



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**“Análisis de la expresión de IL-15 y su receptor IL-15R a partir
de la base de datos TCGA/GTEX y en líneas celulares de cáncer
de cérvix, mama, hígado y pulmón”**

T E S I S

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta:

EDUARDO TONAMEYOTZIN GUZMÁN ROJAS

Director de tesis:

Dr. LEONARDO TRUJILLO CIRILO

Ciudad de México, 2024





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.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Oncología Celular, L4-PB, de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer (UIDCC), perteneciente a la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ), de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza -UNAM, bajo la dirección del Dr. Leonardo Trujillo Cirilo y el asesoramiento de la Dra. Rosalva Rangel Corona.

Este trabajo contó con el apoyo financiero del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) con clave de proyecto: PAPIIT IN-222721.

De igual forma, este trabajo de investigación contó con el apoyo del Programa para el Impulso a la Titulación por Actividades Académicas en el Extranjero (PITAAE) 2023.

DEDICATORIA

A mi madre, por todos los valores inculcados, por apoyarme en cada decisión y por motivarme a seguir adelante a pesar de todas las adversidades que se presentaron en el camino.

A mi padre, por haber sido uno de mis pilares en mi vida, por la motivación que me inculcaste a no conformarme con lo mínimo, y porque aún tras tu partida te seguiré demostrando que este sueño es posible.

A mi hermano, quien, a pesar de no tener la mejor relación, ha sido junto con mi madre mi mayor sustento en la vida.

A mi familia, quienes siempre han visto por mí, gracias por ofrecerme su apoyo incondicional de tantas maneras sin esperar algo a cambio, sin todos ustedes yo no hubiese conseguido lo que hoy en día tanto me ha costado.

Mas que a mis amigos, a mis hermanos, Carlos, Iván, José, y Rafael por todo lo vivido durante estos años, por demostrarme que a pesar de haber tomado caminos diferentes siempre estaremos en nuestros mejores y peores momentos.

“Cuando una persona ha significado mucho en nuestras vidas, para bien o para mal, y se ha ido, no debemos tratar de encerrarla en el olvido, porque el olvido tiene una puerta que se abre cuando menos lo esperamos y nos lanza los recuerdos como caballos salvajes que nos plantean el alma. Aprende a domar el recuerdo.... Los recuerdos domados no lastiman”

- Claudia Celis, Donde habitan los ángeles

“Cancer is a wound that does not heal”

“El cáncer es una herida que no cicatriza”

Harold F. Dvorak (1986)

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM/FEZ ZARAGOZA

A la Dra. Rosalva Rangel Corona, por permitirme formar parte del Laboratorio de Oncología Celular.

Al Dr. Leonardo Trujillo Cirilo, por el asesoramiento de este proyecto, los conocimientos proporcionados y por la mucha paciencia de que llegaría a concluirlo.

A todo el Laboratorio de Neuropsicofarmacología Traslacional de la Universidad Miguel Hernández de Alicante por abrirme las puertas de su Laboratorio y por haberme compartido sus conocimientos en el área de investigación, la vida científica, así como a nivel personal.

Al Dr. Francisco G. Vázquez Cuevas del Instituto de Neurobiología de la UNAM y a la Dra. Erika P. Rendón Huerta del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM por su apoyo en proporcionarme la línea celular HepG2 para la conclusión de mis experimentos.

Contenido

Resumen.....	9
1. Introducción.....	10
2.1. Biología de Interleucina-15.....	10
2.2. Receptor de Interleucina-15.....	12
2.3. Señalización de IL-15 en células T.....	14
2.4. IL-5 y células B.....	15
2.5. IL-15 y células NK.....	16
2.6. Otras células inmunes.....	17
2.7. IL-15 en la respuesta inmune celular.....	17
2.8. IL-15 y Neoplasias Hematológicas.....	18
2.9. IL-15 y tumores sólidos.....	19
2.10. Acción antitumoral de IL-15 en cáncer de hígado.....	20
2.11. IL-15 y cáncer de mama.....	21
3. Planteamiento del problema.....	22
4. Justificación.....	23
5. Hipótesis.....	24
6. Objetivos.....	24
7. Metodología.....	25
7.1. Cultivo y proliferación de líneas celulares.....	25
7.2. Extracción de ARN.....	25
7.3. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).....	26
7.4. Citometría de flujo.....	27
7.5. Adquisición de datos y comparación de la expresión de ARN.....	27
7.6. Análisis Estadístico.....	28

8. Resultados	29
8.1. Análisis de la expresión de IL-15 en tejidos normales y tumorales de Cérvix, Mama, Hígado y Pulmón a partir de la base de datos TCGA/Gtex.....	29
8.2. Análisis de la expresión de IL-15R α en tejidos normales y tumorales de Cérvix, Mama, Hígado y Pulmón a partir de la base de datos TCGA/Gtex.....	30
8.3. Análisis de la expresión de IL-15R β en tejidos normales y tumorales de Cérvix, Mama, Hígado y Pulmón a partir de la base de datos TCGA/Gtex.....	31
8.4. Análisis de la expresión de γc en tejidos normales y tumorales de Cérvix, Mama, Hígado y Pulmón a partir de la base de datos TCGA/Gtex.....	32
8.6 Análisis de la expresión de IL-15 en tumores de Cérvix, Mama, Hígado y Pulmón con respecto al estadio FIGO a partir de la base de datos TCGA/Gtex.....	33
9. Análisis de supervivencia de pacientes con cáncer de Cérvix, Mama, Hígado y Pulmón con respecto a la baja o alta expresión de IL-15, IL-15R α , IL-15R β y γc a partir de la base de datos TCGA/Gtex.....	35
9.1 Análisis del Pronóstico de Supervivencia en Cérvix	36
9.2 Análisis del Pronóstico de Supervivencia en Mama.....	37
9.3 Análisis del Pronóstico de Supervivencia en Pulmón	38
9.4 Análisis del Pronóstico de Supervivencia en Hígado	39
10. Gel de integridad de ARN en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2.....	40
10.1 Expresión de IL-15 en LSPH como control positivo	40
10.2 Expresión del IL-15 en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2.....	41
10.3 Expresión del IL-15R α en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2.....	42
10.4 Expresión del IL-15R β en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2.....	43
10.5 Expresión del γc en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2.....	43
11. Presencia de IL-15R α en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2 a nivel intra y extracelular.....	44
12. Discusión.....	46

13. Conclusión	56
14. Perspectivas.....	57
Referencias Bibliográficas	58
Anexos	71

Resumen.

La IL-15 es una citocina que participa en la homeostasis de la respuesta inmune innata y adaptativa, además, se ha documentado su participación en diferentes enfermedades. Diversos estudios han demostrado que IL-15 puede tener actividad antitumoral cuando se administra a altas concentraciones en pacientes con cáncer hematológico, sin embargo, también se ha reportado que promueve actividades protumorales en diferentes tipos de cáncer. En la actualidad no hay suficiente información que demuestre el papel que desempeña esta citocina en algunos tumores sólidos, por tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar la expresión diferencial de IL-15 y su receptor IL-15R en diferentes tipos de cáncer sólido como son cáncer de cérvix (CC), mama (CDI), hígado (HCC) y pulmón (CPCNP) para dilucidar su papel en estos tumores. Se analizó la expresión de IL-15 y su receptor IL-15R en los tumores antes mencionados a partir los datos de expresión génica de la base TCGA y Gtex. Además, mediante RT-PCR y citometría de flujo se validó la expresión y presencia de IL-15 e IL-15R α en líneas celulares derivadas de estos tumores. Los resultados de este trabajo demuestran una mayor expresión de IL-15 en los tumores de CC y una menor expresión en los tumores de HCC y CDI. En el caso de IL-15R α se presenta una mayor expresión en HCC y una menor expresión en CDI y CPCNP. Para IL-15R β y γ c se observa una mayor expresión en los tumores. El análisis con respecto a la edad demuestra una mayor expresión de IL-15 en los tumores HCC y CPCNP. El análisis de Kaplan-Meier demuestra que la alta expresión de IL-15R α disminuye la supervivencia de los pacientes con cáncer HCC. Por su parte, en las líneas celulares se demostró una expresión basal de IL-15 y su receptor IL-15R, observando una mayor expresión preferentemente en la línea celular HepG2. Adicionalmente, se demuestra por citometría de flujo la presencia de IL-15R α en la membrana de la línea celular HepG2 y MCF7. En general los resultados de este trabajo demuestran que IL-15 y su receptor IL-15R tienen una expresión diferencial en los tumores con respecto a los tejidos normales, esta expresión depende del tipo de tumor y la edad de los pacientes. Además, se encuentra estos genes expresados en las líneas celulares afines a los tumores de estudio. Los resultados de esta tesis dan evidencia de un papel importante que puede desempeñar IL-15 y su receptor IL-15R en el desarrollo tumoral, en algunos casos puede desempeñar acciones pro o antitumorales, esto puede depender del tipo de tumor y contexto celular.

1. Introducción.

La Interleucina-15 (IL-15) es una citocina pleiotrópica, crucial para la función y homeostasis de las células asesinas naturales (NK) y linfocitos de memoria T CD8+, vinculando la respuesta inmune innata y adaptativa (Guo et al., 2017). La IL-15 fue identificada por primera vez en 1994 por Grabstein *et al* como un factor de crecimiento de linfocitos T que sinergiza en muchas funciones biológicas con Interleucina-2 (IL-2) (Grabstein et al., 1994). Todos los efectos biológicos de IL-15 los desencadena mediante su unión al receptor de IL-15 (IL-15R) el cual está compuesto por tres subunidades independientes, (1) la subunidad de alta afinidad IL-15R α , (2) la subunidad IL-15R β que comparte con el receptor de IL-2 (IL-2R) y (3) la subunidad γ común (γ c) que comparte con varios receptores de citocinas (Bamford et al., 1994). Se ha descrito que IL-15 e IL-15R pueden tener un papel muy importante en el desarrollo tumoral, sin embargo, aún no queda claro su papel protumoral, ya que se ha reportado que también puede desempeñar papeles antitumorales cuando se administra a diferentes concentraciones (Azimi et al., 1998) (Yamada et al., 1998) (Döbbeling et al., 1998) (Waldmann T., 2003). Resultados de nuestro grupo de trabajo han demostrado que IL-2 promueve la proliferación de las células tumorales de cérvix cuando se administra a bajas concentraciones, dado que IL-2 e IL-15 sinergizan en varias funciones biológicas y comparten subunidades en su receptor, se sugiere que IL-15 puede promover el desarrollo tumoral en diferentes tumores sólidos, así como lo hace IL-2 en el cáncer de cérvix (Rocha-Zavaleta et al., 2004). El complejo IL-15/IL-15R es de suma importancia en la homeóstasis de la respuesta inmune, sin embargo, en el microambiente tumoral puede impulsar el desarrollo neoplásico. Debido a que aún no queda claro el papel del complejo IL-15/IL-15R en el desarrollo tumoral el objetivo de este trabajo fue analizar la expresión de IL-15 e IL-15R en diferentes tumores sólidos como son el de mama, hígado, pulmón, cérvix con respecto a tejidos normales. Adicionalmente, se evaluó la expresión de IL-15/IL-15R en líneas celulares afines a los tumores sólidos antes mencionados y se determinó la presencia de IL-15R en la membrana celular por citometría de flujo. Los resultados de este trabajo nos ayudaran a entender el papel que desempeña IL-15 en el desarrollo tumoral.

2.1. Biología de Interleucina-15.

La Interleucina-15 (IL-15) es una citocina crucial para la homeostasis de las células asesinas naturales (NK) y linfocitos de memoria T CD8⁺ (Guo et al., 2017). La IL-15 pertenece a la familia

de las citocinas de cuatro haces α -hélice que incluye citocinas como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 e IL-9 (Grabstein et al., 1994). IL-15 es producida constitutivamente por diferentes tipos de células como monocitos, macrófagos, células dendríticas, células estromales, células epiteliales y células musculares (Fiore et al., 2020).

La IL-15 fue identificada por primera vez en 1994 por Grabstein *et al* como un factor de crecimiento de linfocitos T que comparte aproximadamente un 19% de homología de secuencia y muchas de las propiedades biológicas de Interleucina-2 (IL-2) (Grabstein et al., 1994) . El gen de IL-15 fue cartografiado en el cromosoma 4q31 (humano) y en la región central del cromosoma 8 (ratón) mediante hibridación *in situ* por fluorescencia (Anderson et al., 1995).

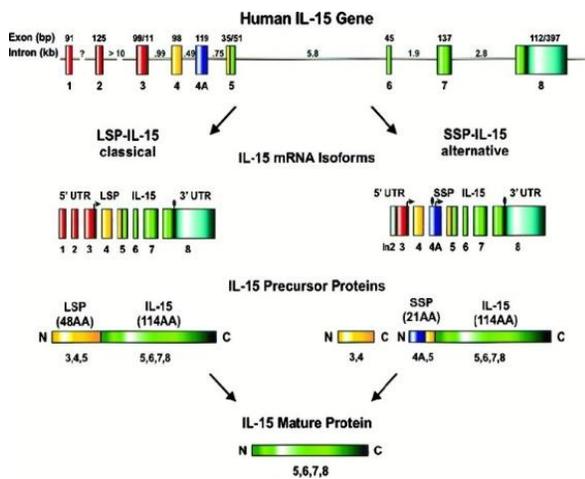


Figura 1. Estructura de proteína, ARNm y gen de IL-15 humana. El locus de la IL-15 humana consta de 9 exones y 8 intrones y está ubicado en el cromosoma 4q31. Se han descrito dos isoformas de ARNm de IL-15, la LSP clásica y la SSP alternativa, y ambas codifican una proteína madura IL-15 idéntica de 114 aminoácidos (AA). Tomado de Fehniger, 2001.

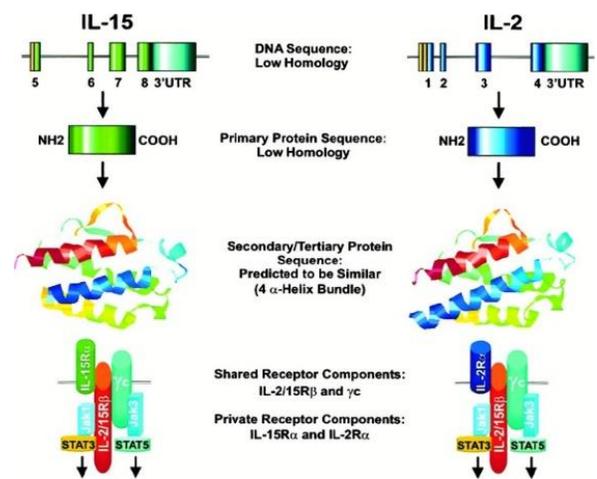


Figura 2. Comparación de la homología de IL-15 e IL-2 a nivel de ADN, proteína primaria y proteína terciaria. La estructura general de intrón/exón de la porción del gen IL-15 que codifica la proteína IL-15 madura (4 exones y 3 intrones) es similar al gen IL-2. Sin embargo, de acuerdo con otros miembros de la misma familia, hay poca homología primaria entre IL-2 e IL-15 a nivel de nucleótidos o proteínas. Tomado de Fehniger, 2001.

El gen de la IL-15 consta de nueve exones (exones 1-8 y un exón 4a recién descubierto) y ocho intrones que abarcan al menos 35 kb. La proteína de IL-15 es una glicoproteína de 14 a 15 kDa con dos reticulaciones de disulfuro de cistina en las posiciones Cys42-Cys88 (homólogas a IL-2) y Cys35-Cys85, y tres residuos de asparagina. La IL-15 tiene dos isoformas: una con 21 aminoácidos de péptido señal corto (SSP) y la otra con 48 aminoácidos de péptido señal más largo

(LSP). La isoforma SSP-IL-15 se traduce eficazmente pero no se secreta, limitándola al citoplasma y al núcleo (Bergamaschi et al., 2009), mientras que la isoforma LSP-IL-15 ha sido detectada dentro del sistema Retículo Endoplásmico/Aparato de Golgi. Parece que SSP-IL-15 se traduce de manera eficiente pero no es secretada, mientras que LSP-IL-15 se traduce de manera menos eficiente, pero tiene un tráfico complejo a través de la vía ER/Golgi y se secreta de la célula en niveles bajos (Kurys et al., 2000). Sin embargo, la forma SSP-IL-15 se secreta en forma de un complejo con IL-15R α , con una vida media muy corta (Bergamaschi et al., 2009).

2.2. Receptor de Interleucina-15

La IL-15 existe en varias formas funcionales: (1) una forma monomérica soluble (sIL-15), (2) en forma de un complejo soluble asociado a la subunidad alfa del receptor (sIL-15/IL-15R α), (3) la forma transpresentada (tp-IL-15) y (4) la forma transmembrana (tmb-IL-15) (Bamford et al., 1994). El receptor de Interleucina-15 (IL-15R) consta de tres subunidades independientes, la subunidad alfa (IL-15R α), subunidad beta del IL-2R (IL-2R β /IL-15R β) y la subunidad gamma común (γ_c) de receptores de citocinas (Fiore et al., 2020).

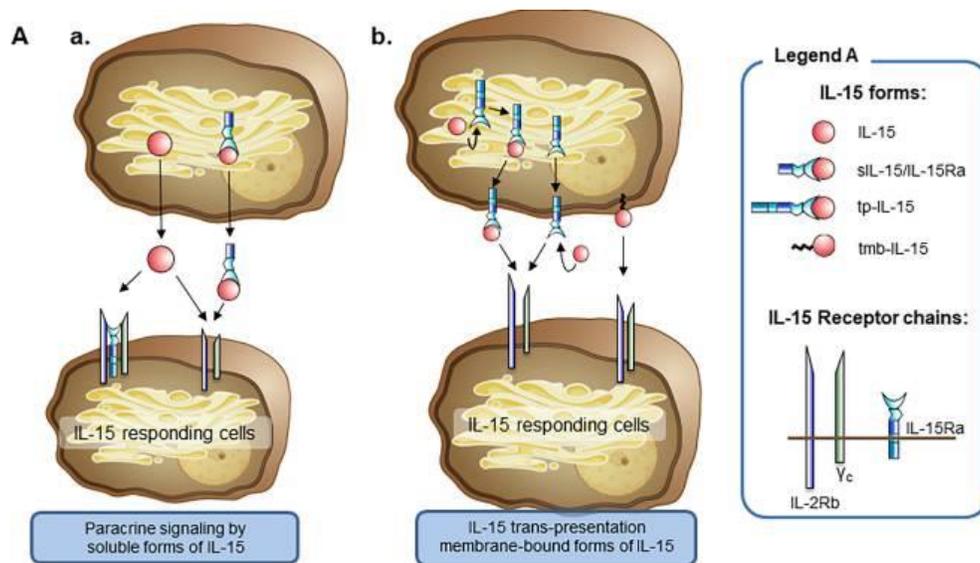


Figura 3. Diferentes complejos de IL-15. Tomado de Fiore, 2020. IL-15 existe bajo varias formas funcionales: (1) una forma monomérica soluble (sIL-15), (2) el complejo soluble asociado a la subunidad alfa del receptor (sIL-15/IL-15R α), (3) la forma transpresentada (tp-IL-15) y (4) la forma transmembrana (tmb-IL-15). **a)** Señalización paracrina para formas solubles de IL-15. **b)** Diferentes formas de transpresentación de IL-15 unida a membrana

La forma sIL-15 se puede unir al dímero IL-15R β / γ c de afinidad intermedia o al receptor trimérico IL-15R α /IL-15R β / γ c de alta afinidad, mientras que la forma sIL-15/IL-15R α solo se une al dímero IL-15R β / γ c (Fiore et al., 2020). Además de los complejos solubles, IL-15 puede asociarse a la membrana celular a través de la comunicación celular que se da entre células (Giron-Michel et al., 2005).

La forma tp-IL-15 y tmb-IL-15 se pueden asociar a la subunidad IL-15R α de la membrana de una célula adyacente, ambas formas van a desencadenar una señalización en trans sobre las células circundantes que expresan el dímero IL-2R β / γ c (transpresentación). En la forma tp-IL-15, la IL-15 se asocia a IL-15R α dentro de las células antes de emerger a la superficie celular o sIL-15 se puede unir fuera de la membrana a IL-15R α para promover consecuentemente la transpresentación con IL-15R β / γ c. (Fiore et al., 2020).

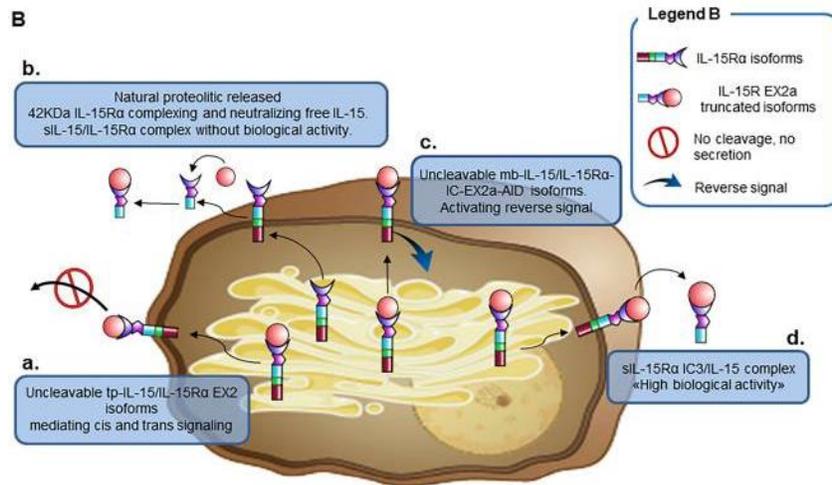


Figura 4. Complejo tp-IL-15 / IL-15R α no escindible que lleva las isoformas EX2 de IL-15R α , competentes para la señalización en cis y trans. Tomado de Fiore, 2020. a) NPR-IL-15R α sin actividad biológica. b) IL-15R α -IC-EX2a-AID, competentes para la señalización inversa. c) Isoforma IL-15R α -IC3 con alta actividad biológica. d) NPR, liberación proteolítica natural.

