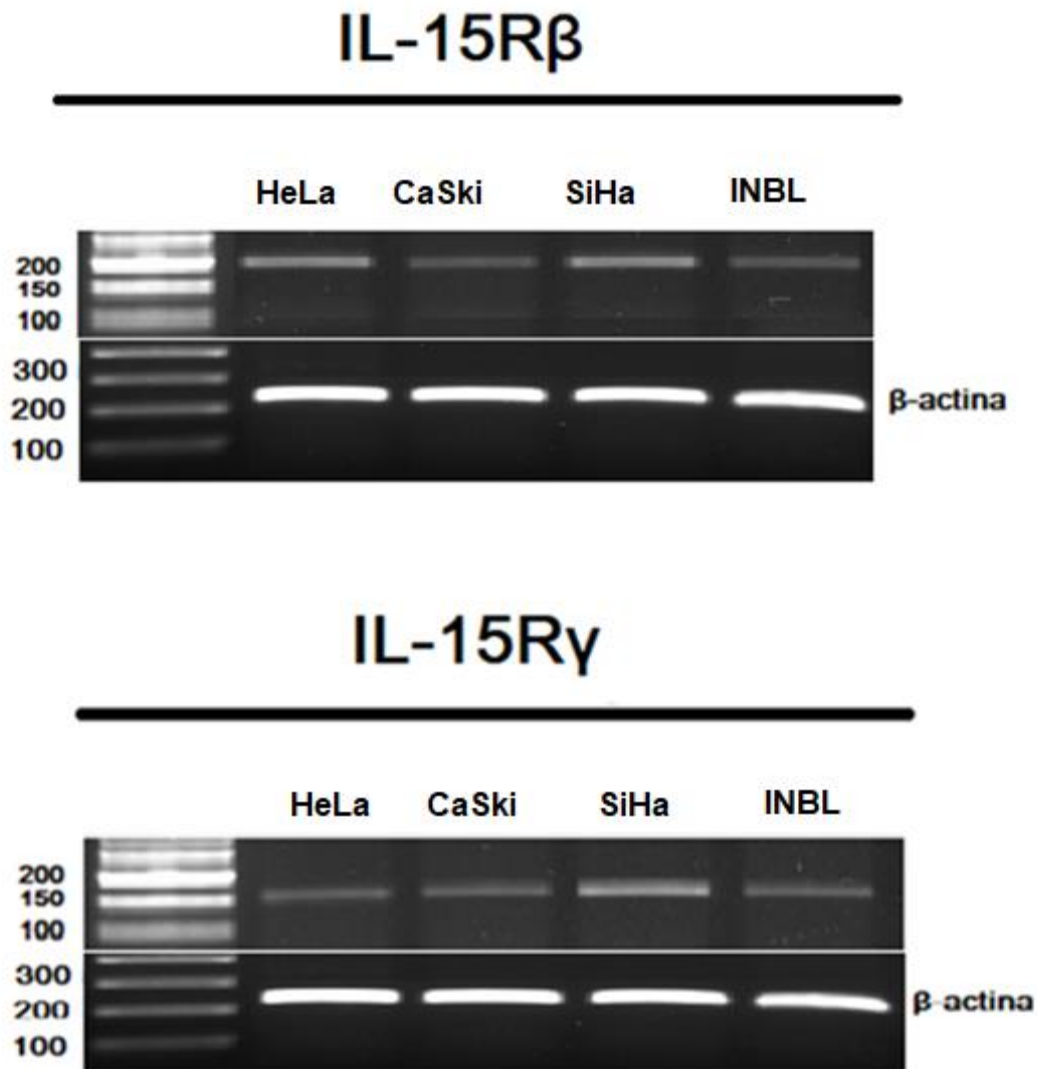


Fig.11. **Expresión de la subunidad  $\beta$  y  $\gamma$  del receptor de IL-15R en líneas celulares de cáncer cervical.** Se analizó la expresión de IL-15R $\beta$  y  $\gamma$  en las líneas celulares de CC; HeLa, SiHa, CaSki e INBL mediante la técnica de RT-PCR, obteniendo un producto de amplificación de 206 pb para IL-15R $\beta$  y 159 pb para  $\gamma$ . Los productos de amplificación se observaron mediante un gel de agarosa al 2% con 5  $\mu$ L bromuro de etidio y utilizando  $\beta$ -actina (234 pb) como control interno de la técnica de RT-PCR