Se ha demostrado que la transpresentación es el mecanismo dominante por el cual IL-15 emite su señal *in vivo* para apoyar el desarrollo y las funciones de las células NK y T CD8 (Mortier et al., 2009). Se requiere que IL-15 se una a IL-15R α dentro de las células antes de emerger a la superficie celular (Mortier et al., 2008). Este mecanismo de señalización requiere la escisión del complejo tp-IL-15 de las células presentadoras y su internalización por las células que almacenan y utilizan la forma tp-IL-15 escindida para su propia proliferación y supervivencia (Tamzalit et al., 2014).

Debido a que IL-15 tienen un papel importante en el sistema inmune su expresión está regulada en tres niveles: transcripción, traducción y secreción (Waldmann T. A., 1999). El aumento de expresión de IL-15 a nivel de ARNm se ve incrementado cuando las células se encuentran con patógenos. Este incremento, está controlado por los elementos de respuesta de a Interferón (IFN), el Factor regulador de interferón (IRF) IRF-E y el Factor nuclear KB (NF- κ B) (Waldmann T. A., 1999).

2.3. Señalización de IL-15 en células T

En los linfocitos, la unión de IL-15 al heterodímero IL-15R $\beta\gamma$ c induce la activación de JAK1 (Janus quinasa 1) que posteriormente fosforila a las proteínas Transductor de señal y activadoras de la transcripción 3 (STAT3) a través de la cadena IL-2R β /IL-15R β , (Miyazaki et al., 1994) (Lin J. X., 1995). Las proteínas STAT3 y STAT5 se fosforilan, forman heterodímeros que luego se trasladan al núcleo donde activan la transcripción de la proteína anti-apoptótica del linfoma de células B2 (bcl-2) y los protooncogenes *c-myc*, *c-fos* y *c-jun* (Shibuya et al., 1992) (Lord et al., 2000). Sin embargo, IL-15 también puede activar vías de señalización alternativas como la vía de proteína cinasa B o AKT la cual es activada mediante una vía dependiente de fosfatodilinositol 3-quinasa (PI3K). En linfocitos este proceso ocurre con la ausencia de sitios de unión a P13K en IL-2RBY (Gu et al., 2000) (Ellery, 2002). Mediante una proteína adaptadora de fosfotirosina (Shc), se da el mecanismo de señalización, esta proteína se une a un residuo de fosfotirosina en la IL-2/15R β , lo que conlleva a la activación de la proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (Grb2) y en Akt a través de la vía Shc \rightarrow Grb2 \rightarrow Gab2 \rightarrow PI3K \rightarrow Akt, dando como resultado una proliferación celular y/o supervivencia (Gu et al., 2000).

En una tercera vía de señalización que sigue a la presentación en trans de IL-15 a IL-15R $\beta\gamma$ es la activación de Grb2 mediada por Shc, esta última se une al factor de intercambio de nucleótidos de guanina (SOS) para formar un complejo Grb2-SOS que luego activa el vía Ras-Raf al facilitar la eliminación de Guanosin Difosfato (GDP) de un miembro de la subfamilia Ras, que a su vez activa la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) para la proliferación celular (Adunyah et al., 1997). Por tanto, la fosforilación de Grb2 mediada por IL-15 regula las vías de PI3K y MAPK. En conjunto, estos mecanismos de señalización desencadenados por IL-15 inducen la expresión y activación de moléculas río abajo como son *c-myc*, *c-fos*, *c-jun*, Bcl-2 y NF- κ B (Miyazaki et al., 1995).

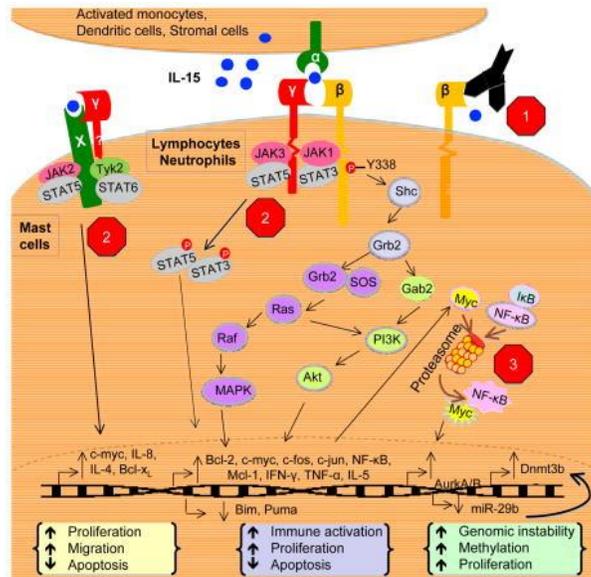


Figura 5. Señalización intracelular de IL-15. Tomado de Mishra, 2014. IL-15 se une a su IL-15R α de alta afinidad expresada en una célula presentadora de antígeno y, a su vez, se presenta in trans al heterodímero IL-2 / 15R β . A partir de ahí, la activación de las células efectoras puede proceder a través de tres vías distintas: Una implica la activación de JAK-STAT; Una segunda vía implica el reclutamiento de Shc a un sitio fosforilado en la cadena IL-2 / 15R β seguido de la activación de Grb2; Grb2 puede seguir una ruta PI3K para fosforilar Akt, o puede unirse a SOS para activar RAS-RAF y finalmente MAPK.

2.4. IL-5 y células B

La IL-15 regula la localización de células B, a través del receptor Ly49D el cual es una glicoproteína transmembranal tipo II de las lectinas tipo C, este receptor se localiza en células B inmaduras, las cuales se unirán al complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHCI) en los tejidos periféricos, y así, activando la señalización de la Tirosina quinasa del bazo (SyK) Fuente especificada no válida..

Esta señalización regula al alza la secreción de IL-12 e IL-18 , lo que promueve la expresión de IL-15. La IL-15 regula la secreción de IFN- γ a bajos niveles e inhibe la orientación de las células B inmaduras hacia los ganglios linfáticos o sitios inflamatorios a través de su reordenamiento citoesquelético y migración. IL-15 regula la proliferación de las células B a través de las vías IL-15-STAT5 e IL-15-SHC-Ras-Raf-ERK, y regula la inhibición de la apoptosis a través de vía IL-15 – Syk – PCL1(Fosfolipasa C) (Bulanova et al., 2001).

2.5. IL-15 y células NK

Varios estudios han demostrado que la IL-15 aumenta la activación, proliferación, supervivencia y maduración de las células NK a través de las vías de señalización Jak1/Jak3, STAT1/3/5 y AKT-XBP1s (Gotthardt et al., 2019), (Wang et al., 2019), (Konjević et al., 2019).

La característica más distintiva de los precursores de NK (NKP) es la expresión de CD122 (IL-15R/IL2R β), que es fundamental en la transducción de señales de IL-15 a través de JAK1/3 y STAT5. La pérdida de uno de estos componentes excluye el desarrollo de células NK (Gotthardt & Sexl, 2016) (Park et al., 1995). Esto ya destaca el papel central de la cascada de señalización JAK/STAT en el desarrollo y maduración de las células NK. (Gotthardt et al., 2019).

La vía de señalización que involucra a AKT y la proteína de unión a X-box 1 (XBP1s) identificada por Wang, et al., 2019, consiste en un factor de transcripción que regula los genes de respuesta al estrés celular (Calfon et al., 2002), que se activa en respuesta a IL-15 en células NK humanas. La IL-15 induce la fosforilación de AKT, lo que provoca una desubiquitinación, aumento de la estabilidad y acumulación nuclear de la proteína XBP1s. Las XBP1 se unen al gen y reclutan al factor de transcripción T-box TBX21 (T-BET), que codifica la granzima B, esto conduce a un aumento de la transcripción. Las XBP1 regulan positivamente la actividad citolítica de las células NK, contra las células leucémicas y también son necesarias para la supervivencia de las células NK mediadas por IL-15 a través de un mecanismo anti-apoptótico. Por tanto, la vía de señalización de IL-15-AKT-XBP1s contribuye a mejorar las funciones efectoras y la supervivencia de las células NK humanas (Wang et al., 2019).

Además, se ha demostrado que un superagonista de IL-15 (IL-15SA), puede superar la inmunosupresión de células NK mediada por TGF- β 1, la activación de la vía mTOR (diana de la rapamicina en mamíferos) y el bloqueo de la transcripción inducida por la vía de señalización del factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β) (Mao et al., 2016) (Fujii et al., 2018). La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) es un mecanismo fundamental de la terapia antitumoral mediado por las células NK con anticuerpos antitumorales, debido a la expresión constitutiva del receptor Fc de baja afinidad (FcRIIIa o CD16) en células NK, (Nimmerjahn, 2007). Los estudios han demostrado que la actividad anticancerosa dependiente de ADCC de las células NK aumenta en presencia de IL-15 (Zhang et al., 2018) (Moga

et al., 2008) (Fantini et al., 2019) . Además, otros estudios han demostrado que la IL-15 afecta la expresión de proteínas implicadas en la actividad de las células NK. Por ejemplo, INF- γ , NKG2D y granzima B se regulan significativamente hacia arriba en presencia de IL-15 (Waldmann et al., 2020) (Zhao et al., 2019) (Dubois et al., 2017). Estos y varios otros estudios han demostrado el efecto estimulante de IL-15 sobre la actividad citotóxica de las células NK y la producción de citocinas (Zhang et al., 2021).

2.6. Otras células inmunes

IL-15 al unirse a IL-15R induce el crecimiento de mastocitos mediante la activación de las vías JAK2 / STAT5, y la diferenciación por la vía de la Tirosina quinasa 2 (TYK2) /STAT6/IL-4 (Jackson, 2005). Al inducir las proteínas BCL-xL (Linfoma de células B extragrande), la IL-15 también bloquea la apoptosis de los mastocitos (Masuda et al., 2001). IL-15 induce la expresión de la proteína de diferenciación de células de leucemia mieloide (Mcl-1) en neutrófilos e inhibe la apoptosis (Bouchard et al., 2004). Para su mantenimiento y supervivencia, los neutrófilos dependen de la señalización de IL-15-JAK2 / 3, IL-15-P38 e IL-15-ERK, en lugar de la vía directa JAK-STAT. La IL-15 regula la fagocitosis de neutrófilos controlando la expresión de SyK (Ratthé & Girard, 2004) . Activa los neutrófilos estimulando la síntesis de ARN , el reordenamiento citoesquelético y los cambios morfológicos.

2.7. IL-15 en la respuesta inmune celular.

La activación de las células T es fundamental para la respuesta inmune adaptativa, la IL-15 producida por células dendríticas (DC), tiene actividades quimiotácticas y quimiocinéticas para las células T durante la interacción inicial de DC y células T (Jonuleit et al., 1997). IL-15 promueve la supervivencia de células T CD8⁺ de memoria sin estimulación previa (Berard et al., 2003) y mejora el cebado cruzado de células T CD4⁺ y CD8⁺, así como la proliferación de células efectoras de memoria (TEM) y células T CD8⁺ de memoria, (CD44^{hi} o CD122^{hi}) (Picker et al., 2006) . La IL-15 regula los subconjuntos de células T mediante la expresión del receptor co-inhibidor de linfocitos (KLRG1) y CD127 durante la fase de contracción de la respuesta inmune (Rubinstein et al., 2008), mantiene la respuesta de las células T de memoria inhibiendo la muerte celular inducida por IL-2 (AICD) de las células T efectoras (Marks-Konczalik et al., 2000),

respaldada por la administración *in vivo* de rIL-15 que protege a la mayoría de las células T efectoras (Becker et al., 2002).

2.8. IL-15 y Neoplasias Hematológicas

La IL-15 es una herramienta terapéutica prometedora, la expresión de IL-15 y su receptor IL-15R puede detectarse en varias líneas celulares derivadas de leucemias y derivadas de tumores sólidos, donde presentan propiedades protumorigénicas (Fiore et al., 2020).

Se ha sugerido una posible participación de IL-15 en la patogénesis de la leucemia de células T adultas (ATL), fundamentalmente durante la fase de infiltración en tejidos que expresan IL-15, como piel, pulmón, hígado y tracto gastrointestinal (Azimi et al., 1998) (Yamada et al., 1998). En el linfoma cutáneo de células T (CTCL), la IL-15 actúa como un factor que promueve el crecimiento y la viabilidad de estas células (Döbbeling et al., 1998). La IL-15 induce la proliferación de células B malignas, obtenidas de pacientes con leucemia linfocítica crónica de células B y leucemia de células pilosas (Trentin et al., 1996), e induce la proliferación de M-O7e, una línea celular de la leucemia mieloide aguda (AML) (Meazza et al., 1998).

En humanos, a diferencia de los ratones, la sIL-15R α no es detectable o está presente en niveles muy bajos en los sueros de donantes sanos (HD), pero aumenta en pacientes afectados por diferentes enfermedades. Por ejemplo, la leucemia de linfocitos grandes de células T (LGL) se caracteriza por un aumento de los niveles séricos de sIL-15R α e isoformas de sIL-15R α , lo que sugiere que provienen de diferentes fuentes celulares. Además, la expresión de IL-15R α también se regula al alza en las células mononucleares (PB) de los pacientes, este aumento de IL-15R α podría proteger a IL-15 de la proteólisis, disminuir el umbral de respuesta de IL-15 de las células, y el complejo sIL-15R α /IL-15 puede generar el complejo soluble. Ambos eventos pueden participar en la progresión de la enfermedad (Chen et al., 2012). Además, las células LGL expresan tp-IL-1, que a través de la señalización en *cis* y en *trans*, podría facilitar la expansión de las células leucémicas (Zambello et al., 1997).

La IL-15 puede actuar como factor de crecimiento y viabilidad de las células T malignas en pacientes con linfoma. Las lesiones cutáneas y las células T de los pacientes con linfoma cutáneo de células T muestran una sobreexpresión tanto de ARNm como de proteína de IL-15. En estos pacientes, la supervivencia de las células T CD4⁺ malignas depende, en las primeras etapas de la

IL-15 suministrada por el microambiente, pero durante la progresión de la enfermedad las células malignas, a través de la producción autocrina de IL-15 pueden respaldar de manera autónoma su crecimiento y supervivencia (Döbbeling et al., 1998). En la leucemia por virus linfocítico de células T humanas, la proteína Tax viral (un gen regulatorio trans-activador de genes virales/células huésped) induce la producción de IL-15 e IL-15R α , y estos bucles autocrinos de IL-15 conducen a la progresión de la leucemia (Azimi et al., 1998). En el mieloma múltiple, las células plasmáticas malignas presentan un receptor de IL-15 funcional con mayor expresión de la cadena IL-15R α y producción autocrina de IL-15, estos favorecen la supervivencia y proliferación de las células malignas independientemente de su microambiente (Tinhofer et al., 2000).

2.9. IL-15 y tumores sólidos

Se requiere un análisis más sistemático de la expresión de IL-15 en tumores sólidos, ya que también se ha publicado un efecto opuesto de la expresión de IL-15 en diferentes tipos de cáncer. Por un lado, la administración de IL-15 exógena en pacientes favorece la regresión tumoral y por el otro lado, se ha demostrado que IL-15 promueve la proliferación, supervivencia, migración, invasión y metástasis de células tumorales en estudios *in vitro* e *in vivo*. (Cierna et al., 2021).

Se ha demostrado que la IL-15 producida en cultivos de células de melanoma primario participa en los mecanismos de escape tumoral y en la activación de señales proinflamatorias (Pereno et al., 2000) (Barzegar et al., 1998). La administración de pequeñas concentraciones de IL-15 recombinante humana (rhIL-15) en ratones desnudos provoca el desarrollo de tumores mucho más agresivos en implantaciones subcutáneas de células de melanoma humano (Doucet et al., 1997). Los datos antes mencionados, junto con la detección de niveles elevados de sIL-15/IL-15R α en el suero de pacientes con melanoma metastásico (Bergamaschi et al., 2012), sugiere fuertemente que la generación de complejos sIL-15/IL-15R α intratumorales y/o circulantes puede contribuir al desarrollo de un microambiente tumoral favorable para la progresión tumoral y al escape inmunológico (Fiore et al., 2020).

La inmunotinción de 70 biopsias de cáncer de colon y la implantación de células de cáncer de colon humano en ratones desnudos muestran que la IL-15 es producida por células de carcinoma de colon metastásico, y puede inducir hiperplasia en la mucosa adyacente al cáncer de colon,

contribuyendo así a la angiogénesis y la progresión del tumor (Kuniyasu et al., 2003). Además, la IL-15 promueve *in vitro* la proliferación, la motilidad y la capacidad de invasión de las células de cáncer de colon y aumenta su resistencia a la apoptosis (Kuniyasu et al., 2001).

Los niveles elevados de sIL-15R α en el suero de pacientes con cáncer de cabeza y cuello, y una alta concentración de IL-15 intratumoral están fuertemente correlacionados con un resultado clínico deficiente (Nguyen et al., 2007) (Badoual et al., 2008). Los estudios clínicos informan una correlación entre las concentraciones altas de IL-15 intratumoral y un resultado clínico deficiente también en pacientes con cáncer de pulmón (Seike et al., 2007).

2.10. Acción antitumoral de IL-15 en cáncer de hígado

Las células T GBBz (Dominio coestimulador 4-1BB) y el complejo GPC3-CAR (Glypican-3-CAR-Receptor de antígeno quimérico), que coexpresan IL15 y / o IL21 de forma específica y eficaz destruyen células tumorales positivas para GPC3, incluido el Carcinoma Hepatocelular (HCC), de una manera dependiente del antígeno. Así mismo, la expresión constitutiva de IL15 e IL21 en células T menos diferenciadas, son protegidas de apoptosis durante exposiciones repetidas a células tumorales. La expresión combinada de IL15 e IL21 mantiene la expresión del factor de transcripción 1 de células T (TCF-1), un factor de transcripción crítico para el desarrollo y la supervivencia de las células T. Estos resultados proporcionaron una sólida justificación para evaluar IL15 e IL21 que coexpresan GBBz CAR en pacientes con tumores hepáticos. (Batra et al., 2020)

La IL-15 puede estimular la funcionalidad de las células NK intrahepáticas después de la exposición a HCC, lo que subraya el potencial terapéutico de esta citocina para aprovechar el potente potencial antitumoral de este gran componente de los infiltrados de tumores hepáticos (Easom et al., 2018).

La función de las células NK mediada por NKG2D se ve alterada en el carcinoma hepatocelular, debido a una expresión de NKG2D reducida de manera inapropiada. La estimulación de IL-15 en combinación con un anticuerpo monoclonal (mAb) específico de la secuencia A/B relacionada con el polipéptido MHC de clase I (anti-MICA/B) humanizado, podría restaurar la actividad de las células NK mediante la reconstitución de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

(ADCC) eficaz in vitro. Estos hallazgos proporcionan la base para posibles intervenciones inmunoterapéuticas basadas en células NK en el contexto del HCC (Mantovani et al., 2020).

2.11. IL-15 y cáncer de mama

Existen niveles cero de IL-15 en pacientes con cáncer de mama invasivo, basado en estos hallazgos, existe la hipótesis de que el aumento de la expresión de PD-L1 (Ligando 1 de muerte programada), detectado en pacientes con cáncer de mama con bajo nivel de IL-15 circulante es una consecuencia de la respuesta anti-tumoral atenuada. (Cierna et al., 2021).

Los NK-EVs_{IL-15} muestran una actividad citolítica significativamente mayor hacia las líneas celulares de cáncer humano (glioblastoma, cáncer de mama y cáncer de tiroides) y simultáneamente aumentan la expresión de moléculas asociadas con la citotoxicidad de las células NK. En comparación con los Vehículos extracelulares de células NK (NK-EV), los NK-EV_{IL-15} inhiben significativamente el crecimiento de células de xenoinjerto de glioblastoma en ratones (Zhu et al., 2019).

3. Planteamiento del problema.

El cáncer es una de las causas principales de muerte en el mundo, en 2018 hubo 18,1 millones de casos nuevos y 9,5 millones de muertes por cáncer a nivel mundial. Desde la década de los 90's, se ha demostrado que IL-15 juega un papel importante tanto en neoplasias hematológicas como en tumores sólidos. Se ha descrito que IL-15 puede desempeñar funciones antitumorales cuando se administra a altas concentraciones a los pacientes, sin embargo, también se ha reportado que IL-15 es un promotor del desarrollo tumoral dependiendo el tipo de tumor. Estas funciones opuestas de IL-15 han generado la necesidad de seguir estudiando el papel que desempeña durante el desarrollo tumoral, ya que, aun no queda claro sus funciones pro o antitumorales en los tumores sólidos. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que las células de Cáncer cervical expresan el receptor de IL-2, y que su estimulación con IL-2 exógena promueve su proliferación. Dado que IL-2 e IL-15 sinergizan en diferentes funciones biológicas, y además comparten la subunidad beta del receptor, nos sugiere que IL-15 también puede tener un papel importante en la proliferación de las células tumorales. Adicionalmente, el microambiente tumoral se encuentra asociado a un estado inflamatorio, resultado de la secreción de citocinas como la IL-15 por parte de las células del sistema inmunológico en respuesta a las células tumorales. La presencia de IL-15 en el microambiente tumoral puede contribuir a generar un estado de inmunosupresión que contribuya al desarrollo tumoral. En general, el estudio de IL-15 y su receptor en los tumores sólidos nos permitirá entender el papel que desempeña esta citocina durante el desarrollo tumoral, y de esta forma proponer estrategias terapéuticas más efectivas con IL-15 para los pacientes, puede ser de manera exógena o ser propuesto como un blanco terapéutico.

4. Justificación.

De acuerdo con GLOBOLCAN 2018, el cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial siendo responsable de uno de cada ocho muertes. Los carcinomas de mama, pulmonar, hígado, y cervical representan algunos de los principales tumores que de acuerdo con la OMS en el año 2021 presentaron los mayores índices de mortalidad e incidencia de casos en población mundial y en México.

En el año 2020, se estimó una incidencia de más de 2 millones de casos de cáncer de pulmón y se registraron 7 mil 811 casos nuevos en México (WHO, 2020). El carcinoma hepatocelular presenta una incidencia anual de 500 000 a 1 000 000 de casos, y más de 8 mil anualmente en México. Cada año se producen 1.38 millones de nuevos casos de cáncer de mama; En México, en 2019, por cada 100 mil mujeres de 20 años o más, se reportaron 35.24 casos nuevos de cáncer de mama (INSP, 2017). El cáncer cervical es la décima neoplasia más frecuente en México, de acuerdo con datos de Globalcan, durante 2018 hubo más de 7 mil 800 casos nuevos de cáncer cervical.

En México, el cáncer tiene un alta incidencia y mortalidad, ocupando el cuarto lugar en decesos. Factores como la disparidad económica y los precarios servicios de salud del país agravan la situación. Se han implementado diferentes campañas de prevención y detección oportuna, sin embargo, las costumbres sociales es uno de los factores que contribuye a la alta incidencia de esta enfermedad. La falta de tratamientos eficaces también puede ocasionar la reincidencia de los tumores. Recientemente se han propuesto diferentes tratamientos alternativos para tratar el cáncer, sin embargo, se encuentran en fase de validación y en algunos casos sus resultados no son tan favorables. Esto genera la necesidad de seguir investigando los mecanismos moleculares del cáncer para que en un futuro se puedan diseñar estrategias que permitan erradicar esta enfermedad. El análisis de expresión de IL-15 y su receptor IL-15 en diferentes tumores sólidos nos permitirá comprender el papel que desempeñan esta citocina durante el desarrollo tumoral.

5. Hipótesis.

Se ha demostrado que la administración de altas concentraciones de IL-15 en neoplasias hematológicas promueve acciones antitumorales, sin embargo, también se ha reportado que IL-15 es un promotor tumoral en algunos tumores sólidos (cabeza y cuello, colon, próstata y melanoma) bajo determinadas circunstancias. Por otro lado, se ha informado que IL-2 promueve la proliferación o induce la apoptosis a bajas o altas concentraciones respectivamente, IL-15 sinergiza con IL-2 en diferentes procesos celulares y comparten subunidades de su receptor. A pesar de estos estudios, hay tumores sólidos donde aún no queda claro el papel de IL-15. *Por tanto, al analizar la expresión de IL-15 y su receptor IL-15R en células tumorales de cérvix, mama, pulmón e hígado, se observará una diferencia de expresión con respecto a los tejidos normales.*

6. Objetivos.

General: Analizar la expresión de IL-15 y su receptor IL-15R en células tumorales de cérvix, mama, pulmón e hígado a partir de la base de datos TCGA/Gtex y líneas celulares.

Particulares:

Realizar un análisis de expresión de IL-15 e IL-15R en tumores de cérvix, mama, pulmón e hígado, y en muestras normales a partir de datos de expresión obtenidos de la base de datos TCGA y Gtex.

Realizar un análisis de expresión de IL-15 e IL-15R con respecto al estadio FIGO, edad y supervivencia a partir de datos de expresión obtenidos de la base de datos TCGA y Gtex.

Analizar la expresión de IL-15 e IL-15R en las líneas celulares tumorales MCF-7, HepG2, Sklu-1 y HeLa mediante RT-PCR.

Determinar la presencia de IL-15R en la membrana de las líneas celulares tumorales MCF-7, HepG2, Sklu-1 y HeLa mediante citometría de flujo.

7. Metodología

7.1. Cultivo y proliferación de líneas celulares

Las líneas celulares MCF-7, HepG2, Sklu-1 y HeLa se obtuvieron del banco de criopreservación del Laboratorio de Oncología Celular de la Facultad de Estudios Superiores de Zaragoza, se cultivaron con Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM). El medio de cultivo se suplemento con suero fetal (FBS), al 10%, 100 U/mL de penicilina y 100 µg / mL de estreptomina. Todas las células se cultivaron a 37 ° C, 5% de CO₂ y una atmósfera húmeda saturada.

7.2. Extracción de ARN

El ARN total se aisló de células cultivadas durante 24 h utilizando el protocolo descrito por Chomczynski y Sacchi, con Trizol (Invitrogen). Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, las células se retiraron de las botellas, esto se realizó decantando el medio de cultivo a un tubo falcon y agregando 5 ml de verseno o tripsina, se incubaron por 4 minutos. Tanto el medio de cultivo decantado como el verseno o tripsina agregados se centrifugaron durante 4 minutos a 2500 rpm, se procedió a retirar el sobrenadante y se realizaron lavados con PBS al botón celular, se le agrego 1 mL de Trizol, se resuspendió homogéneamente transfiriendo a un tubo eppendorf de 2 mL y se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente, cumplido el tiempo se le adiciono 200 µL de cloroformo, para una posterior agitación durante 15 segundos en un vortex, posteriormente se dejó reposar 10 minutos en hielo, y se centrifugo durante 15 minutos a 12000 rpm a 4°C. La parte acuosa se recuperó (zona superior transparente) y se pasó a otro tubo nuevo donde se le agrego 500 µL de isopropanol, se resuspendió y se dejó reposar 30 minutos en hielo, pasado el tiempo se volvió a centrifugar durante 15 minutos a 12000 rpm a 4°C. Se guardo la muestra 24 horas a -70°C. Pasado el tiempo nuevamente se centrifugo a las mismas condiciones anteriores (15 minutos a 12000rpm 4 C), se decantó el isopropanol, al botón que se formó se le adiciono 1 mL de etanol al 70 %, se resuspendió y centrifugo durante 5 minutos a 9500 rpm a 4°C, se decantó el etanol y se dejará evaporar a temperatura ambiente de 10 a 30 minutos.

7.3. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR)

Las muestras de ARN se trataron con ADNasa I (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ADN complementarios (ADNc) se sintetizaron a partir de 2 µg de ARN utilizando un sistema de RT-PCR (M-MLV, Invitrogen). En un volumen de reacción 25 µL con 1 µL de Oligo DT, 1.25 µL de desoxinucleótido trifosfato (dNTP), tampón 5 µL (Buffer M-MLV RT 5x) y 200 U/µL de la enzima M-MLV. La reacción siguiente se incubó a 37°C durante 60 min y posteriormente a 70 ° C para inactivarla. La amplificación por PCR para cada cebador se realizó con 5 µL de cDNA en un volumen de reacción de 25 µL con el kit Gotaq Hot Start (Promega) con 2,5 µM de MgCl₂, dNTPs 0.2 µM, tampón 1,4x (5x Green GoTaq Reaction Buffer), 1 µM de cada cebador, 0.65U de polimerasa GoTaq y una de temperatura de 2 min a 95 ° C, seguido de 30 ciclos de 50s a 95 ° C, 50s a 50–55 ° C y 2 min a 72 ° C. Los siguientes transcritos se utilizaron para PCR:

Tabla 1. Listado de las características de los primers empleados en los ensayos de RT-PCR

Transcrito	Tamaño (pb)	Primer	Secuencia	Tm
IL-15	152	Sentido	5'-ATT TTG GGC TGT TTC AGT GC-3'	54.3°C
		Antisentido	5'-ACT TTG CAA CTG GGG TGA AC-3'	56.0 °C
IL-15R α	183	Sentido	5'-GAC TTT GCC CAC TCT CTT CG-3	55.7°C
		Antisentido	5'-GCT CCC TGG AGT ACA AGC TG-3'	57.6°C
IL-2/IL-15R β	206	Sentido	5'-GCT GAT CAA CTG CAG GAA CA-3'	55.5°C
		Antisentido	5'-TGT CCC TCT CCA GCA CTT CT-3'	57.9°C

γc	159	Sentido	5'-GTG CTC AGC ATT GGA GTG AA-3'	55.5°C
		Antisentido	5'-TCC GTT CCA GCC AGA AAT AC-3	54.8°C
β -Actina	234	Sentido	5'-GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG-3'	53.5°C
		Antisentido	5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG -3'	55.5°C

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% .y se visualizaron bajo luz ultravioleta mediante tinción con bromuro de etidio.

7.4. Citometría de flujo

Posteriormente al cultivo, se realizará un lavado con PBS, se despegarán las células del sustrato agregando verseno y se centrifugara a 1500 rpm durante 7 minutos. Se resuspenderá en 100 μ L de PSB y se añadirán 10 μ L del anticuerpo anti-IL15R α , se homogenizará suavemente la suspensión, se incubará a temperatura ambiente y en oscuridad por 45 minutos. Se seguirá con el protocolo establecido por el proveedor. Pasado el tiempo de incubación se centrifugo a 3 000 rpm durante 5 minutos, el pellet celular será resuspendido en 1 mL de PBS, se repetirá el lavado 2 veces más. Se descartará el sobrenadante y se resuspenderá en 500 μ L de solución FACS para evaluar en un Clitómetro de Flujo FACSARIA II^{BD Biosciences}. Los resultados se analizarán con el software Flowing Software 2.5.1.

7.5. Adquisición de datos y comparación de la expresión de ARN

Los datos de secuenciación de ARN (RNA-Seq) de muestras normales de la base de datos del proyecto Genotype Tissue Expression (GTEx; <https://gtexportal.org/home/>) y datos de muestras Tumorales de The Cancer Genome Atlas (TCGA; <https://portal.gdc.cancer.gov>), se procesaron y obtuvieron utilizando la plataforma Xena (<http://xena.ucsc.edu>), alojada por el Laboratorio de Genómica Computacional de la Universidad de California Santa Cruz (UCSC; <https://cglgenomics.ucsc.edu>). Aunque el TCGA incluye muestras tumorales, estas

muestras de “tejido solido normal” se derivan de tejidos normales localizados proximales a tumores. En consecuencia, se puede poseer perfiles transcriptómicos tumorales en estas muestras “normales”. Por el contrario, las muestras del proyecto GTEx proporcionan datos de expresión del tejido normal de individuos sanos sin cáncer. Los conjunto de datos por proyecto no se pueden comparar directamente, por tanto, los datos de GTEx y TCGA fueron realineados por Xena Toil aplicando la normalización RESEM y extraídos en Microsoft Excel para su organización.

7.6. Análisis Estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism v9 (software GraphPad Prism, San Diego, CA, EE. UU.). Los datos se expresan como media \pm desviación estándar. Kruskal Wallis se utilizó para comparar las medias de dos muestras independientes, una $P < 0,05$ se consideró una diferencia estadísticamente significativa.

Se realizó una prueba de rango logarítmico en la salida de supervivencia de KM, se utilizó un modelo de riesgo proporcional de Cox para calcular las razones de riesgo y las diferencias entre los grupos se compararon con pruebas de Log-Rank. La supervivencia libre de progresión (SLP) se calculó como el intervalo desde la fecha de muestreo hasta la fecha de progresión, muerte o último seguimiento adecuado. Todos los análisis estadísticos se realizaron con intervalos de confianza del 95% con significancia determinada en $P < 0,05$. El análisis de riesgo proporcional de Cox se realizó utilizando GraphPad Prism versión v9.

8. Resultados

8.1. Análisis de la expresión de IL-15 en tejidos normales y tumorales de Cérvix, Mama, Hígado y Pulmón a partir de la base de datos TCGA/Gtex.

La IL-15 es una citocina inmunomoduladora que puede tener actividades antitumorales cuando se administra a altas concentraciones en pacientes con cáncer hematológico, sin embargo, también se ha reportado que promueve actividades protumorales en diferentes tipos de cáncer. Estas actividades anti y protumorales depende del tipo de tumor y contexto celular. En la actualidad no hay suficiente información que demuestre el papel que desempeña esta citocina en los tumores sólidos de cáncer de cérvix (CC), mama (CDI), pulmón (CPCNP) e hígado (HCC), por tanto, se analizó la diferencia de expresión de IL-15 en tejidos normales con respecto a tejidos tumorales. Para esto, se descargaron datos de expresión RNA-Seq de la base TCGA y GTEx mediante la plataforma XENA.

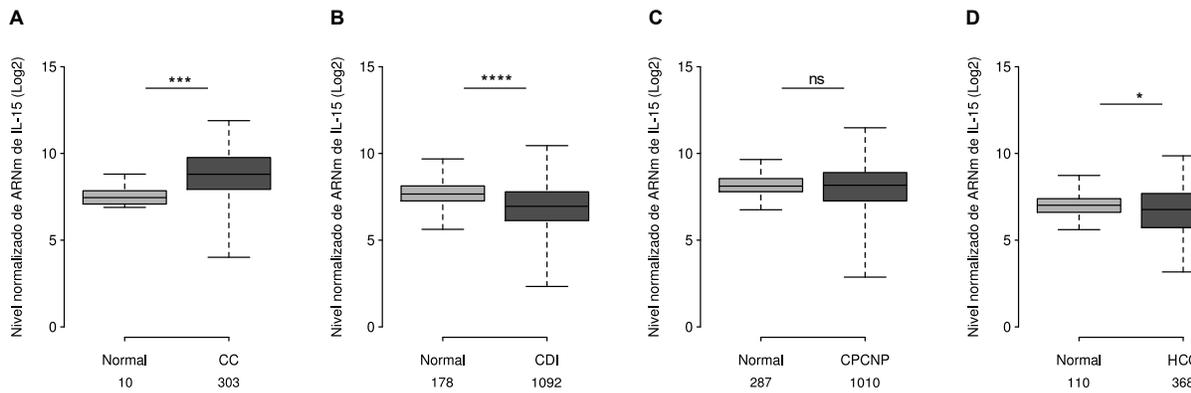


Figura 1. Expresión de IL-15 en tumores de Adenocarcinoma de Cérvix, Mama, Pulmón e Hígado y normales sanos. La expresión de IL-15 en tejidos sanos (GTEx) y tumores (TCGA) se descargaron de la herramienta de navegación UCSC Xena. Los números entre paréntesis se refieren al número de muestras incluidas en cada análisis. Los valores de significancia obtenidos después de un análisis de Mann Whitney no paramétrico se indican como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$), ns no significativo.

El análisis de la expresión de IL-15 (Figura 1), demuestra una expresión basal de IL-15 en todos los tejidos y tumores estudiados. Sin embargo, cuando se compara la expresión en tejidos normales con respecto a los tumores se puede observar que en los tumores de CC hay una mayor expresión de IL-15 que en los tejidos normales de cérvix. En el caso de los tumores de HCC y CDI se observa una menor expresión de IL-15 con respecto a los tejidos normales. Por su parte, en los tumores de pulmón no se observa una diferencia de expresión de IL-15. Estos resultados nos demuestran que

la expresión de IL-15 depende del tipo de tumor y su participación puede ser más relevante en los tumores de Cérvix, Mama e Hígado, ya que se observa una diferencia de expresión.

8.2. Análisis de la expresión de IL-15R α en tejidos normales y tumorales de Cérvix, Mama, Hígado y Pulmón a partir de la base de datos TCGA/Gtex.

La subunidad IL-15R α forma parte del IL-15R, esta subunidad es exclusiva para IL-15 y se une a ella con alta afinidad para desencadenar diferentes procesos celulares como la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células del sistema inmune.

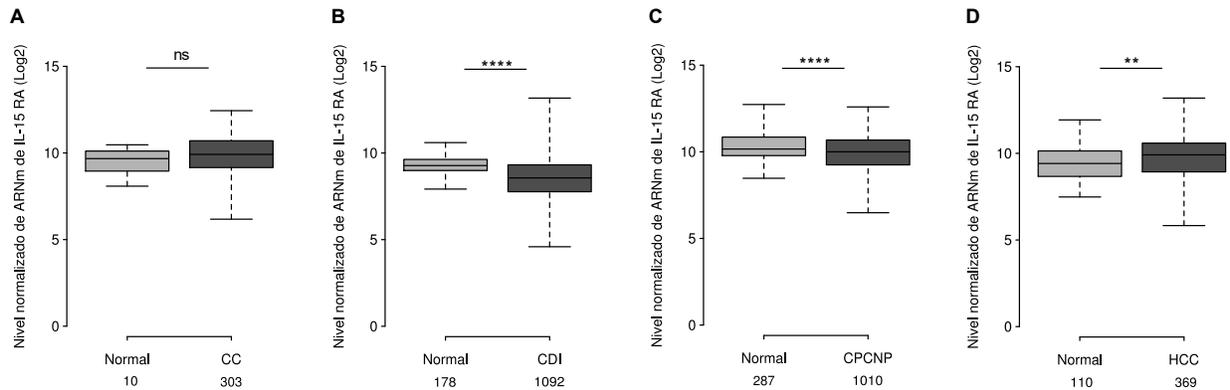


Figura 2. Expresión de las subunidades de IL-15R α en tumores de Adenocarcinoma de Cérvix, Mama, Pulmón e Hígado y normales sanos. La expresión en tejidos sanos (GTEx) y tumores CC (TCGA) se descargaron de la herramienta de navegación UCSC Xena. Los números entre paréntesis se refieren al número de muestras incluidas en cada análisis. Los valores de significancia obtenidos después de un análisis de Mann Whitney no paramétrico se indican como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$), ns no significativo.

Al analizar la expresión de la subunidad IL-15R α (Figura 2), se observa una expresión basal en todos los tejidos estudiados. Sin embargo, al comparar los niveles de expresión en tejidos normales y tumorales, se demuestra que en los tumores de HCC hay una mayor expresión de IL-15R α con respecto a los tejidos normales. Por su parte, en los tumores de CDI e CPCNP se observa una menor expresión de IL-15R α con respecto a los tejidos normales. En el caso de los tumores de CC no se observa una diferencia en la expresión de la subunidad α . De igual forma, estos resultados nos sugieren que la expresión de IL-15R α depende del tipo de tumor. La alta expresión IL-15R α en el HCC se puede correlacionar con un papel relevante para desencadenar diferentes procesos celulares que regulan el desarrollo tumoral, se ha demostrado que el complejo IL-15/ IL-15R α por sí solo puede señalar sin la presencia de las subunidades IL-15R β y γ c (Marra et al., 2014).

8.3. Análisis de la expresión de IL-15Rβ en tejidos normales y tumorales de Cérvix, Mama, Hígado y Pulmón a partir de la base de datos TCGA/Gtex.

La subunidad IL-15Rβ y γc son compartidas por la IL-15 e IL-2, esta es una de las razones por las cuales estas citocinas pueden sinergizar en diferentes procesos celulares durante la respuesta inmune, sin embargo, también pueden desempeñar funciones particulares.

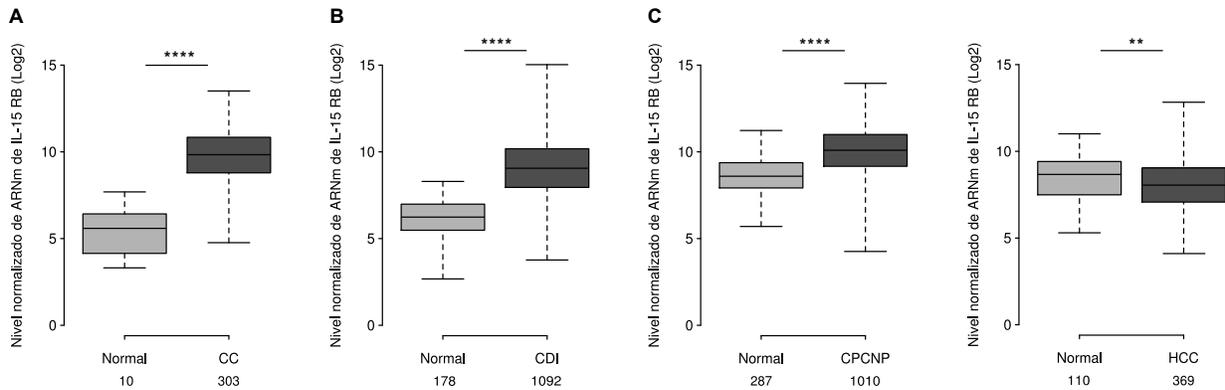


Figura 3. Expresión de las subunidades de IL-15Rβ en tumores de Adenocarcinoma de Cérvix, Mama, Pulmón e Hígado y normales sanos. La expresión en tejidos sanos (GTEx) y tumores CC (TCGA) se descargaron de la herramienta de navegación UCSC Xena. Los números entre paréntesis se refieren al número de muestras incluidas en cada análisis. Los valores de significancia obtenidos después de un análisis de Mann Whitney no paramétrico se indican como * (p < 0.05), ** (p < 0.01) y *** (p < 0.001), ns no significativo.

El análisis de la expresión de IL-15Rβ (Figura 3), demuestra una expresión basal en todos los tejidos analizados. En los tumores de CC, CDI y CPCNP la expresión de IL-15 Rβ es mayor con respecto a los tejidos normales (Figura 3A, B, C). En el caso del HCC se presenta una menor expresión de esta subunidad con respecto a los tejidos normales. Los resultados nos sugieren que en el caso de los tumores que presentan una alta expresión de IL-15Rβ pudieran activar el IL-15R con bajas concentraciones de IL-15.

8.4. Análisis de la expresión de γc en tejidos normales y tumorales de Cérnix, Mama, Hígado y Pulmón a partir de la base de datos TCGA/Gtex.