## 10.6 Líneas celulares de cáncer cervical sobreexpresan a IL-15.

Después de haber demostrar que las células de CC expresan IL-15, se procedió a analizar si la expresión de IL-15 era mayor o menor con respecto a los LSP. Los linfocitos son células que de manera normal expresan la IL-15, por tanto, el nivel de expresión en dichas células nos permitirá demostrar si hay una sobreexpresión de IL-15. La comparación de los niveles de expresión nos demuestra que las líneas celulares de CC, HeLa, CaSki, SiHa e INBL presentan una mayor expresión de IL-15 en comparación de los linfocitos en los geles de electroforesis (Fig. 12A). Cuando se grafica la intensidad de las bandas se confirma la sobreexpresión de IL-15 en las células de CC (Fig. 12B). La presencia de un mayor número de transcritos para IL-15 en las células de CC nos sugiere que esta citocina puede desempeñar un papel relevante en las células tumorales. Los altos niveles de expresión de IL-15 pudiera generar un ambiente inflamatorio que contribuye al desarrollo tumoral.

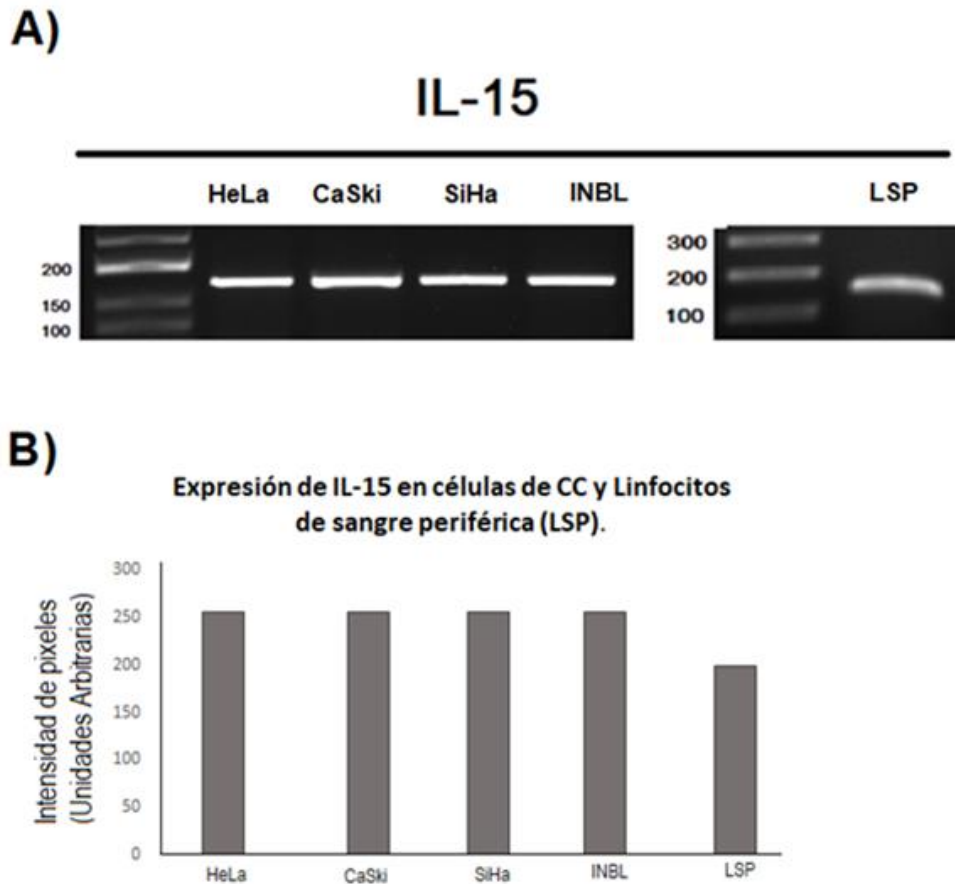


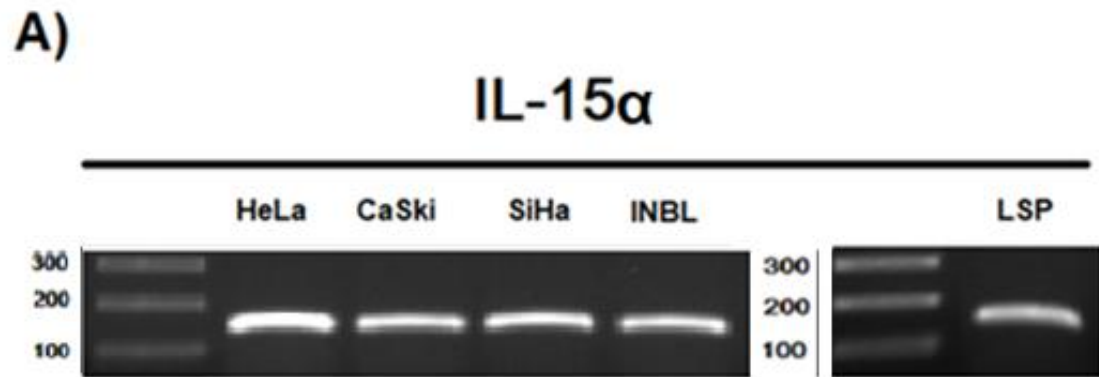
Fig. 12. **Expresión de IL-15 en células de CC y LSP.** (A) Se comparó los niveles de expresión de IL-15 entre las líneas celulares de CC, HeLa, SiHa, CaSki e INBL y LSP. (B) La intensidad de los pixeles se cuantificó mediante el software UVP y se graficaron en Excel.