El análisis de la expresión de la subunidad γc demuestra una expresión basal en todos los tejidos analizados. Al comparar los niveles de expresión en tejidos normales y tumorales se observa que los tumores de CC, CDI, CPCNP e HCC presentan una sobreexpresión de la subunidad γc con respecto a los tejidos normales. Estos resultados nos sugieren que esta subunidad desempeña un papel relevante en todos los tumores, esta alta expresión se puede deber a que esta subunidad no es exclusiva del IL-15R, ya que forma de los receptores de otras Interleucinas y receptores de factores de crecimiento.

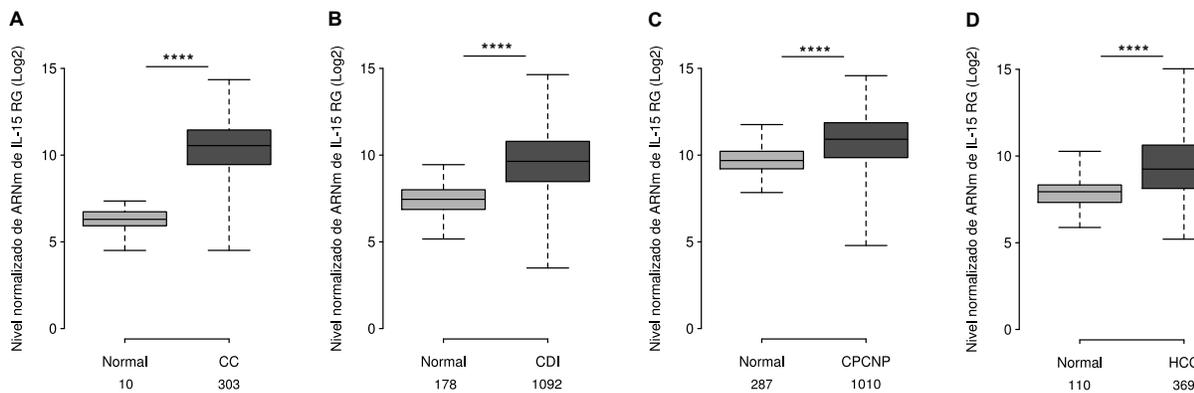


Figura 4. Expresión de las subunidades de IL-15R γc en tumores de Adenocarcinoma de Cérnix, Mama, Pulmón e Hígado y normales sanos. La expresión en tejidos sanos (GTEx) y tumores CC (TCGA) se descargaron de la herramienta de navegación UCSC Xena. Los números entre paréntesis se refieren al número de muestras incluidas en cada análisis. Los valores de significancia obtenidos después de un análisis de Mann Whitney no paramétrico se indican como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$), ns no significativo.

8.5 Análisis de la expresión de IL-15 en tumores de Cérvix, Mama, Hígado y Pulmón de pacientes menores y mayores de 50 a partir de la base de datos TCGA/Gtex.

Diversos estudios han demostrado que la expresión de genes relacionados al desarrollo tumoral se modifica con respecto a la edad de los pacientes, ya sea en pacientes jóvenes o adultos, algunos genes se ven aumentados o disminuidos. Para determinar si la expresión de IL-15 se correlaciona con la edad de los pacientes, los valores de RNA-Seq se agruparon en pacientes jóvenes (≤ 49 años) o adultos (> 50 años). Los resultados demuestran que en HCC y CPCNP (Figura 6C, D) hay una mayor expresión de IL-15 en pacientes mayores de 50 años en comparación de los pacientes jóvenes (≤ 49 años). En el caso de CC y CDI (Figura 3A, B) no hay una diferencia de expresión de IL-15 con respecto a la edad de los pacientes. Estos resultados nos permiten proponer que para el caso de los pacientes de edad avanzada con HCC y CPCNP la expresión de IL-15 puede ser uno de los factores que contribuye al desarrollo tumoral y a la agresividad de esos tumores, ya que el diagnóstico para los pacientes de estas edades es más comprometido.

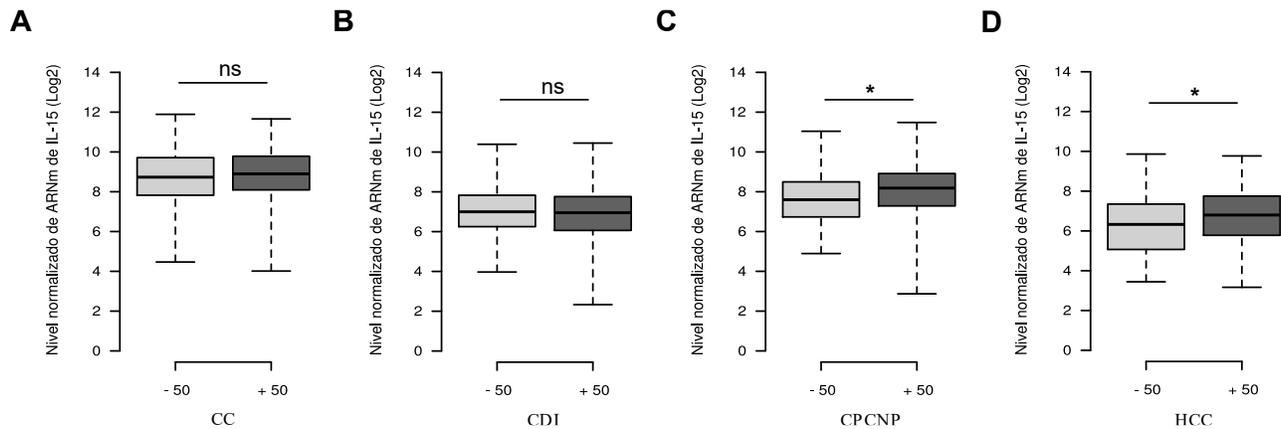


Figura 6. Expresión del gen IL-15 en células de diferentes adenocarcinomas y su correlación con tejidos de personas mayores de 50 años. La expresión en tejidos tumorales (TCGA) se descargaron de la herramienta de navegación UCSC Xena. Los números entre paréntesis se refieren al número de muestras incluidas en cada análisis. Los valores de significancia obtenidos después de un análisis de Mann Whitney no paramétrico se indican como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$), ns no significativo.

8.6 Análisis de la expresión de IL-15 en tumores de Cérvix, Mama, Hígado y Pulmón con respecto al estadio FIGO a partir de la base de datos TCGA/Gtex.

La clasificación FIGO hace referencia a la extensión, tamaño y desaminación de los tumores, a su vez esta clasificación permite a los médicos buscar el tratamiento más adecuado para los pacientes.

Por otro lado, se ha demostrado que la expresión de algunos genes relacionados al desarrollo tumoral se modifica con respecto a esta clasificación, por ejemplo, los genes relacionados al mantenimiento y evasión de la respuesta inmune se expresan en etapas iniciales, mientras que los genes relacionados a eventos angiogénicos o metastásicos en etapas avanzadas (Berek et al., 2023). Para determinar si la expresión de IL-15 se correlaciona preferentemente a algún estadio FIGO los valores de RNA-Seq se agruparon en estadio I, II, III, IV respecto al tumor correspondiente. El análisis nos demuestra que no hay una diferencia de la expresión de IL-15 con respecto a las etapas del tumor. Por tanto, podemos pensar que IL-15 puede participar en cualquier etapa del estadio FIGO regulado diferentes procesos de cada etapa. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar esta aseveración.

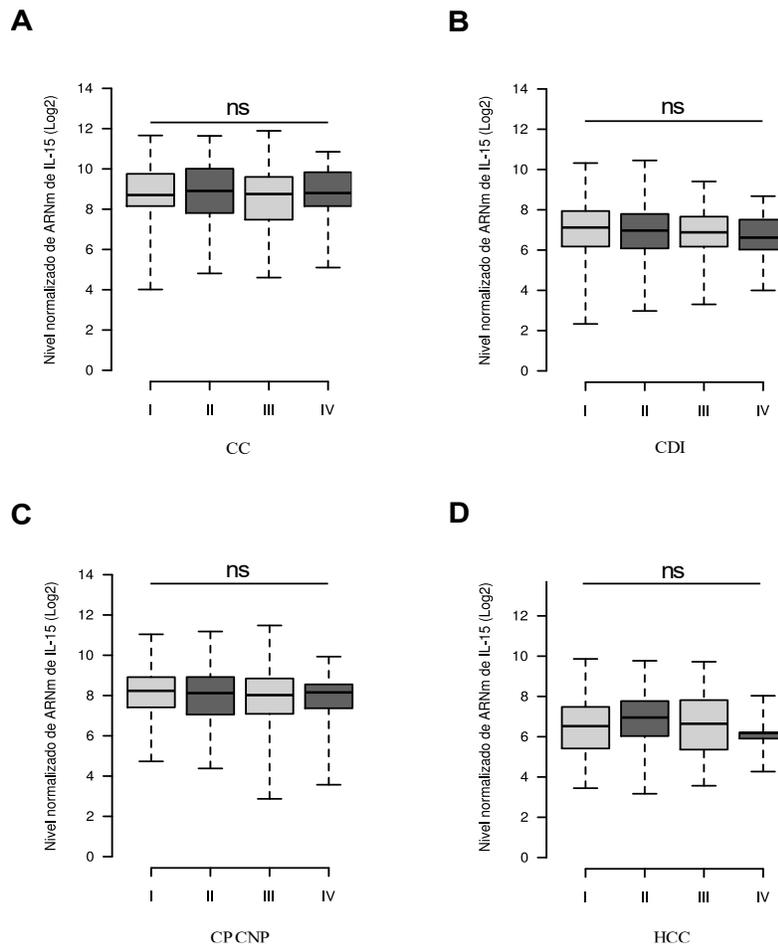


Figura 7. La expresión de IL-15 no se ve alterada por el estadio tumoral. La expresión en tejidos tumorales (TCGA) se descargaron de la herramienta de navegación UCSC Xena. Los números entre paréntesis se refieren al número de muestras incluidas en cada análisis. Los valores de significancia obtenidos después de un análisis de Kruskal Wallis no paramétrico se indican como * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) y *** ($p < 0.001$), ns no significativo.

9. Análisis de supervivencia de pacientes con cáncer de Cérvix, Mama, Hígado y Pulmón con respecto a la baja o alta expresión de IL-15, IL-15R α , IL-15R β y γ c a partir de la base de datos TCGA/Gtex.

A partir de la plataforma UCSC Xena se descargaron los datos de supervivencia de los pacientes de cáncer de Cérvix, Mama, Pulmón e Hígado, y los valores RNA-Seq se agruparon con respecto a la baja (línea azul) o alta expresión (línea roja) de IL-15, IL-15R α , IL-15R β y γ c para correlacionarlo con la supervivencia de los pacientes y proceder a realizar un análisis de supervivencia por el método de Kaplan-Meier. En el caso del CC los resultados demuestran que alta expresión IL-15R α tiene una tendencia a disminuir la supervivencia de los pacientes con respecto a la baja expresión de esta, sin embargo, esta tendencia no es significativa (Figura 8B). En el caso IL-15, IL-15R β y γ c no hay una tendencia de la disminución de la supervivencia con respecto a la baja o alta expresión de estos genes (Figura 8A, C, D). Para CDI (Figura 9) y CPCNP (Figura 10) no se observa una tendencia significativa de disminución de la supervivencia con respecto a la baja o alta expresión de los genes estudiados. En el caso del HCC los resultados demuestran que la alta expresión de IL-15R α disminuye la supervivencia de los pacientes, esta disminución es significativa aplicando la prueba estadística (Figura 11B). Sin embargo, para IL-15, IL-15R β y γ c no hay una tendencia de la disminución de la supervivencia con respecto a la baja o alta expresión de estos genes (Figura 11A, C, D) En general podemos hacer notar que la alta expresión de IL-15R α disminuye significativamente la supervivencia de los pacientes con HCC, este resultado nos hace pensar que IL-15 a través de su receptor IL-15R desempeñan un papel importante en la agresividad de este tumor.

9.1 Análisis del Pronóstico de Supervivencia en Cérnix

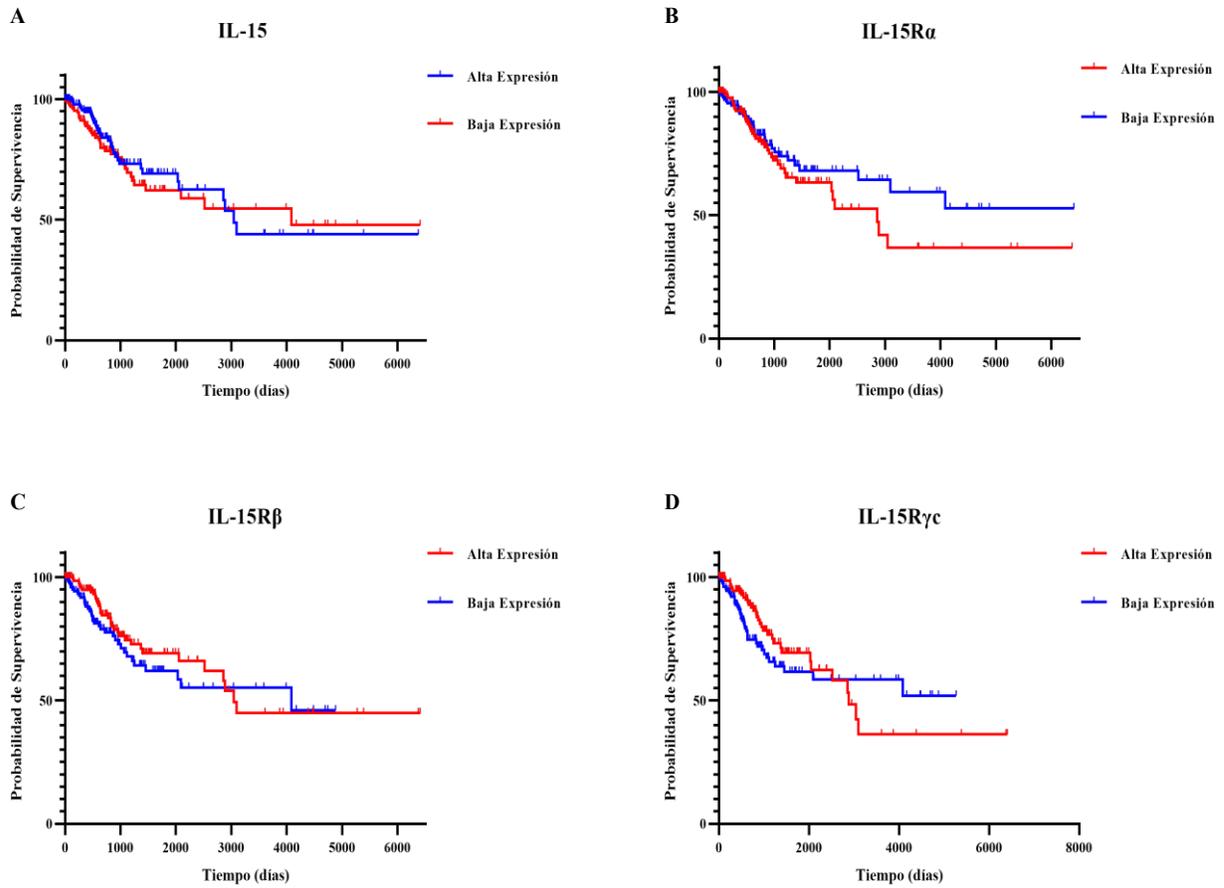


Figura 8. Correlación entre la expresión del gen IL-15 y IL-15R, y el pronóstico de supervivencia en pacientes con tumores de adenocarcinoma de cérvix tomados de la base de datos TCGA. La diferencia de supervivencia entre pacientes con CC con puntuaciones de riesgo, ya sea alta o baja de IL-15 (A), y las subunidades que conforman a su receptor IL-15R α (B), IL-15R β (C), y IL-15R γ_c (D) fueron obtenidas y comparadas mediante el método de Kaplan-Meier. La línea azul indica la baja expresión del gen de IL-15 con respecto a la tasa de supervivencia de pacientes con CC. La línea roja indica la alta expresión del gen de IL-15 con respecto a la tasa de supervivencia de pacientes con CC. Se realizó la prueba Long Rank para identificar diferencias significativas (*= $p < 0.05$).

9.2 Análisis del Pronóstico de Supervivencia en Mama

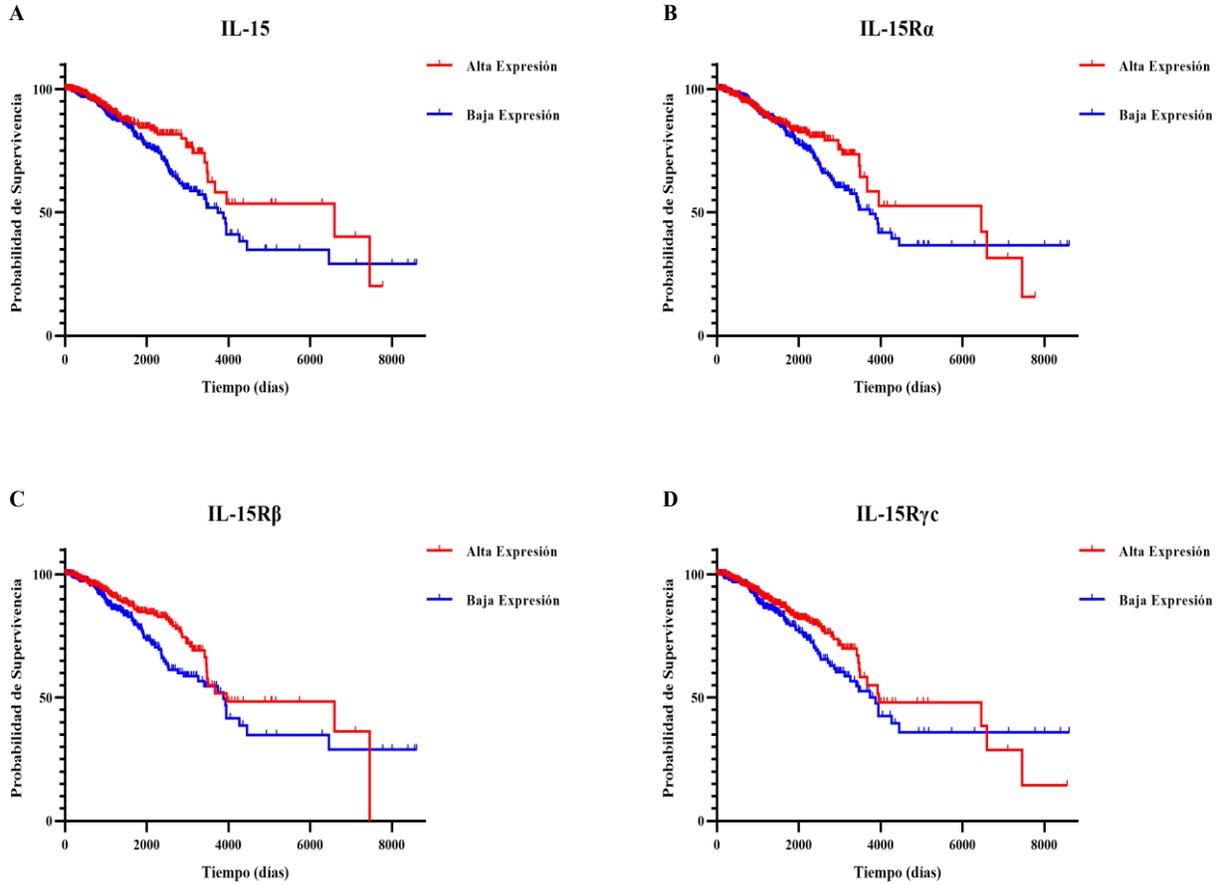


Figura 9. Correlación entre la expresión del gen IL-15 y IL-15R, y el pronóstico de supervivencia en pacientes con tumores de adenocarcinoma de Mama tomados de la base de datos TCGA. La diferencia de supervivencia entre pacientes con CDI con puntuaciones de riesgo ya sea alta o baja de IL-15 (A), y las subunidades que conforman a su receptor IL-15R α (B), IL-15R β (C), y IL-15R γ_c (D) fueron obtenidas y comparadas mediante el método de Kaplan-Meier. La línea azul indica la baja expresión del gen de IL-15 con respecto a la tasa de supervivencia de pacientes con CDI. La línea roja indica la alta expresión del gen de IL-15 con respecto a la tasa de supervivencia de pacientes con CDI. Se realizó la prueba Long Rank para identificar diferencias significativas (*= $p < 0.05$).