### 10.7. Líneas celulares de cáncer cervical sobreexpresan la subunidad IL-15R $\alpha$

Al igual que para IL-15, también se comparó la expresión de IL-15R $\alpha$  en las líneas celulares de CC y los LSP. Los resultados demuestran una mayor expresión de IL-15R $\alpha$  en las líneas celulares de CC en comparación de los LSP en los geles de electroforesis (Fig. 13C). Cuando se grafica la intensidad de las bandas se confirma una mayor expresión de IL-15R $\alpha$  en las líneas celulares de CC, siendo más



evidente en las líneas HeLa y CaSki (Fig. 13D). La subunidad IL-15R $\alpha$  es determinante para el reconocimiento de IL-15, por tanto, las células tumorales requieren altos niveles de transcritos de IL-15R $\alpha$  para reconocer a la IL-15 secretada por las células tumorales y por las células del sistema inmune. En general este resultado nos sugiere un papel importante de IL-15 y su receptor IL-15R en el desarrollo de las células tumorales.



**B)** **Expresión de IL-15R $\alpha$  en células de CC y Linfocitos de sangre periférica (LSP).**

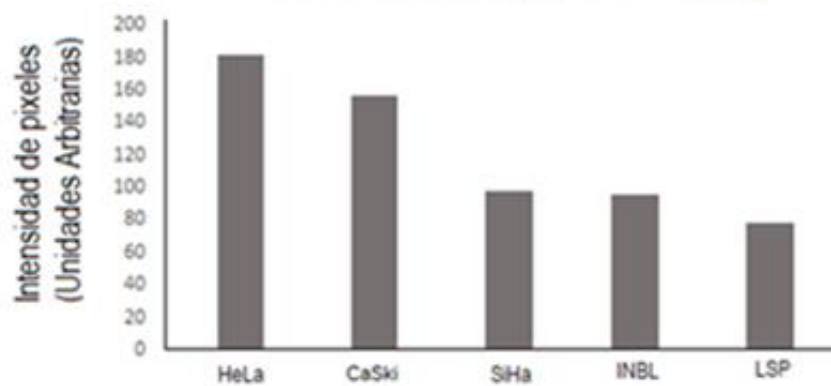


Fig. 13. **Expresión de IL-15R $\alpha$  en células de CC y LSP.** (A) Se comparó los niveles de expresión de IL-15R $\alpha$  entre las líneas celulares de CC, HeLa, SiHa, CaSki e INBL y LSP. (B) La intensidad de los pixeles se cuantificó mediante el software UVP y se graficaron en Excel.