9.3 Análisis del Pronóstico de Supervivencia en Pulmón

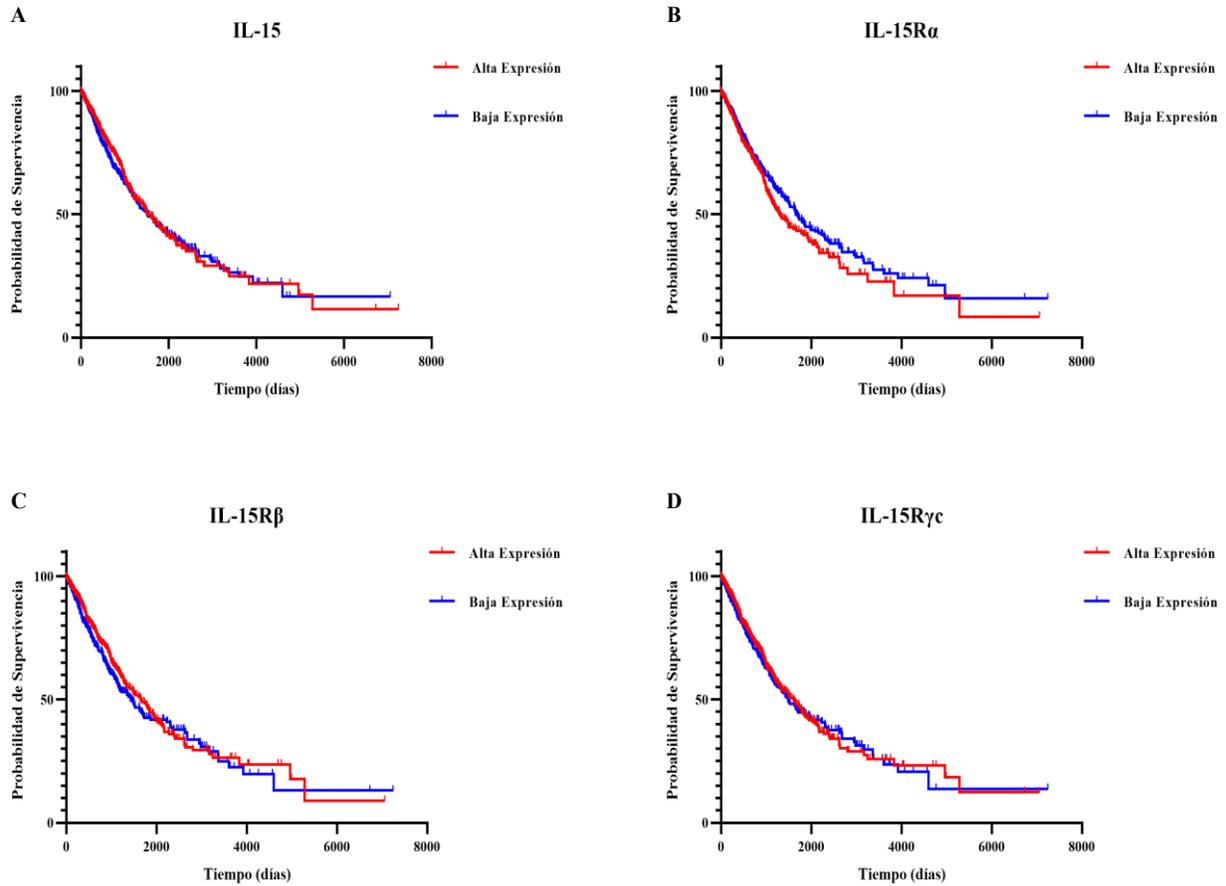


Figura 10. Correlación entre la expresión del gen IL-15 y IL-15R, y el pronóstico de supervivencia en pacientes con tumores de adenocarcinoma de Pulmón tomados de la base de datos TCGA. La diferencia de supervivencia entre pacientes con CPCNP con puntuaciones de riesgo ya sea alta o baja de IL-15 (A), y las subunidades que conforman a su receptor IL-15R α (B), IL-15R β (C), y IL-15R γ_c (D) fueron obtenidas y comparadas mediante el método de Kaplan-Meier. La línea azul indica la baja expresión del gen de IL-15 con respecto a la tasa de supervivencia de pacientes con CPCNP. La línea roja indica la alta expresión del gen de IL-15 con respecto a la tasa de supervivencia de pacientes con CPCNP. Se realizó la prueba Long Rank para identificar diferencias significativas (*= $p < 0.05$).

9.4 Análisis del Pronóstico de Supervivencia en Hígado

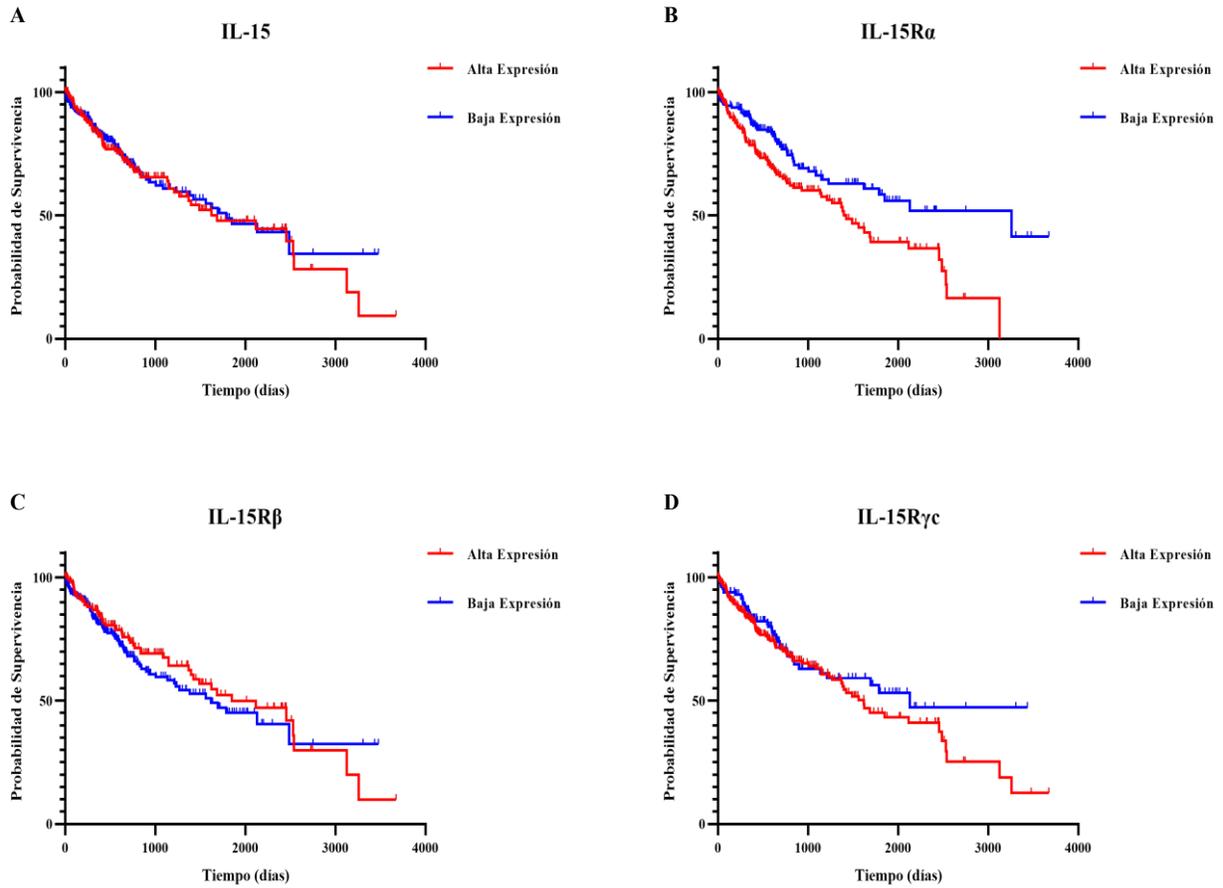


Figura 11. Correlación entre la expresión del gen IL-15 y IL-15R, y el pronóstico de supervivencia en pacientes con tumores de adenocarcinoma de Hígado tomados de la base de datos TCGA. La diferencia de supervivencia entre pacientes con HCC con puntuaciones de riesgo, ya sea alta o baja de IL-15 (A), y las subunidades que conforman a su receptor IL-15R α (B), IL-15R β (C), y IL-15R γ_c (D) fueron obtenidas y comparadas mediante el método de Kaplan-Meier. La línea azul indica la baja expresión del gen de IL-15 con respecto a la tasa de supervivencia de pacientes con HCC. La línea roja indica la alta expresión del gen de IL-15 con respecto a la tasa de supervivencia de pacientes con HCC. Se realizó la prueba Long Rank para identificar diferencias significativas (*= $p < 0.05$).

10. Gel de integridad de ARN en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2

Una vez analizada la expresión de IL-15 y su receptor IL-15R a partir de la base de datos TCGA/Gtex, se procedió analizar su expresión en diferentes líneas celulares afines a los tumores de estudio. Para los estudios de expresión génica es necesario contar con un ARN de buena calidad para dar resultados confiables, la PCR es una técnica muy sensible que es capaz de amplificar muestras de ARN degradado, esto genera errores en los análisis de expresión diferencial. Para confirmar la integridad del ARN obtenido de las líneas celulares HeLa (Cérvix), MCF-7 (Mama), Sklu-1 (Pulmón) y HepG2 (Hígado) mediante el método de Trizol se realizó un gel de electroforesis al 1% de agarosa. El gel de integridad muestra la presencia de las bandas 28s y 18s del ARN ribosomal (ARNr) en todas las líneas celulares analizadas. Las bandas de ARNr son claras y nítidas, donde la banda 28s es aproximadamente dos veces más intensa que la banda 18s (Figura 12). Este resultado nos demuestra que el ARN obtenido de las células HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2 mediante el método de Trizol es adecuado para el análisis de expresión génica mediante la técnica de RT-PCR.

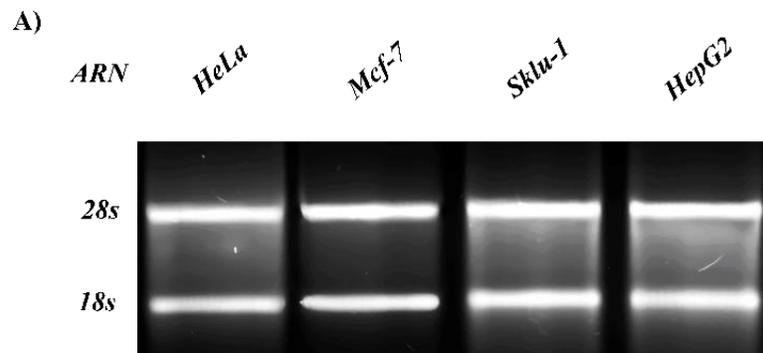


Figura 12. Integridad del ARN extraído de las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2. Se visualiza, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, las subunidades 28s y 18s de ARN ribosómico como indicadores de integridad de ARN extraído de las líneas

10.1 Expresión de IL-15 en LSPH como control positivo

Antes de proceder a analizar la expresión de IL-15, IL-15R α , IL-15R β y γ c en las diferentes líneas celulares tumorales, se amplificó por RT-PCR cada uno de estos genes en linfocitos de sangre periférica humana (LSPH) como un control positivo de expresión, ya que se sabe que las células

del sistema inmune los expresan de manera rutinaria. El gel de electroforesis nos muestra un producto de amplificación de 152 pb que corresponde a IL-15, 183 pb para IL-15R α , 206 pb para IL-15R β , 159 pb para γc , y 234 pb para B actina como control interno de la técnica. Este resultado nos demuestra que el diseño de los primer es el adecuado para proceder analizar estos genes en las diferentes líneas celulares tumorales de interés.

B)

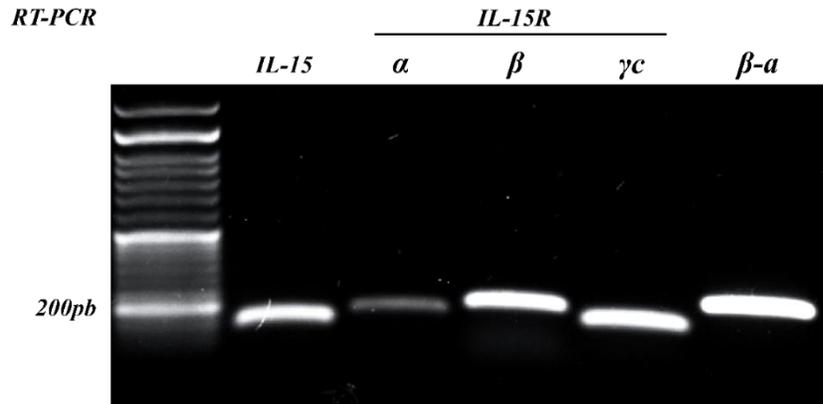


Figura 13. Evaluación de la expresión del gen IL-15 y su receptor IL-15RA en linfocitos de sangre periférica humana (LSPH). A) Amplificación por RT-PCR para el transcrito de IL-15 (152pb), y los transcritos que componen al receptor de IL-15; α (183pb), β (206pb) y γc (159pb). En la imagen se muestra el producto de amplificación mediante RT-PCR de β -Actina (234pb) como control positivo. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, y fue visualizado bajo luz ultravioleta por tinción con bromuro de etidio en un Fotodocumentador Bio-Rad.

10.2 Expresión del IL-15 en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2.

Una vez confirmado el diseño de los primer en LSPH y la expresión de IL-15, IL-15R α , IL-15R β y γc en tumores mediante el análisis de expresión de RNA-Seq (TCGA/Gtex), se procedió analizar cada uno de estos genes en diferentes líneas células para cada tumor de estudio; HeLa (Cérvix), MCF-7 (Mama), Sklu-1 (Pulmón) y HepG2 (Hígado). En el caso de la expresión de IL-15 se observa en el gel de electroforesis una expresión basal en todas las líneas celulares, sin embargo, el producto de amplificación (152 pb) es más abundante en la línea celular MCF-7 y HepG2, a diferencia de las células HeLa y Sklu-1. Este resultado nos demuestra que las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2 expresan IL-15, teniendo una alta expresión en Mcf-7 Y HepG2 donde posiblemente la IL-15 pueda contribuir a su proliferación, así como se ha reportado para el caso de IL-2 (Rocha-Zavaleta et al., 2004).

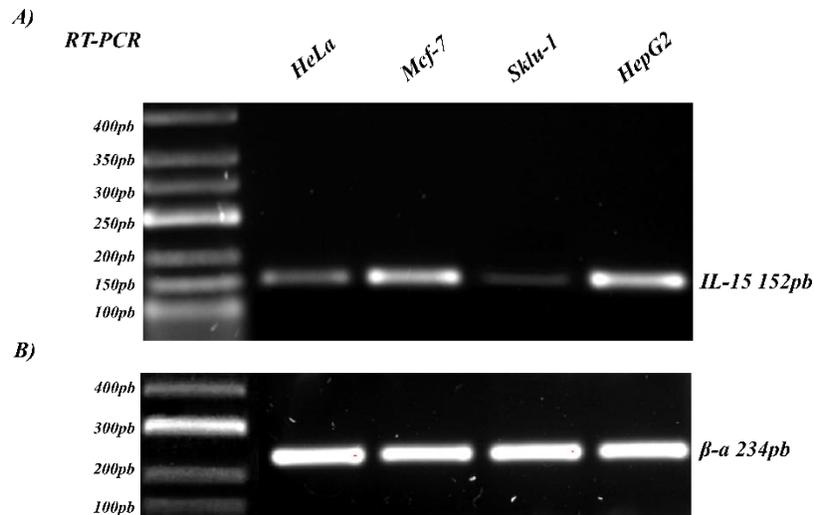


Figura 14. Evaluación de la expresión del gen IL-15 en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2. A) Amplificación por RT-PCR para el transcrito de IL-15 (152pb). B) En la imagen se muestra el producto de amplificación mediante RT-PCR de β-Actina (234pb) como control positivo para cada línea celular. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, y fue visualizado bajo luz ultravioleta por tinción con bromuro de etidio en un Fotodocumentador Bio-Rad.

10.3 Expresión del IL-15Rα en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2.

En caso de IL-15Rα podemos observar una expresión basal en cada una de las líneas, sin embargo, para el caso de HeLa y HepG2 se tiene un producto de amplificación (183 pb) más abundante. Con esto podemos decir que las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2 expresan IL-15Rα y que esta subunidad puede tener una participación más relevante en HeLa y HepG2.

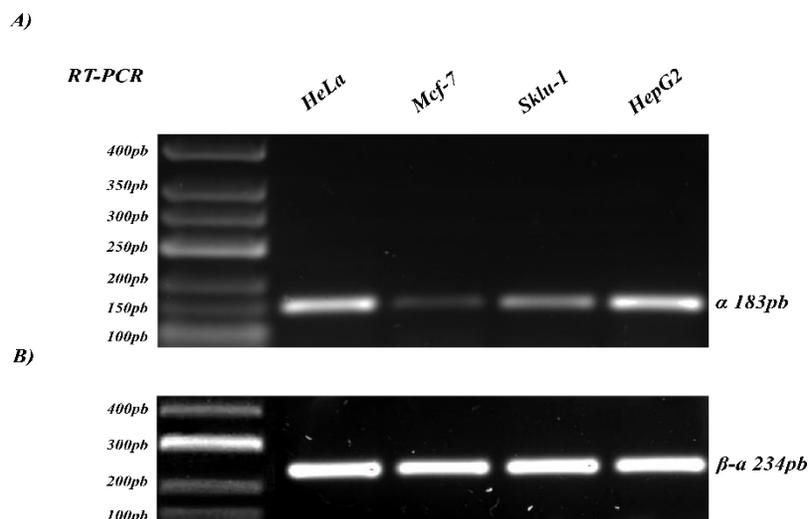


Figura 15. Evaluación de la expresión de la subunidad α en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2. A) Amplificación por RT-PCR para el transcrito de la subunidad α (183pb). B) En la imagen se muestra el producto de amplificación mediante RT-PCR de β-Actina (234pb) como control positivo para cada línea celular. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, y fue visualizado bajo luz ultravioleta por tinción con bromuro de etidio en un Fotodocumentador Bio-Rad.

10.4 Expresión del 15R β en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2.

Cuando se analiza la expresión de la subunidad 15R β en las líneas celulares se obtiene una expresión basal en cada una de ellas, siendo más abundante el producto de amplificación (206 pb) en las líneas Mcf-7 y Hepg2. Este resultado nos demuestra que la subunidad 15R β puede tener un papel importante en cada una de estas líneas celulares, en particular en Mcf-7 y HepG2.

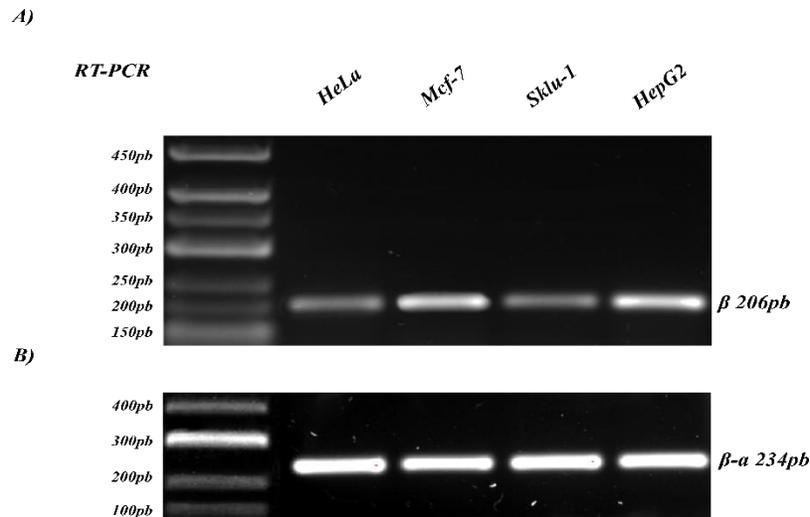


Figura 16. Evaluación de la expresión de la subunidad β en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2. A) Amplificación por RT-PCR para el transcrito de la subunidad β (206pb). B) En la imagen se muestra el producto de amplificación mediante RT-PCR de β -Actina (234pb) como control positivo para cada línea celular. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, y fue visualizado bajo luz ultravioleta por tinción con bromuro de etidio en un Fotodocumentador Bio-Rad.

10.5 Expresión del γc en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2.

Como se ha mencionado anteriormente la subunidad γc no es exclusiva del receptor de IL-5, es una subunidad que comparte con otros receptores de interleucina y factores de crecimiento, por tanto, su expresión es normal en tumores y líneas celulares tumorales. Los resultados nos muestran un producto de amplificación de 159 pb en cada una de las líneas celulares, observando una mayor expresión en HeLa. En general podemos decir que las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2 expresan las tres subunidades del IL-15R, por tanto, pueden reconocer a IL-15.

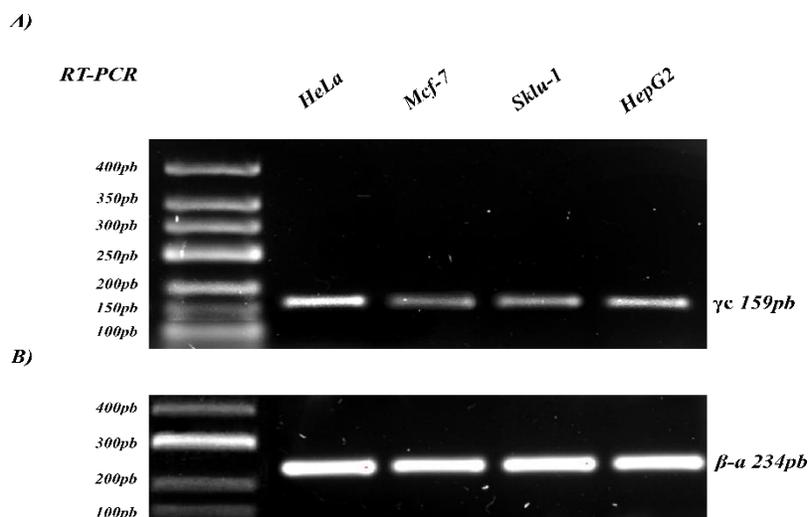


Figura 17. Evaluación de la expresión de la subunidad γc en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2. A) Amplificación por RT-PCR para el transcrito de la subunidad γc (159pb). B) En la imagen se muestra el producto de amplificación mediante RT-PCR de β -Actina (234pb) como control positivo para cada línea celular. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, y fue visualizado bajo luz ultravioleta por tinción con bromuro de etidio en un Fotodocumentador Bio-Rad.