## 11. Discusión.

La Interleucina-15 (IL-15) es una citocina pleiotrópica del sistema inmune que regula la homeóstasis de los linfocitos T CD8+ de memoria y células NK (Santana Carrero 2019). Debido a su alta especificidad de acción la IL-15 se ha catalogado como una citocina prometedora en el campo de la inmunoterapia contra infecciones y el cáncer, al mejorar la eficacia de las células efectoras del sistema inmune. Sin embargo, a pesar de ser considerada una herramienta prometedora contra el cáncer, diversos estudios han demostrado que puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de diferentes tumores. En el caso del cáncer cervical (CC) se desconoce la importancia de IL-15 y su receptor IL-15R durante el desarrollo de esta neoplasia.

Resultados previos de nuestro grupo de trabajo han demostrado que las líneas celulares de CC expresan el receptor de IL-2 (IL-2R) y que la estimulación con IL-2 exógena regula su proliferación (Rosalva Rangel 2004). Debido a que se ha demostrado que IL-2 e IL-15 sinergizan en diferentes funciones biológicas y además comparten la subunidad IL-15R/IL-2R $\beta$ , se propuso que las células de CC deberían de expresar IL-15 y su receptor IL-15R. Por tanto, este trabajo tuvo como objetivo analizar la expresión de IL-15 e IL-15R en diferentes líneas celulares de CC.

Los resultados de este trabajo demuestran que diferentes líneas celulares de CC expresan a IL-15 de manera basal y sus niveles de expresión son superiores a lo observado en linfocitos. Se ha reportado que la expresión de IL-15 promueve el crecimiento y viabilidad de

células T malignas en linfomas (Marina Fabbi 2016). Por su parte, en el cáncer de próstata y colon la expresión de IL-15 genera un estado de inflamación que contribuye a la carcinogénesis tumoral (Alessandra Handisurya 2001). La expresión de IL-15 en las células de CC nos sugiere que puede actuar como un factor pro-tumoral que contribuye a la proliferación de las células tumorales. Esta aseveración se hace con base a que IL-15 sinergiza en múltiples funciones con IL-2, y con lo reportado por nuestro grupo de trabajo, donde se observa que la estimulación con IL-2 exógena promueve la proliferación de las células de CC (Rosalva Rangel 2004). Adicionalmente, la IL-15 puede generar un estado de inflamación en el microambiente tumoral que contribuye al desarrollo tumoral y suprime la respuesta inmune. De igual forma se sabe que las infecciones del VPH generan estados de inflamación crónica (Raffaella Ghittoni 2010). La IL-15 podría participar en el inicio de la transformación tumoral de las células del cérvix, contribuyendo a la infección de VPH. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar estas hipótesis.

Para que IL-15 ejerza sus funciones biológicas sobre sus células diana requiere la presencia de su receptor IL-15R. Estudios previos han demostrado que las células de CC expresan el IL-2R y que señalizan a través de la vía JAK/STAT (Leticia Rocha 2004). Los resultados de este trabajo demuestran que las líneas células de CC expresan la subunidad IL-15R $\alpha$  y que los niveles de expresión son mayores a lo observado en los linfocitos. Adicionalmente, se confirmó la expresión de la subunidad IL-2R $\beta$  y  $\gamma_c$  (Leticia Rocha 2004). Este resultado nos sugiere que las células de CC tiene la capacidad de responder a la IL-15, ya que cuenta

con su receptor, generando un mecanismo de señalización autocrino y paracrino. La activación del IL-15R promueve la vía de señalización JAK (JAK1 y JAK3) y STAT (STAT3 y STAT5) (Alicia Santos 2006). Se ha informado que la vía de señalización JAK/STAT en CC se encuentra alterada, observando una fosforilación constitutiva de JAK3, la fosforilación constitutiva se incrementa en presencia de IL-2 y conduce a la proliferación de las células tumorales (Arturo Valle 2014). Por tanto, nos sugiere que el IL-15R puede activar la vía de señalización JAK/STAT y también puede potenciarse debido a la fosforilación constitutiva de JAK3. En el microambiente tumoral la IL-15 e IL-2 pueden actuar en conjunto para promover la proliferación de las células tumorales y bajo determinadas circunstancias la IL-15 puede tener un papel más relevante ya que su expresión es más redundante en diferentes células inmunológicas y no inmunológicas.