11. Presencia de IL-15R α en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2 a nivel intra y extracelular.

Una vez confirmada la expresión de IL-15 y las tres subunidades de IL-15R, se procedió analizar la presencia de IL-15R α a nivel de proteína en las líneas celulares HeLa, MCF-7, Sklu-1 y HepG2 intra y extracelularmente por citometría de flujo. La subunidad IL-15R α es la única subunidad exclusiva y de alta afinidad para IL-15, por tanto, su presencia hace referencia a una participación en las células que la presentan, siempre tomando en cuenta en tipo y el contexto celular en el que se encuentren. En este ensayo se utilizaron a los LSPH como un control positivo de la presencia de IL-15R α .

Los resultados en formato de histograma nos demuestran la presencia de IL-15R α a nivel intracelular (línea roja) en LSPH (Figura 18A) y todas las líneas celulares tumorales (Figura 18B, C, D, E). A nivel extracelular (membrana celular) podemos notar la presencia de IL-15R α solo en las líneas celulares MCF-7 y HepG2 (Figura 18C, E). Este resultado nos confirma que todas las líneas celulares expresan y presenta a nivel de proteína la subunidad IL-15R α , sin embargo, para el caso de HeLa y Sklu-1 solo está presente a nivel intracelular, requiriendo un estímulo para translocarla a la membrana. En el caso de las líneas celulares MCF-7 y HepG2 expresan la

subunidad IL-15R α en la membrana, por tanto, pueden tener la capacidad de reconocer a IL-15 endógeno o exógena, y desencadenar diferentes procesos celulares. Cabe mencionar que la IL-15 puede señalar solo con la subunidad IL-15R α sin la necesidad de las otras dos subunidades. En general podemos proponer a las líneas celulares Mcf-7 y HepG2 como modelos de estudio del papel de IL-15 en el desarrollo tumoral.

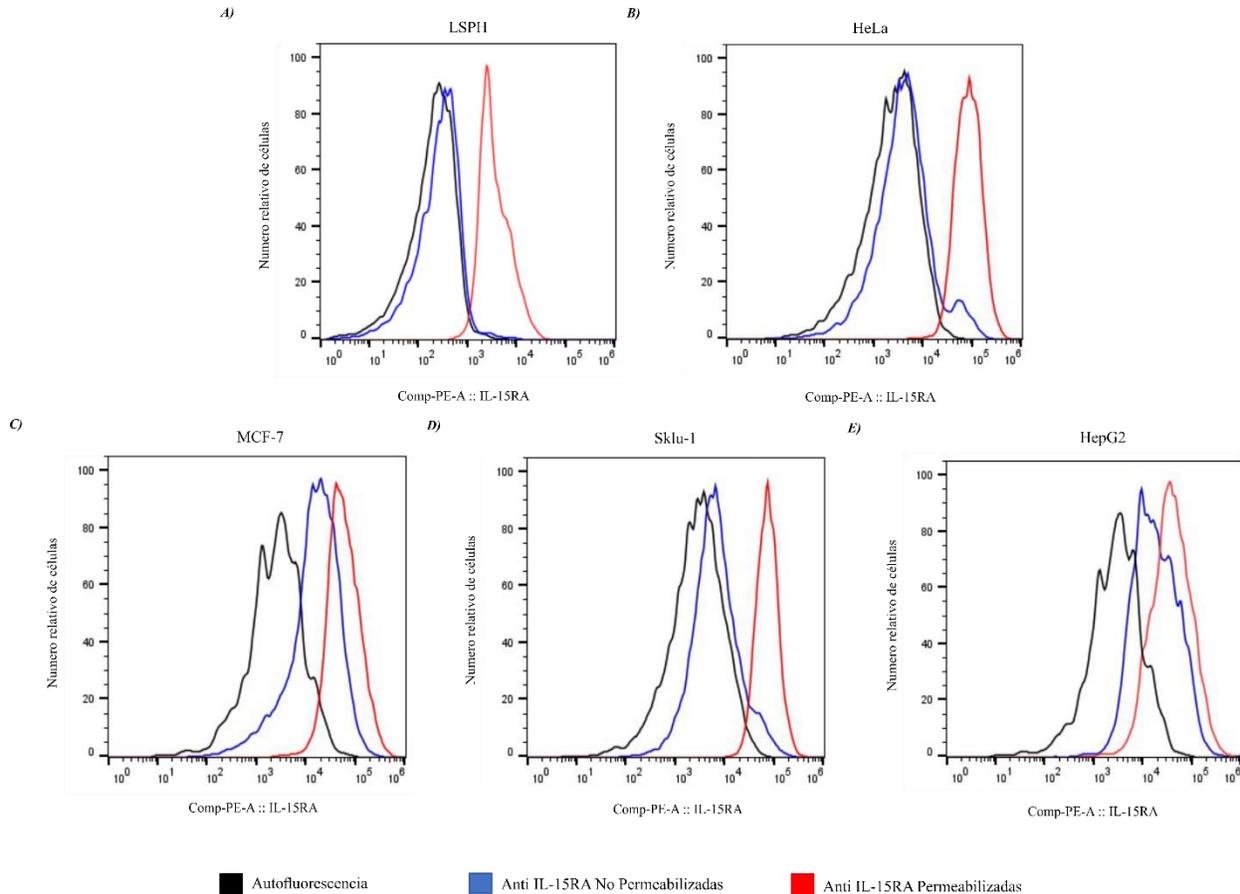


Figura 18. Abundancia del receptor de IL-15 intra-extracelular. Histograma representativo de IL-15RA por ensayo de citometría de flujo a partir de 10,000 células de LSPH permeadas y no permeadas, donde se grafica la fluorescencia relativa emitida de ficoeritrina (PE). A) En color negro se observa el histograma correspondiente al grupo control de células de LSPH sin anticuerpo (autofluorescencia). En color azul se observa el histograma de las células de LSPH incubadas con el anticuerpo Anti-IL-15RA conjugado con el fluorocromo PE (no permeabilizadas). En color rojo se observa el histograma de las células de LSPH incubadas con el anticuerpo Anti-IL-15RA conjugado con el fluorocromo PE (permeabilizadas). **A)** Se observa un mayor desplazamiento en la emisión de fluorescencia en las células de LSPH permeabilizadas (%) en comparación con las células no permeabilizadas (%) y su propia autofluorescencia. **B y D)** Solo hay presencia de IL-15R α a nivel intracelular en las líneas celulares HeLa y Sklu-1. **C y E)** Presencia del IL-15R α a nivel intracelular y extracelular en las líneas celulares MCF-7 y HepG2.

12. Discusión

Existen múltiples evidencias que demuestran que las citocinas del microambiente tumoral desempeñan una actividad relevante tanto en el inicio como durante la progresión tumoral, ya que pueden estimular la proliferación de las células cancerígenas, permitir la evasión de la respuesta inmune antitumoral y favorecer la resistencia a la inducción de apoptosis por agentes quimioterapéuticos. No obstante, las citocinas del microambiente tumoral no sólo son producidas por células inmunológicas como los linfocitos infiltrantes de tumor o los macrófagos asociados a tumor, sino que incluso las propias células tumorales son productoras de estas moléculas (Aravalli, 2013; Budhu & Wang, 2006; Greten & Grivennikov, 2019; Sachdeva et al., 2015; Schreiber et al., 2011; Sun & Karin, 2013; Whiteside, 2008). IL-15 es una citocina proinflamatoria que al igual que IL-2 participa en el proceso inmunológico antitumoral, sin embargo, también se ha demostrado que la expresión de la IL-15 y/o de los receptores de IL-15 se puede detectar en varias líneas celulares derivadas de leucemia y de tumores sólidos, donde muestran propiedades protumorigénicas. A pesar de esto, aún se desconoce el papel que puede desempeñar esta citocina y/o su receptor en diferentes tumores sólidos (Waldman, 2006) (Fiore et al., 2020).

Diversas neoplasias hematológicas como la leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL) de células T se caracteriza por niveles séricos elevados de sIL-15R α . Además, la regulación positiva de IL-15R α podría proteger a IL-15 de la proteólisis, disminuir el umbral de respuesta de IL-15 de las células, y sIL-15R α en complejo con IL-15 circulante monomérica (sIL-15) puede generar el complejo soluble. Ambos eventos pueden participar en la progresión de la enfermedad. Así como lo antes mencionado, IL-15 actúa como factor de crecimiento y viabilidad de células T malignas en pacientes con linfoma, incluso las lesiones cutáneas y las células T PB de pacientes con linfoma cutáneo de células T muestran una sobreexpresión tanto del ARNm como de la proteína IL-15 (Chen et al., 2012).

Por su parte, (Pereno et al., 2000) ha reportado mecanismos de escape tumoral y activación de señales proinflamatorias inducidos por la producción de IL-15 en cultivos de melanoma primario. Análogo a esto, pequeñas concentraciones de IL-15 recombinante humana (rhIL-15) en ratones provoca el desarrollo de tumores agresivos en implantes subcutáneos de células de melanoma humano. En el caso de las células renales de carcinoma claro (CCR) no existe secreción de IL-15, pero expresa tmb-IL-15 y no expresa ni in vitro ni in vivo la cadena γ_c y JAK3. Así, en los CCR,

tanto la IL-15 recombinante (rhIL-15) como la tmb-IL-IL5 transducen una señal desequilibrada que promueve la transición mesenquimatoso epitelial, comportándose como factores protumorigénicos. Utilizando datos de RNA-Seq de tumores de CC, HCC, CDI y CPCNP analizamos la expresión de IL-15 y su receptor IL-15R con respecto a tejidos normales. Este análisis de expresión demuestra una expresión de basal de IL-15 e IL-15R en todos los tejidos y tumores estudiados. Sin embargo, se observa una mayor expresión de IL-15 en los tumores de CC y una menor expresión en los tumores de HCC y CD. En el caso de IL-15R α se presenta una mayor expresión en HCC y una menor expresión en CDI y CPCNP. Para IL-15R β y γ_c se observa una mayor expresión en los tumores. Esta diferencia de expresión puede estar asociada al desarrollo tumoral, ya que la sub o sobreexpresión de IL-15 y/o receptores de IL-15 se puede detectar en varias líneas celulares derivadas de leucemia y de tumores sólidos, donde se han mostrado propiedades pro o antitumorigénicas, en concordancia con los antecedentes antes señalados, donde el complejo sIL-15/IL-15R α intratumorales y/o circulantes puede contribuir a un microambiente tumoral favorable para la progresión y escape inmunitario.

Aún se desconoce el papel de IL-15 en los tumores de este trabajo, y aunque se han implementado el uso de antagonistas de esta citocina como tratamientos terapéuticos contra estas neoplasias, no se ha descrito si IL-15 promueve el desarrollo de un microambiente tumoral en dichos tumores. Si bien la IL-15 se expresa principalmente en monocitos y macrófagos, también se ha detectado ARNm de IL-15 en otros tejidos y tipos celulares como son células epiteliales, músculo y placenta (Fehniger, 2001) (Grabstein et al., 1994). Sin embargo, la expresión de IL-15 y/o su receptor IL-15R en células de dichos tumores no había sido analizada a nivel de ARN mensajero/ o proteína.

Aun cuando se ha identificado IL-15 en sobrenadantes de cultivo de dos líneas celulares (Cv-1/EBNA y HuT-102) que estimulan la proliferación de la línea de células T dependiente de citoquinas CTLL-2 en presencia de anticuerpos anti-IL-2 (Bamford et al., 1994) (Grabstein et al., 1994). En este estudio hemos demostrado a través de un análisis de RNA-seq que existe una mayor expresión de IL-15, y las subunidades β y γ_c en tejidos tumorales de cérvix en comparación con tejidos normales sanos, contrario a esto, no encontramos una diferencia de expresión de la subunidad α de alta afinidad en este tumor. Aunado a esto, (Escobar Contreras, 2023) se ha demostrado la expresión basal de ARNm de IL-15 en diferentes líneas celulares de CC y así mismo, que la expresión de esta es superior en comparación con LSPH. Así mismo, nuestros

productos de amplificación de ARNm de IL-15 y las subunidades α , β y γ_c se expresan en la línea celular HeLa, y aun cuando se expresan de manera basal, varían en comparación con el análisis de RNA-seq, siendo más abundante la subunidad α , y γ_c en comparación de IL-15/ β .

Adicionalmente, a través de un análisis de ARN-seq, demostramos que la expresión de IL15 es mayor en células VPH+ con respecto a las VPH- (resultado en anexo), esta diferencia de expresión es estadísticamente significativa. Este resultado nos sugiere que la presencia del virus en las células tumorales de CC promueve la subexpresión de IL-15. En este sentido se ha reportado que el VPH puede alterar la expresión de genes en una célula infectada (Wan et al., 2008). Además, se demuestra que la expresión de IL-15 se ve alterada por el tipo viral del VPH, esto nos sugiere que la regulación de la expresión de IL-15 es dependiente del tipo viral. Se ha reportado que el VPH16 y 18 son las principales oncoproteínas en el CC ya que alteran la expresión de los genes supresores de tumores P53 y pRb (Wan et al., 2008), en este análisis observamos una modificación de la expresión de IL-15 con relación al VPH16 y 18.

Resultados de nuestro grupo de trabajo han demostrado que IL-2 promueve la proliferación de las células tumorales de cérvix positivas a VPH que expresan el IL-2R cuando se administra a bajas concentraciones, mientras que altas concentraciones inhibe su proliferación; dado que IL-2 e IL-15 sinergizan en varias funciones biológicas y comparten subunidades en su receptor se sugiere que IL-15 puede promover el fenotipo maligno en el cáncer cervical y en diferentes tumores sólidos (Rocha-Zavaleta et al., 2004). Esto puede deberse a la pérdida de la fosforilación de JAK1 y la activación constitutiva de JAK3 en las células CC asociadas al VPH, lo que podría ser una característica de las células tumorales que expresan IL-2R (Valle-Mendiola et al., 2014, 2016) (Trujillo-Cirilo et al., 2021).

De igual forma, se ha demostrado que las líneas celulares VPH negativas transfectadas con E6 y E7 del VPH16 y 18 muestran niveles elevados de IL-2R en comparación con las líneas celulares negativas, por lo que las células CC podrían utilizar el IL-2R para impulsar un crecimiento tumoral, contribuyendo a una señalización proliferativa sostenida, un sello distintivo del cáncer. (Trujillo-Cirilo et al., 2021). Planteamos la posibilidad de que en células de CC puedan ocurrir dos mecanismos diferentes de señalización para promover la proliferación tumoral, en presencia de diferentes concentraciones de IL-15, en primera instancia, a través de la subunidad IL-2R β activando la vía de señalización JAK/STAT y una posible fosforilación constitutiva de JAK3

debido a la alta expresión de células VHP+. Como segundo mecanismo de señalización y dado que nuestros resultados por citometría de flujo nos permiten demostrar la expresión intracelular a nivel de proteína del IL-15R α . Planteamos la posibilidad de que las células HeLa sean capaces de responder a una estimulación con IL-15 exógena, debido a la nula expresión extracelular del IL-15R α , y a la baja expresión de IL-15 y la subunidad β , requiriendo un estímulo para translocarla a la membrana.

Los tumores de pulmón tienden a generar un ambiente inmunosupresor donde las células tumorales pueden reclutar factores inmunosupresores para alterar la función citotóxica de las células T o NK, lo que resulta en un crecimiento tumoral continuo (Aerts & Hegmans, 2013). De acuerdo con diversos estudios, se ha observado una actividad antitumoral mejorada en los pulmones con una terapia combinada de gemcitabina y transferencia del gen IL-15/sIL-15R α . Sin embargo, los tumores en los pulmones se vuelven resistentes al tratamiento más adelante, lo que lleva a un crecimiento tumoral agresivo posterior (Sun & Liu, 2016). En este estudio hemos encontrado en tejidos tumorales y células de CPCNP, una similitud en los niveles de expresión de IL-15 e IL-15R. Nuestros productos de amplificación de ARNm de IL-15 y las subunidades α , β y γ_c se expresan en la línea celular SKlu-1, y aun cuando se expresan de manera basal, varían en comparación con el análisis de RNA-seq, siendo más abundantes los productos de amplificación de las subunidades α , y γ_c que IL-15/ β . También se ha informado la expresión de un IL-2R funcional en varias líneas celulares humanas derivadas de tumores sólidos. En algunos casos, la IL-2 inhibe el crecimiento celular (carcinomas de cabeza y cuello, gástricos y renales), pero en otros tumores se ha informado de estimulación del crecimiento y aumento de la expresión de marcadores de progresión tumoral, entre ellos (carcinomas de pulmón). Además, se ha informado de la secreción de IL-2 biológicamente activa en algunas líneas celulares de melanoma y cáncer de mama. Se han encontrado transcripciones de IL-15, que utiliza las cadenas beta y gamma del IL2-R, en células de melanoma y los mAb anti-IL-15 inhiben la expresión de HLA clase I en estas células. Por tanto, estas citocinas pueden modificar, dentro de un tumor, el comportamiento tanto de las células estromales como de las neoplásicas (Azzarone, 1996). Nuestros resultados por citometría de flujo nos permiten demostrar la expresión intracelular a nivel de proteína de IL-15R α . Ante esto, planteamos la posibilidad de que las células SKlu-1 sean incapaces de responder a una estimulación con IL-15 exógena, debido a la nula expresión extracelular del IL-15R α , y a la baja

expresión de ARNm de IL-15 y la subunidad β , requiriendo un estímulo para translocarla a la membrana.

Se ha reportado el uso de ratones inmunodeficientes que carecen de células T, células B y células NK para estudiar la IL-15 e identificar su papel en la promoción tumoral del pulmón. Las células mieloides CD215+, pero no las células CD215-, responden a la IL-15 y promueven el crecimiento tumoral. Por lo tanto, se sugiere que las células mieloides CD215+ desempeñan un papel importante en el microambiente tumoral y en la progresión del cáncer. Por otra parte, se ha demostrado que IL-15 promueve el crecimiento de las células mieloides CD215+ y media el crecimiento de estas mismas mediante la expresión de Bcl-2, Bcl-xL, Sox4 y Lef1, y los genes regulados positivamente en células CD215+ estimulados con IL-15 indican que la vía de señalización Wnt puede ser crítica para la proliferación de células CD215+. (Lin et al., 2017). Aunado a esto, se sabe que IL-15 aumenta la expresión del inhibidor de la apoptosis Bcl-xL posiblemente a través de la activación transcripcional de STAT6 (Masuda et al., 2001), y también regula positivamente al factor de sobrevivencia Bcl-2 (Inagaki-Ohara et al., 1997). Por lo que podemos inferir que las células CD215+ podrían tener un papel importante en el microambiente tumoral y la progresión anormal en los tumores de pulmón en presencia de IL-15 exógena, lo que provocaría de manera transactiva al receptor Axl asociado constitutivamente a la subunidad IL-15R α , se ha reportado que está expresado en las células Sku-1, para inducir la activación de la vía de señalización PI3K/Akt y como consecuencia regular al alza a Bcl-xL y Bcl-2s.

Por otro lado, se ha reportado en diversos estudios que IL-15 puede inducir la proliferación de células NK mediante la activación de la telomerasa (Watkinson et al., 2021). Adicionalmente, se ha observado que la exposición de las células cancerígenas a IL-15 reduce la sensibilidad a la muerte inducida por las células NK (YG et al., 2004), esto debido a que IL-15 inhibe la apoptosis mediada por Fas/FasL (Tinhofer et al., 2000), una de las vías mayormente utilizada por las células NK para inducir la muerte de las células tumorales (Screpanti et al., 2001). La capacidad de la IL-15 para afectar la formación de tumores y sus efectos tanto en las células NK como en las células T CD8 se han estudiado en una variedad de modelos tumorales. Desafortunadamente, muy pocos estudios han examinado exhaustivamente el papel de la IL-15 en la metástasis y sus efectos en las células inmunes distintas de las células NK o las células T CD8.

Se ha sugerido una posible participación de IL-15 en la patogénesis de la leucemia de células T adultas (ATL), fundamentalmente durante la fase de infiltración en tejidos que expresan IL-15, como piel, pulmón, hígado y tracto gastrointestinal (Azimi et al., 1998) (Yamada et al., 1998). En este estudio, confirmamos que tanto células tumorales como tejidos normales, expresan de manera basal a IL-15 e IL-15R. A partir de nuestro análisis de RNA-seq observamos una subexpresión de IL-15 y la subunidad β con respecto a nuestros productos de amplificación, donde el ARNm de IL-15 y las subunidades que conforman al receptor IL-15R se sobreexpresan en la línea celular HepG2. (Reyes Mercado, 2023) ha demostrado la sobreexpresión de IL-15 y IL-15R en células de Carcinoma Hepatocelular, posiblemente por la presencia de IL-6 reportada en las células HepG2 y aumentada en el suero de pacientes con HCC (Hu et al., 2017) ya que IL-6 puede regular al alza la expresión de IL-15 mediante la activación de las vías de señalización MAPKs-ERK1/2 y PI3K-AKT (Shakiba et al., 2018).

Se ha propuesto que el IL-15R α en la superficie de las células de Carcinoma Gástrico (GC) promueve el crecimiento de células cancerosas a través de múltiples vías (sin PBMC), o activa las PBMC para destruir células cancerosas. Cuando las PBMC están ausentes, el IL-15R α expresado en la superficie de las células GC puede unirse a la IL-15 con alta afinidad, lo que puede estimular el crecimiento de células cancerosas mediante la activación de las vías STAT y ERK. Contrario a esto, cuando hay PBMC presentes, el IL-15R α expresado en células GC presenta IL-15 unida en trans a células inmunitarias como las células T y NK que se infiltran en el microambiente, lo que puede activar estas células inmunitarias para que proliferen y desencadenen la actividad citolítica (Wei et al., 2020). En este estudio la alta expresión de ARNm de IL-15 e IL-15R α y nuestros resultados por citometría de flujo nos permiten demostrar la expresión a nivel de proteína de IL-15R α intra y extracelularmente. Ya que se ha demostrado que el complejo IL-15/ IL-15R α por sí solo puede señalizar sin la presencia de las subunidades IL-15R β y γc (Marra et al., 2014) . Proponemos que la secreción del complejo IL-15/IL-15R α en las células tumorales de HCC de la línea celular HepG2 pudiese favorecer una infiltración de células NK en el microambiente tumoral inducido por un agotamiento de células T, lo cual permitiría una respuesta de las células NK de inmunidad innata pero que a su vez podrían inhibir la respuesta adaptativa de memoria de células T, lo que ocasionaría la evasión del sistema inmune, la progresión tumoral y una menor sobrevivencia, así como se ha reportado en un estudio de leucemia en un modelo murino donde un agotamiento de células T promueve la progresión tumoral (Berger et al., 2019).

Existen distintas neoplasias hematológicas en las cuales se ha reportado que células T y B malignas sobreexpresan IL-15 y presentan al receptor IL-15R, por lo que utilizan de manera autocrina a la IL-15 como un mecanismo que favorece su propagación (Yamada et al., 1998) (Tinhofer et al., 2000). (Döbbeling et al., 1998) ha demostrado que IL-15 se traduce eficientemente en proteína e incluso que una secreción menor de esta misma puede ser eficiente a distancias cortas, al haber mutaciones en las regiones del péptido líder del gen de IL-15 puede conducir a una mayor producción y secreción de IL-15 que, a su vez, podría estimular el crecimiento de las células CTCL de forma autocrina. Sin embargo, la IL-15 extracelular puede no ser la única forma importante para las células CTCL, (Tagaya et al., 1997) demostró que la forma peptídica líder corta de IL-15 se retiene en la célula y se acumula en el núcleo, sugiriendo que esta forma de IL-15 puede ser un ligando para una proteína intracelular que puede influir en la expresión genética. Aunado a esto, se han descrito 4 formas del complejo IL-15/IL-15R α relacionadas con la isoforma de la cadena IL-15R α involucrada en el complejo: (1) formas no escindibles unidas a membrana que llevan las isoformas EX2 de IL-15R α competentes para la señalización en cis y trans (2) un complejo soluble que contiene NPR-IL-15R α sin actividad biológica (3) formas no escindibles unidas a membrana que contienen isoformas de IL-15R α -IC-AID competentes para la señalización inversa y (4) un complejo soluble que consiste en la isoforma IL-15R α -IC3 con alta actividad biológica (Fiore et al., 2020).

Los complejos IL-15/IL-15R α secretados y unidos a membrana están continuamente presentes durante la progresión del melanoma. Es de destacar que, aunque IL-15/IL-15R α inicialmente promueve la producción de células T y NK citotóxicas, en la etapa de metástasis se ha observado una promoción del desarrollo de células NK citotóxicas anérgicas y disfuncionales. En un subgrupo de pacientes con melanoma metastásico, la secreción continua de grandes cantidades del complejo soluble podría representar un nuevo mecanismo de escape inmunológico de las células NK (Di Matteo et al., 2023).

Al igual que en otras líneas celulares que utilizan una vía autocrina como mecanismo de propagación, proponemos que IL-15 podría actuar en las células HepG2 a través de dos mecanismos de señalización. En una primera instancia sugerimos que IL-15 pudiese estar siendo traducida a través de la vía ER/Golgi y se secretada en forma de un complejo con IL-15R α , (Bergamaschi et al., 2009) de manera autocrina/paracrina, a través de un complejo soluble de IL-

15/IL-15R α , aunque desconocemos la isoforma de la cadena IL-15R α asociada al complejo, sugerimos que este complejo soluble podría estar implicado en un mecanismo de escape inmunológico de las células NK y o agotamiento de células T; así como lo ha propuesto (Reyes Mercado, 2023), quien ha mencionado que la transcripción de IL-15 podría ser traducida mediante dos vías de señalización, una autocrina y otra yuxtacrina a través de dos diferentes complejos que pudiesen actuar como un mecanismo entre el sistema inmune innato y adaptativo.

Además, sugerimos que el segundo mecanismo de señalización que pudiese estar actuando en las células HepG2 de HCC, sería a través de una vía yuxtacrina por medio de una señalización en trans del complejo IL-15/IL-15R α , el cual se ha demostrado como mecanismo favorable en diversas neoplasias activando la proliferación y la función citolítica antitumoral de las células inmunológicas infiltrantes de tumor, como son las células NK o linfocitos T. Inclusive se ha demostrado que la administración de IL-15 restaura la actividad de las células NK en el HCC (Easom N. J. et al., 2018). Sin embargo, inhibir la presentación en forma trans de IL-15 a células inmunológicas ya sea por un agotamiento o falta de infiltración de las células inmunológicas en el microambiente tumoral, puede impulsar un fenotipo protumoral ya que la IL-15 al unirse con alta afinidad a la subunidad IL15R α de las células cancerígenas puede estimular su proliferación a través de la activación de las vías de señalización STAT y ERK (Santana Carrero et al., 2019) (Wei et al., 2020), así como se ha reportado que una estimulación continua con IL15 puede inducir un agotamiento de las células NK (Felices et al., 2018), lo que eventualmente ocasionaría la evasión del sistema inmune, la progresión tumoral y una menor supervivencia.

Así mismo, se ha reportado que células de cáncer de mama triple negativas sobreexpresan IL-15R α , y la expresión concomitante de IL-15 en células que expresan IL-15R α estimula una cascada de señalización autocrina en ausencia de IL-2R β - e IL-2R γ_c , promoviendo la proliferación celular, la migración y bloqueando la apoptosis (Marra et al., 2014). Sin embargo, en este subgrupo de tumores de mama de alto grado, la coexpresión de IL-15 e IL-15R α se asocia con mejores resultados de supervivencia. En este estudio, demostramos la expresión basal de IL-15 e IL15R, tanto en tejidos tumorales con respecto a tejidos sanos, como en la línea celular MCF-7, donde nuestros productos de amplificación de ARNm expresan en una menor cantidad a IL-15R α , así como en nuestro análisis de ARN-seq.

(Gillgrass et al., 2014) ha demostrado en un modelo de metástasis de cáncer de mama que la sobreexpresión de IL-15 o el tratamiento con IL-15/IL-15R α disminuyen en gran medida la formación de sitios metastásicos en el pulmón, mientras que la falta de IL-15 promueve en gran medida la formación de metástasis, tanto en el modelo de cáncer de mama como en el modelo de melanoma B16F10, por lo que sugerimos que una baja expresión de IL-15 y la subunidad α podría promover la proliferación celular. Adicionalmente, los resultados de los ensayos por citometría de flujo en las células MCF-7 demuestran la presencia de IL-15R α de manera intra y extracelular.

Se ha demostrado que IL15 e IL15R α se unen entre sí a lo largo de una vía secretora y permanecen en un complejo al llegar a la membrana plasmática (Duitman et al., 2008). De hecho, en el linfoma de células T se produce un mecanismo de señalización autocrino mediado por IL15/IL15R α . Así mismo, (Marra et al., 2014) ha descrito una correlación positiva entre la transcripción de IL15 y el IL15R α , tanto en tumores como en diferentes líneas celulares de cáncer de mama (BCCL), donde existe una expresión basal de IL-15 e IL15R α . Aunado a esto, se sabe que IL15 es capaz de unirse a IL15R α intracelularmente para el cotransporte a la membrana plasmática (Duitman et al., 2008), necesaria para el crecimiento, lo que sugiere un fenotipo maligno autocrino impulsado por IL15/IL15R α en BCCL. Ante esto, sugerimos que la transcripción de IL-15 pudiese estar traducándose de dos maneras diferentes, en un principio se podría estar formando el complejo SIL-15, asociado a IL-15R α dentro de las células antes de emerger a la superficie celular o la forma tmb-IL-15 pudiese estar uniéndose fuera de la membrana a IL-15R α para promover consecuentemente la transpresentación con las subunidades IL-15R β/γ c, lo cual, no solo indicaría que las células MCF-7 presenten una señalización autocrina sugiriendo un fenotipo maligno por el complejo SIL15/IL15R α en consonancia con los antecedentes antes señalados, sino que también, por medio de la transpresentacion pudiera ocurrir una señalización yuxtacrina a través del complejo tp- IL15/IL15R α con células adyacentes que expresen los heterodímeros IL-15R β / γ c, así como lo antes sugerido en células de HCC.

Por otro lado, se realizó un análisis de expresión de IL-15 e IL-15R con respecto al estadio tumoral, edad y probabilidades de supervivencia de los tumores de este estudio. Nuestros resultados demuestran que en HCC y CPCNP hay una mayor expresión de IL-15 en pacientes mayores de 50 años en comparación de los pacientes jóvenes (≤ 49 años). En el caso de CC y CDI no hay una diferencia de expresión de IL-15 con respecto a la edad de los pacientes, por lo que proponemos

que para el caso de los pacientes de edad avanzada con HCC y CPCNP la expresión de IL-15 puede ser uno de los factores que contribuye al desarrollo tumoral y a la agresividad de esos tumores, ya que el diagnóstico para los pacientes de estas edades es más comprometido de acuerdo con (F. et al., 2018)

En el caso asociativo del estadio del tumor y la probabilidad de supervivencia, observamos que no existe una diferencia de la expresión de IL-15 con respecto a las etapas de cada tumor analizado. No obstante, el análisis de supervivencia demuestra que la alta expresión IL-15R α tiene una tendencia a disminuir la supervivencia de los pacientes con respecto a la baja expresión en CC, sin embargo, esta tendencia no es significativa. En el caso del HCC para IL-15R α los resultados demuestran que la alta expresión disminuye la supervivencia de los pacientes, siendo esta disminución significativa. Contrario a esto, para CDI y CPCNP no se observa una tendencia de disminución de la supervivencia con respecto a la bajo o alta expresión de los genes estudiados.

(Di Matteo et al., 2023) ha reportado que una alta expresión de IL-15 e IL-15R α , se correlaciona con una buena supervivencia general en los estadios II y III en pacientes con melanoma, pero esta correlación positiva se pierde en el estadio IV, donde una fuerte expresión de IL-15 e IL-15R α se correlaciona significativamente con el alto nivel de expresión de CD5, un marcador presente en los linfocitos T infiltrantes (TIL), y de NKp46, un receptor activador específico de NK, sugiriendo así, que la IL-15 intratumoral muestra un papel bifásico en la evolución del melanoma, donde hay un efecto inmunológico positivo que se conserva hasta el estadio III, pero que se pierde durante el estadio IV. Estos eventos se correlacionan fuertemente con la evolución de las interacciones entre la IL-15 intratumoral y las células T.

Por consiguiente, y con base a los antecedentes ya mencionados, podemos pensar que IL-15 puede participar en cualquier etapa del estadio FIGO regulando diferentes procesos. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar esta aseveración. Aunado a esto, resaltamos que la alta expresión de IL-15R α disminuye significativamente la supervivencia de los pacientes con HCC, esto nos hace pensar que IL-15 a través de la subunidad IL-15R α desempeñan un papel importante en la agresividad de este tumor a través del complejo SIL-15/IL-15R α .

En general los resultados de este trabajo demuestran que IL-15 y su receptor IL-15R tienen una expresión diferencial en los tumores con respecto a los tejidos normales, esta expresión depende

del tipo de tumor y la edad de los pacientes. Además, se encuentran estos genes expresados en las líneas celulares afines a los tumores de estudio.

13. Conclusión

Los resultados de este trabajo demuestran una mayor expresión de IL-15 y su receptor IL-15R en la mayoría de los tumores sólidos analizados a diferencia de los tejidos normales. Esta diferencia de expresión puede estar asociada al desarrollo tumoral, ya que, IL-15 desempeña diferentes actividades biológicas. El análisis con respecto a la edad de los pacientes demuestra una mayor expresión de IL-15 en los tumores HCC y CPCNP. El análisis de Kaplan-Meier demuestra que la alta expresión de IL-15R α disminuye la supervivencia de los pacientes con cáncer HCC. Por su parte, en las líneas celulares se demostró una expresión basal de IL-15 y su receptor IL-15R, observando una mayor expresión preferentemente en la línea celular HepG2. Adicionalmente, se demuestra por citometría de flujo la presencia de IL-15R α en la membrana de la línea celular HepG2 y MCF7

Este trabajo nos encamina a entender el papel que desempeña la IL-15 e IL-15R en los tumores sólidos de Cérnix, Mama, Hígado y Pulmón, y su posible uso como blancos terapéuticos.

14. Perspectivas

Los resultados de esta tesis proporcionan evidencia del posible papel que desempeña IL-15/IL-15R en el desarrollo tumoral, sin embargo, se requieren más estudios para comprobar las aseveraciones hechas en este trabajo. Para los estudios futuros se proponen a los tumores de cáncer de mama, cérvix y sus líneas celulares como modelos de estudio para explicar el papel de IL-15/IL-15R en el desarrollo tumoral.

Para determinar si IL-15 regula la proliferación celular, se propones estimular a líneas celulares de mama y cérvix con diferentes concentraciones de IL-15 exógena.

Para determinar la funcionalidad de IL-15R, se propone utilizar anticuerpos neutralizantes contra el receptor en líneas celulares de cáncer de mama y cérvix.

Adicionalmente, se podrían realizar ensayos de invasión, migración o resistencia a la inducción de apoptosis por agentes terapéuticos, al estimular a las líneas celulares de cáncer de mama y cérvix con diferentes concentraciones de IL-15 exógena.

Para poder demostrar un agotamiento de células NK en cáncer de mama y cérvix, se realizarían co-cultivos de células NK y células tumorales en presencia de IL-15 exógena, eventualmente este resultado se correlacionaría con la evasión del sistema inmune y la progresión tumoral.

Referencias Bibliográficas

- Adunyah, S. E., Wheeler, B. J., y Cooper, R. S. (1997). Evidence for the involvement of LCK and MAP kinase (ERK-1) in the signal transduction mechanism of interleukin-15. *Biochemical and biophysical research communications*, 232(3), 754–758. [https://doi.org/10.1006 / bbrc.1997.6367](https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6367)
- Aerts, J. G., & Hegmans, J. P. (2013). Tumor-specific cytotoxic T cells are crucial for efficacy of immunomodulatory antibodies in patients with lung cancer. *Cancer research*, 73(8), 2381–2388. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1158/0008-5472.CAN-12-3932>
- Ali, A. K. (2015). IL-15-PI3K-AKT-mTOR: A Critical Pathway in the Life Journey of Natural Killer Cells. *Frontiers in immunology*, 6, 355. <https://doi.org/10.3389 / fimmu.2015.00355>
- Anderson, D. M., Johnson, L., Glaccum, M. B., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., . . . & Morris, S. W. (1995). Chromosomal assignment and genomic structure of IL-15. *Genomics*, 25(3). [https://doi.org/10.1016 / 0888-7543 \(95\) 80013-c](https://doi.org/10.1016 / 0888-7543 (95) 80013-c)
- Azimi, N., Brown, K., Bamford, R. N., Tagaya, Y., Siebenlist, U., y & Waldmann, T. A. (1998). Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2452–2457. <https://doi.org/10.1073 / pnas.95.5.2452>
- Azimi, N., Brown, K., Bamford, R. N., Tagaya, Y., Siebenlist, U., y & Waldmann, T. A. (1998). Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2452–2457. <https://doi.org/10.1073 / pnas.95.5.2452>
- Azzarone, B. P.-C. (1996). Are interleukin-2 and interleukin-15 tumor promoting factors for human non-hematopoietic cells?. *European cytokine network*, 7(1), 27–36. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/8704093/>
- Badoual, C., Bouchaud, G., Agueznay, N., Mortier, E., Hans, S., Gey, A., . . . & Tartour, E. (2008). The soluble alpha chain of interleukin-15 receptor: a proinflammatory molecule associated with tumor progression in head and neck cancer. *Cancer research*, 68(10), 3907–3914. <https://doi.org/10.1158 / 0008-5472.CAN-07-6842>
- Bamford, R. N., Grant, A. J., Burton, J. D., Peters, C., Kurys, G., Goldman, C. K., . . . & Waldmann, T. A. (1994). The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(11), 4940–4944. <https://doi.org/10.1073 / pnas.91.11.4940>

- Barzegar, C., Meazza, R., Pereno, R., Pottin-Clemenceau, C., Scudeletti, M., Brouty-Boyé, D., . . . & Azzarone, B. (1998). IL-15 is produced by a subset of human melanomas, and is involved in the regulation of markers of melanoma progression through juxtacrine loops. *Oncogene*, *16*(19), 2503–2512. <https://doi.org/10.1038 / sj.onc.1201775>
- Batra, S. A., Rathi, P., Guo, L., Courtney, A. N., Fleurence, J., Balzeau, J., . . . & Heczey, A. (2020). Glypican-3-Specific CAR T Cells Coexpressing IL15 and IL21 Have Superior Expansion and Antitumor Activity against Hepatocellular Carcinoma. *Cancer immunology research*, *8*(3), 309–320. <https://doi.org/10.1158 / 2326-6066.CIR-19-0293>
- Becker, T. C., Wherry, E. J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., y & Ahmed, R. (2002). Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *The Journal of experimental medicine*, *195*(12), 1541–1548. <https://doi.org/10.1084 / jem.20020369>
- Belisle, J. A., Gubbels, J. A., Raphael, C. A., Migneault, M., Rancourt, C., Connor, J. P., y & Patankar, M. S. (2007). Peritoneal natural killer cells from epithelial ovarian cancer patients show an altered phenotype and bind to the tumour marker MUC16 (CA125). *Immunology*, *122*(3), 418–429. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1111/j.1365-2567.2007.02660.x>
- Berard, M., Brandt, K., Bulfone-Paus, S., y & Tough, D. F. (2003). IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. *Journal of immunology*, *170*(10), 5018–5026. <https://doi.org/https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.10.5018>
- Berek, J. S., Matias-Guiu, X., Creutzberg, C., Fotopoulou, C., Gaffney, D., Kehoe, S., . . . & Endometrial Cancer Staging Subcommittee, F. W. (2023). FIGO staging of endometrial cancer: 2023. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, *162*(2), 383–394. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijgo.14923>
- Bergamaschi, C., Bear, J., Rosati, M., Beach, R. K., Alicea, C., Sowder, R., . . . & Pavlakis, G. N. (2012). Circulating IL-15 exists as heterodimeric complex with soluble IL-15R α in human and mouse serum. *Blood*, *120*(1), e1–e8. <https://doi.org/10.1182 / sangre-2011-10-384362>
- Bergamaschi, C., Jalah, R., Kulkarni, V., Rosati, M., Zhang, G. M., Alicea, C., . . . & Pavlakis, G. N. (2009). Secretion and biological activity of short signal peptide IL-15 is chaperoned by IL-15 receptor alpha in vivo. *Journal of immunology*, *183*(5), 3064–3072. <https://doi.org/10.4049 / jimmunol.0900693>
- Berger, A., Colpitts, S. J., Seabrook, M. S., Furlonger, C. L., Bendix, M. B., Moreau, J. M., . . . & Paige, C. J. (2019). Interleukin-15 in cancer immunotherapy: IL-15 receptor complex versus soluble IL-15 in a cancer cell-delivered murine leukemia model. *Journal for*

- immunotherapy of cancer*, 7(1), 355. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1186/s40425-019-0777-8>
- Bouchard, A., Ratthé, C., y & Girard, D. (2004). Interleukin-15 delays human neutrophil apoptosis by intracellular events and not via extracellular factors: role of Mcl-1 and decreased activity of caspase-3 and caspase-8. *Journal of leukocyte biology*, 75(5), 893–900. <https://doi.org/10.1189/jlb.1103585>
- Bulanova, E., Budagian, V., Pohl, T., Krause, H., Dürkop, H., Paus, R., y & Bulfone-Paus, S. (2001). The IL-15R alpha chain signals through association with Syk in human B cells. *Journal of immunology*, 167(11), 6292–6302. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6292>
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J., Hubbard, S., Harding, H., . . . & Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*, 415(6867), 92–96. <https://doi.org/10.1038/415092a>
- Chen, J., Petrus, M., Bamford, R., Shih, J. H., Morris, J. C., Janik, J. E., y & Waldmann, T. A. (2012). Increased serum soluble IL-15R α levels in T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Blood*, 119(1), 137–143. <https://doi.org/10.1182/sangre-2011-04-346759>
- Cierna, Z., Smolkova, B., Cholujova, D., Gronesova, P., Miklikova, S., Cihova, M., . . . & Mego, M. (2021). Decreased levels of circulating cytokines VEGF, TNF- β and IL-15 indicate PD-L1 overexpression in tumours of primary breast cancer patients. *Scientific reports*, 11(1), 1294. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80351-9>
- Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M. A., Vallejo, C., . . . & Moreno, M. (1997). The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*, 79(12), 2320–2328. [https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19970615\)79:12<2320::aid-cnrcr5>3.0.co;2-p](https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1002/(sici)1097-0142(19970615)79:12<2320::aid-cnrcr5>3.0.co;2-p)
- Di Matteo, S., Munari, E., Fiore, P. F., Santopolo, S., Sampaoli, C., Pelosi, A., . . . Moretta. (2023). The roles of different forms of IL-15 in human melanoma progression. *Frontiers in immunology*, 14, 1183668. <https://doi.org/https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3389/fimmu.2023.1183668>
- Döbbeling, U., Dummer, R., Laine, E., Potoczna, N., Qin, J. Z., y & Burg, G. (1998). Interleukin-15 is an autocrine/paracrine viability factor for cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood*, 92(1), 252–258.
- Döbbeling, U., Dummer, R., Laine, E., Potoczna, N., Qin, J. Z., y & Burg, G. (1998). Interleukin-15 is an autocrine/paracrine viability factor for cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood*, 92(1), 252–258. https://doi.org/10.1182/blood.V92.1.252.413k08_252_258