A diferencia de IL-2, la IL-15 se une con alta afinidad a la subunidad IL-15R $\alpha$ , de tal forma que se pueden encontrar asociada al receptor formando el complejo IL-15/IL-15R $\alpha$  (Sandy Azzi 2015). La presencia de este complejo permite la activación del receptor de manera trans entre células cercanas. Adicionalmente, se ha reportado que el complejo IL-15/IL-15R $\alpha$  puede encontrarse en forma soluble (sIL-15/IL-15R $\alpha$ ) (Sandy Azzi 2015). Estas variantes del IL-15R permiten una activación más eficiente y diversa de la vía de señalización JAK/STAT. En el CC el IL-15R se podría activar por múltiples mecanismos, y bajo determinadas circunstancias cada uno de ellos podría conducir a diferentes procesos biológicos en las células tumorales. Se requieren

más estudios para dilucidar los mecanismos moleculares que utiliza la IL-15 para promover el desarrollo tumoral.

En general los resultados de este trabajo demuestran que las células de CC expresan a IL-15 y las diferentes subunidades del IL-15R, y posiblemente su expresión contribuya al desarrollo de las células tumorales.

## 12. Conclusión.

Los resultados de este trabajo demuestran que las líneas celulares de cáncer cervical HeLa, SiHa, CaSki e INBL expresan la IL-15 de manera basal.

Adicionalmente se demuestra que las líneas celulares de cáncer cervical expresan la subunidad IL-15R $\alpha$  y se valida la expresión de la subunidad IL-15R $\beta$  y  $\gamma$ c.

La expresión de IL-15 e IL-15R $\alpha$  es mayor con respecto a los linfocitos de sangre periférica.

La expresión de IL-15 e IL-15R nos sugiere que puede desempeñar un papel importante en el desarrollo del cáncer cervical.

### 13. Perspectivas.

Es evidente que la expresión de IL-15 y el IL-15R desempeña un papel importante en las células de CC, sin embargo, se requieren más estudios para demostrar esta aseveración. Por tanto, se proponen las siguientes perspectivas.

- Analizar la presencia de IL-15 y las subunidades del IL-15R a nivel de proteína en las células de CC para confirmar si nuestros resultados de expresión se correlacionan con la proteína.
- Cultivar a las células de CC en presencia de diferentes concentraciones de IL-15 exógena para demostrar si regula su proliferación.
- Cultivar a las células de CC en presencia de antagonistas de IL-15 y las subunidades del IL-15R para demostrar la dependencia de las células de CC por IL-15 y la funcionalidad del IL-15R.
- Analizar si la IL-15 regula la migración e invasión de las células de CC, así como lo hace en otras células tumorales reportadas.



## Referencias

1. Álvarez Adalucy. (2012). carcinogénesis inducida por el virus del papiloma humano. *Investigaciones Andinas*, 14 (24), 438-456.
2. Alessandra Handisurya. (2001). Differential Expression of Interleukin-15, a Pro-Inflammatory Cytokine and T-Cell Growth Factor, and Its Receptor in Human Prostate. *the prostate*, 251-262.
3. Anjali Mishra. (2014). Molecular Pathways: Interleukin-15 Signaling in Health and in Cancer, *Investigación clínica del Cáncer: publicación oficial de la Asociación Estadounidense para la Investigación del Cáncer*, 20 (8), 2044–2050.
4. Audirac Astride. (2016). Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. *PLoS One*. 11 (4), e0153274.
5. Bannwart Cristina. (2007). Interleukin-15: its role in microbial infections. *scielo*, 562-575.
6. Brittany Holmesa. (2019). Virus-associated carcinomas of the head & neck: Update from the 2017 WHO classification. *elsevier*, 29-42.
7. Chial Heidi (2008). Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. . *Nature Education* , 33p.
8. Crosbie Emma. (2013). Human papillomavirus and cervical cancer. *The Lancet* . .

9. Marina Fabbi. (2016). Dual Roles of IL-15 in Cancer Biology. *Journal of Cytokine Biology*, 103p.
10. Guo Yin. (2017). Immunobiology of the IL-15/IL-15R $\alpha$  complex as an antitumor and antiviral agent. *Cytokine & growth factor reviews*, 10-21
11. Hanahan Douglas. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 57-70.
12. Hanahan Douglas. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 646-674.
13. Hiroki Kuniyasu. (2003). Interleukin-15 Expression Is Associated with Malignant Potential in Colon Cancer Cells. . *clinical cancer research* , 86-95
14. Huaqin Yuan. (2015). Transmembrane-Bound IL-15–Promoted Epithelial-Mesenchymal Transition in Renal Cancer Cells Requires the Src-Dependent Akt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin Pathway. *Neoplasia*, 410-420
15. Giron Julien. (2011). Interleukin-15 is a major regulator of the cell-microenvironment interactions in human renal cancer. *bulletin du cancer*, 35-39
16. Kishida Tsunao. (2003). Interleukin (IL)-21 and IL-15 genetic transfer synergistically augments therapeutic antitumor immunity

and promotes regression of metastatic lymphoma. . *Mol Ther*, 522-558.

17. Rocha Leticia (2004). Interleukin-2 (IL-2) Receptor-Betagamma Signalling Is Activated by c-Kit in the Absence of IL-2, or by Exogenous IL-2 via JAK3/STAT5 in Human Papillomavirus-Associated Cervical Cancer. Interleukin-2 (IL-2) Receptor-Betagamma Signalling Is Activated by c-K. *Cell signal*, 1239-1247
18. Vega Mayra, (2018). Deteccion de oncoproteinas E6/E7: una alternativa para el tamizaje de cáncer de cérvix. detección de oncoproteínas e6/e7: una alternativa para el tamizaje de cáncer de cérvix. *Revista Experiencia en Medicina del Hospital Regional Lambayeque*, 108-111.
19. Dharan Murali. (2019). The Yin and Yang of cancer genes. *elsevier*, 121-133.
20. OMS. (2018). CANCER . <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
21. Qiyue Hu. (2018). Discovery of a novel IL-15 based protein with improved developability and efficacy for cancer immunotherapy. *scientific reports*, 1-11.

22. Ghittoni Raffaella. (2010). Las propiedades biológicas de las oncoproteínas E6 y E7 de los virus del papiloma humano Virus Genes . *Investigaciones ANDINA*, 130p
23. Rincón Olga. (2007). Virus del papiloma humano, respuesta inmune y cáncer cervical: una relación compleja. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 202-212.
24. Robinson Tanya (2017). The potential and promise of IL-15 in immuno-oncogenic therapies. *immunology letters*, 159-168.
25. Santana Rosa (2018). IL-15 is a component of the inflammatory milieu in the tumor microenvironment promoting antitumor responses. *PNAS*, 599-608.
26. Santos Alicia. (2006). Interleucina-15: una citocina relevante en la homeostasis linfoide y en enfermedades autoinmunes. . *biotecnologia aplicada* , 79-86.
27. Sebastian Wittnebel. (2007). Membrane-bound interleukin (IL)-15 on renal tumor cells rescues natural killer cells from IL-2 starvation-induced apoptosis. *Cancer Research* , 5595-5599.
28. Marta Eugenia (2012). capitulo 12. En R. D. Victoria del Castillo Ruiz, *Genetica clinica* (págs. 357-359). mexico: manual moderno.

29. Trinder Peter (1999). Constitutive and IFN-gamma regulated expression of IL-7 and IL-15 in human renal cell cancer. *International Journal of Oncology*, 23-54.
30. Mendiola Arturo. (2014). IL-2 enhances cervical cancer cells proliferation and JAK3/STAT5 phosphorylation at low doses, while at high doses IL-2 has opposite effects. *Cancer Invest.* , 115-25.
31. Yu Guang He. (2004). Expression and Possible Function of IL-2 and IL-15 Receptors on Human Uveal Melanoma Cells. *IVOS*, 4240-4246.
32. Sandy Azzi. (2015). Human Renal Normal, Tumoral, and Cancer Stem Cells Express Membrane-Bound Interleukin-15 Isoforms Displaying Different Functions, *Neoplasia*, Volume 17, numero 6, Pages 509-517,
33. Santana Carrero. (2019). IL-15 es un componente del medio inflamatorio en el microambiente tumoral que promueve respuestas antitumorales. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América*, 116 (2), 599–608.