- Donskov, F., & Von der Maase, H. (2006). Impact of immune parameters on long-term survival in metastatic renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(13), 1997–2005. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1200/JCO.2005.03.9594>
- Doucet, C., Meazza, R., Pottin-Clemenceau, C., Scudeletti, M., Brouty-Boye, D., Ferrini, S., . . . & Indiveri, F. (1997). Role of interleukin (IL)-2 and IL-15 in the tumour progression of a melanoma cell line MELP, derived from an IL-2 progressor patient. *Melanoma research*, 7(Suppl 2), S7-17.
- Dubois, S., Conlon, K. C., Müller, J. R., Hsu-Albert, J., Beltran, N., Bryant, B. R., y & Waldmann, T. A. (2017). IL15 Infusion of Cancer Patients Expands the Subpopulation of Cytotoxic CD56bright NK Cells and Increases NK-Cell Cytokine Release Capabilities. *Cancer immunology research*, 5(10), 929–938. <https://doi.org/10.1158 / 2326-6066.CIR-17-0279>
- Duitman, E. H., Orinska, Z., Bulanova, E., Paus, R., y & Bulfone-Paus, S. (2008). How a cytokine is chaperoned through the secretory pathway by complexing with its own receptor: lessons from interleukin-15 (IL-15)/IL-15 receptor alpha. *Molecular and cellular biology*, 28(15), 4851–4861. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1128/MCB.02178-07>
- Easom, N. J., Stegmann, K. A., Swadling, L., Pallett, L. J., Burton, A. R., Odera, D., . . . & Maini, M. K. (2018). IL-15 Overcomes Hepatocellular Carcinoma-Induced NK Cell Dysfunction. *Frontiers in immunology*, 9, 1009. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3389/fimmu.2018.01009>
- Easom, N., Stegmann, K. A., Swadling, L., Pallett, L. J., Burton, A. R., Odera, D., . . . & Maini, M. K. (2018). IL-15 Overcomes Hepatocellular Carcinoma-Induced NK Cell Dysfunction. *Frontiers in immunology*, 9(1009). <https://doi.org/10.3389 / fimmu.2018.01009>
- Ellery, J. M. (2002). Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor. *Cytokine & growth factor reviews*, 13(1), 27–40. [https://doi.org/10.1016 / s1359-6101 \(01\) 00023-5](https://doi.org/10.1016 / s1359-6101 (01) 00023-5)
- Escobar Contreras, J. (2023). *Expresión de IL-15 y su receptor IL-15R en líneas celulares de cáncer cervical (Tesis de licenciatura, UNAM)*. <http://132.248.9.195/ptd2023/junio/0842525/Index.html> Texto completo
- F., B., J., F., I., S., RL, S., LA, T., y A., J. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Fantini, M., David, J. M., Wong, H. C., Annunziata, C. M., Arlen, P. M., y & Tsang, K. Y. (2019). An IL-15 Superagonist, ALT-803, Enhances Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity Elicited by the Monoclonal Antibody NEO-201 Against Human Carcinoma Cells. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, 34(3), 147–159. <https://doi.org/10.1089 / cbr.2018.2628>

- Fehniger, T. A. (2001). Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*, 97(1), 14–32. <https://doi.org/10.1182 / blood.v97.1.14>
- Felices, M., Lenvik, A. J., McElmurry, R., Chu, S., Hinderlie, P., Bendzick, L., . . . & Miller, J. S. (2018). Continuous treatment with IL-15 exhausts human NK cells via a metabolic defect. *JCI insight*, 3(3), e96219. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1172/jci.insight.96219>
- Fiore, P. F., Di Matteo, S., Tumino, N., Mariotti, F. R., Pietra, G., Ottonello, S., . . . & Azzarone, B. (2020). Interleukin-15 and cancer: some solved and many unsolved questions. *Journal for immunotherapy of cancer*, 8 (2). <https://doi.org/10.1136 / jitc-2020-001428>
- Fujii, R., Jochems, C., Tritsch, S. R., Wong, H. C., Schlom, J., y & Hodge, J. W. (2018). An IL-15 superagonist/IL-15R α fusion complex protects and rescues NK cell-cytotoxic function from TGF- β 1-mediated immunosuppression. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 67(4), 675–689. <https://doi.org/10.1007 / s00262-018-2121-4>
- Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 9(3), 162–174. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/nri2506>
- Gillgrass, A., Gill, N., Babian, A., y & Ashkar, A. A. (2014). The absence or overexpression of IL-15 drastically alters breast cancer metastasis via effects on NK cells, CD4 T cells, and macrophages. *Journal of immunology*, 193(12), 6184–6191. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.4049/jimmunol.1303175>
- Giron-Michel, J., Giuliani, M., Fogli, M., Brouty-Boyé, D., Ferrini, S., Baychelier, F., . . . & Azzarone, B. (2005). Membrane-bound and soluble IL-15/IL-15R α complexes display differential signaling and functions on human hematopoietic progenitors. *Blood*, 106(7), 2302–10. <https://doi.org/10.1182 / sangre-2005-01-0064>
- Gotthardt, D., Trifinopoulos, J., Sexl, V., y & Putz, E. M. (2019). AK/STAT Cytokine Signaling at the Crossroad of NK Cell Development and Maturation. *Frontiers in immunology*, 10, 2590. <https://doi.org/10.3389 / fimmu.2019.02590>
- Gotthardt, D., y & Sexl, V. (2016). STATs in NK-Cells: The Good, the Bad, and the Ugly. *Frontiers in immunology*, 7(694). <https://doi.org/10.3389 / fimmu.2016.00694>
- Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., . . . & Ahdieh, M. (1994). Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science*, 264(5161), 965–8. <https://doi.org/10.1126 / science.8178155>
- Graham, D. K., DeRyckere, D., Davies, K. D., y & Earp, H. S. (2014). The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 14(12), 769–785. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/nrc3847>

- Gu, H., Maeda, H., Moon, J. J., Lord, J. D., Yoakim, M., Nelson, B. H., y & Neel, B. G. (2000). New role for Shc in activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Molecular and cellular biology*, 20(19), 7109–7120. <https://doi.org/10.1128 / MCB.20.19.7109-7120.2000>
- Guo, Y. L., L. Patil, N. K., y & Sherwood, E. R. (2017). Immunobiology of the IL-15/IL-15R α complex as an antitumor and antiviral agent. *Cytokine & growth factor reviews*, 38, 10-21. <https://doi.org/10.1016 / j.cytogfr.2017.08.002>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hu, Z., Luo, D., Wang, D., Ma, L., Z. Y., y & Li, L. (2017). IL-17 Activates the IL-6/STAT3 Signal Pathway in the Proliferation of Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 43(6), 2379–2390. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1159/000484390>
- Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., . . . & Aikou, T. (2000). Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer*, 88(3), 577–583. <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.pbidi.unam.mx:2443/10649250/>
- Jackson, N. E. (2005). IL-15 induces mast cell migration via a pertussis toxin-sensitive receptor. *European journal of immunology*, 35(8), 2376–2385. <https://doi.org/10.1002 / eji.200526154>
- Johnston, J. A. (1995). Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(19), 8705–8709. <https://doi.org/10.1073 / pnas.92.19.8705>
- Jonuleit, H., Wiedemann, K., Müller, G., Degwert, J., Hoppe, U., Knop, J., y & Enk, A. H. (1997). Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells. *Journal of immunology*, 158(6), 2610–2615.
- Konjević, G. M., Vuletić, A. M., Mirjačić Martinović, K. M., Larsen, A. K., y & Jurišić, V. B. (2019). The role of cytokines in the regulation of NK cells in the tumor environment. *Cytokine*, 117, 30–40. <https://doi.org/10.1016 / j.cyto.2019.02.001>
- Kuniyasu, H., Ohmori, H., Sasaki, T., Sasahira, T., Yoshida, K., Kitadai, Y., y & Fidler, I. J. (2003). Production of interleukin 15 by human colon cancer cells is associated with induction of mucosal hyperplasia, angiogenesis, and metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9(13), 4802–4810.
- Kuniyasu, H., Oue, N., Nakae, D., Tsutsumi, M., Denda, A., Tsujiuchi, T., . . . & Yasui, W. (2001). Interleukin-15 expression is associated with malignant potential in colon cancer cells.

- Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 69(2), 86–95. <https://doi.org/10.1159 / 000048761>
- Kurys, G., Tagaya, Y., Bamford, R., Hanover, J. A., y & Waldmann, T. A. (2000). The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15. *The Journal of biological chemistry*, 275(39), 30653–30659. <https://doi.org/10.1074 / jbc.M002373200>
- Lin, J. X. (1995). The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity*, 2(4), 331–339. [https://doi.org/10.1016 / 1074-7613 \(95\) 90141-8](https://doi.org/10.1016 / 1074-7613 (95) 90141-8)
- Lin, S., Huang, G., Xiao, Y., Sun, W., Jiang, Y., Deng, Q., . . . Li, P. (2017). CD215+ Myeloid Cells Respond to Interleukin 15 Stimulation and Promote Tumor Progression. *Frontiers in immunology*, 8, 1713. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.3389/fimmu.2017.01713>
- Liu, Y., Cheng, Y., Xu, Y., Wang, Z., Du, X., Li, C., . . . & Ma, C. (2017). Increased expression of programmed cell death protein 1 on NK cells inhibits NK-cell-mediated anti-tumor function and indicates poor prognosis in digestive cancers. *Oncogene*, 36(44), 6143–6153. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/onc.2017.209>
- Lord, J. D., McIntosh, B. C., Greenberg, P. D., y & Nelson, B. H. (2000). The IL-2 receptor promotes lymphocyte proliferation and induction of the c-myc, bcl-2, and bcl-x genes through the trans-activation domain of Stat5. *ournal of immunology*, 164(5), 2533–2541. <https://doi.org/10.4049 / jimmunol.164.5.2533>
- Mantovani, S., Varchetta, S., Mele, D., Donadon, M., Torzilli, G., Soldani, C., . . . Bernuzzi, S. L. (2020). An Anti-MICA/B Antibody and IL-15 Rescue Altered NKG2D-Dependent NK Cell Responses in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers*, 12(12), 3583. <https://doi.org/10.3390/cancers12123583>
- Mao, Y., van Hoef, V., Zhang, X., Wennerberg, E., Lorent, J., Witt, K., . . . & Lundqvist, A. (2016). IL-15 activates mTOR and primes stress-activated gene expression leading to prolonged antitumor capacity of NK cells. *Blood*, 128(11), 1475–1489. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-698027>
- Marabelle, A., Kohrt, H., Caux, C., y & Levy, R. (2014). Intratumoral immunization: a new paradigm for cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(7), 1747–1756. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1158/1078-0432.CCR-13-2116>
- Marks-Konczalik, J., Dubois, S., Losi, J. M., Sabzevari, H., Yamada, N., Feigenbaum, L., . . . & Tagaya, Y. (2000). IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(21), 11445–11450. <https://doi.org/10.1073 / pnas.200363097>

- Marra, P., Mathew, S., Grigoriadis, A., Wu, Y., Kyle-Cezar, F., Watkins, J., . . . & Tutt, A. (2014). IL15RA drives antagonistic mechanisms of cancer development and immune control in lymphocyte-enriched triple-negative breast cancers. *Cancer Research*, *74*(17), 4908–4921. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1158/0008-5472.CAN-14-0637>
- Masuda, A., Matsuguchi, T., Yamaki, K., Hayakawa, T., y & Yoshikai, Y. (2001). Interleukin-15 prevents mouse mast cell apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL expression. *The Journal of biological chemistry*, *276*(28), 26107–26113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011475200>
- Meazza, R., Basso, S., Gaggero, A., Detotero, D., Trentin, L., Pereno, R., . . . & Ferrini, S. (1998). Interleukin (IL)-15 induces survival and proliferation of the growth factor-dependent acute myeloid leukemia M-07e through the IL-2 receptor beta/gamma. *International journal of cancer*, *78*(2), 189–195. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19981005\)78:2<189::aid-ijc12>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19981005)78:2<189::aid-ijc12>3.0.co;2-6)
- Mishra, A. S. (2014). Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, *20*(8), 2044–2050. <https://doi.org/10.1158 / 1078-0432.CCR-12-3603>
- Miyazaki, T., Kawahara, A., Fujii, H., Nakagawa, Y., Minami, Y., Liu, Z. J., . . . & Ihle, J. N. (1994). Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science*, *266*(5187), 1045–1047. <https://doi.org/10.1126 / science.7973659>
- Miyazaki, T., Liu, Z. J., Kawahara, A., Minami, Y., Yamada, K., Tsujimoto, Y., . . . & Taniguchi, T. (1995). Three distinct IL-2 signaling pathways mediated by bcl-2, c-myc, and lck cooperate in hematopoietic cell proliferation. *Cell*, *81*(2), 223–231. [https://doi.org/10.1016 / 0092-8674 \(95\) 90332-1](https://doi.org/10.1016 / 0092-8674 (95) 90332-1)
- Moga, E., Alvarez, E., Cantó, E., Vidal, S., Rodríguez-Sánchez, J. L., Sierra, J., y & Briones, J. (2008). NK cells stimulated with IL-15 or CpG ODN enhance rituximab-dependent cellular cytotoxicity against B-cell lymphoma. *Experimental hematology*, *36*(1), 69–77. <https://doi.org/10.1016 / j.exphem.2007.08.012>
- Mortier, E., Advincula, R., Kim, L., Chmura, S., Barrera, J., Reizis, B., . . . & Ma, A. (2009). Macrophage- and dendritic-cell-derived interleukin-15 receptor alpha supports homeostasis of distinct CD8+ T cell subsets. *Immunity*, *31*(5), 811–822. <https://doi.org/10.1016 / j.immuni.2009.09.017>
- Mortier, E., Woo, T., Advincula, R., Gozalo, S., y & Ma, A. (2008). IL-15Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *The Journal of experimental medicine*, *205*(5), 1213–1225. <https://doi.org/10.1084 / jem.20071913>

- Nguyen, S. T., Hasegawa, S., Tsuda, H., Tomioka, H., Ushijima, M., Noda, M., . . . & Miki, Y. (2007). Identification of a predictive gene expression signature of cervical lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Cancer science*, *98*(5), 740–746. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00454.x>
- Nimmerjahn, F. & (2007). Antibodies, Fc receptors and cancer. *Current opinion in immunology*, *19*(2), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.01.005>
- Oskarsson, T., Batlle, E., y & Massagué, J. (2014). Metastatic stem cells: sources, niches, and vital pathways. *Cell stem cell*, *14*(3), 306–321. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.stem.2014.02.002>
- Ostrand-Rosenberg, S., & Sinha, P. (2009). Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *Journal of immunology*, *182*(8), 4499–4506. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.4049/jimmunol.0802740>
- Park, S. Y., Saijo, K., Takahashi, T., Osawa, M., Arase, H., Hirayama, N., . . . & Saito, T. (1995). Developmental defects of lymphoid cells in Jak3 kinase-deficient mice. *Immunity*, *3*(6), 771–782. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90066-7](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90066-7)
- Patidar, M. Y. (2016). Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy. *Cytokine & growth factor reviews*, *31*, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.06.001>
- Pereno, R., Giron-Michel, J., Gaggero, A., Cazes, E., Meazza, R., Monetti, M., . . . & Azzarone, B. (2000). IL-15/IL-15Ralpha intracellular trafficking in human melanoma cells and signal transduction through the IL-15Ralpha. *Oncogene*, *19*(45), 5153–5162. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203873>
- Picker, L. J., Reed-Inderbitzin, E. F., Hagen, S. I., Edgar, J. B., Hansen, S. G., Legasse, A., . . . & Villinger, F. (2006). IL-15 induces CD4 effector memory T cell production and tissue emigration in nonhuman primates. *The Journal of clinical investigation*, *116*(6), 1514–1524. <https://doi.org/10.1172/JCI27564>
- Poznanski, S. M., Ritchie, T. M., Fan, I. Y., El-Sayes, A., Portillo, A. L., Ben-Avi, R., . . . & Ashkar, A. A. (2021). Expanded human NK cells from lung cancer patients sensitize patients' PDL1-negative tumors to PD1-blockade therapy. *Journal for immunotherapy of cancer*, *9*(1), e001933. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1136/jitc-2020-001933>
- Poznanski, S. M.-S. (2021). Metabolic flexibility determines human NK cell functional fate in the tumor microenvironment. *Cell metabolism*, *33*(6), 1205–1220.e5. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.cmet.2021.03.023>
- Ratthé, C., & Girard, D. (2004). Interleukin-15 enhances human neutrophil phagocytosis by a Syk-dependent mechanism: importance of the IL-15Ralpha chain. *Journal of leukocyte biology*, *76*(1), 162–168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1189/jlb.0605298>

- Reyes Mercado, S. R. (2023). *Evaluación de la expresión de IL-2, Il-15 y sus receptores IL-2R e IL-15R en células de carcinoma hepatocelular (Tesis de Licenciatura, UNAM)*.
- Rocha-Zavaleta, L., Huitron, C., Cacéres-Cortés, J. R., Alvarado-Moreno, J. A., Valle-Mendiola, A., Soto-Cruz, I., . . . & Rangel-Corona, R. (2004). Interleukin-2 (IL-2) receptor-beta/gamma 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. *Cellular signalling*, *16*(11), 1239–1247. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.03.011>
- Rubinstein, M. P., Lind, N. A., Purton, J. F., Filippou, P., Best, J. A., McGhee, P. A., . . . & Goldrath, A. W. (2008). IL-7 and IL-15 differentially regulate CD8+ T-cell subsets during contraction of the immune response. *Blood*, *112*(9), 3704–3712. <https://doi.org/10.1182/sangre-2008-06-160945>
- Santana Carrero, R. M., Beceren-Braun, F., Rivas, S. C., Hegde, S. M., Gangadharan, A., Plote, D., . . . & Schluns, K. S. (2019). IL-15 is a component of the inflammatory milieu in the tumor microenvironment promoting antitumor responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *16*(2), 599–608. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814642116>
- Schreiber, R. D., Old, L. J., y Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, *331*(6024), 1565–1570. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1126/science.1203486>
- Screpanti, V., Wallin, R. P., Ljunggren, H.-G., y Grandien, A. (2001). A Central Role for Death Receptor-Mediated Apoptosis in the Rejection of Tumors by NK Cells. *The Journal of Immunology*, *167*(4), 2068–2073. <https://doi.org/https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.2068>
- Seike, M., Yanaihara, N., Bowman, E. D., Zanetti, K. A., Budhu, A., Kumamoto, K., . . . & Harris, C. C. (2007). Use of a cytokine gene expression signature in lung adenocarcinoma and the surrounding tissue as a prognostic classifier. *Journal of the National Cancer Institute*, *99*(16), 1257–1269. <https://doi.org/10.1093/jnci/djm083>
- Shakiba, E., Ramezani, M., y Sadeghi, M. (2018). Evaluation of serum interleukin-6 levels in hepatocellular carcinoma patients: a systematic review and meta-analysis. *Clinical and experimental hepatology*, *4*(3), 182–190. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.5114/ceh.2018.78122>
- Shibuya, H., Yoneyama, M., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K., y Taniguchi, T. (1992). IL-2 and EGF receptors stimulate the hematopoietic cell cycle via different signaling pathways: demonstration of a novel role for c-myc. *Cell*, *70*(1), 57–67. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90533-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90533-i)

- Sun, H., & Liu, D. (2016). IL-15/sIL-15R α gene transfer suppresses Lewis lung cancer growth in the lungs, liver and kidneys. *Cancer gene therapy*, 23(2-3), 54–60. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/cgt.2015.67>
- Swann, J. B., & Smyth, M. J. (2007). Immune surveillance of tumors. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), 1137–1146. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1172/JCI31405>
- Tagaya, Y., Kurys, G., Thies, T., Losi, J., Azimi, N., Hanover, J., . . . Waldmann, T. (1997). Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 94 (26), 14444–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.26.144444>
- Tamzalit, F., Barbieux, I., Plet, A., Heim, J., Nedellec, S., Morisseau, S., . . . & Mortier, E. (2014). IL-15/IL-15R α complex shedding following trans-presentation is essential for the survival of IL-15 responding NK and T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(23), 8565–8570.
- Tinhofer, I. M. (2000). Expression of functional interleukin-15 receptor and autocrine production of interleukin-15 as mechanisms of tumor propagation in multiple myeloma. *Blood*, 95(2), 610–618.
- Tinhofer, I., Marschitz, I., Henn, T., Egle, A., y & Greil, R. (2000). Expression of functional interleukin-15 receptor and autocrine production of interleukin-15 as mechanisms of tumor propagation in multiple myeloma. *Blood*, 95(2), 610–618. <https://doi.org/10.1182/blood.V95.2.610>
- Trentin, L., Cerutti, A., Zambello, R., Sancetta, R., Tassinari, C., Facco, M., . . . & Semenzato, G. (1996). Interleukin-15 promotes the growth of leukemic cells of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Blood*, 87(8), 3327–3335.
- Trujillo-Cirilo, L., Torres-Corioriles, E. I., Rangel-Corona, R., Corona-Ortega, M. T., y & Weiss-Steider, B. (2021). Evidence that the viral oncoproteins E6 and E7 of HPV induce the expression of a functional IL-2R on cervical cancer cells. *Cytokine*, 148, 155592. <https://doi.org/https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1016/j.cyto.2021.155592>
- Tumino, N., Nava Lauson, C. B., Tiberti, S., Besi, F., Martini, S., Fiore, P. F., . . . & Vacca, P. (2023). The tumor microenvironment drives NK cell metabolic dysfunction leading to impaired antitumor activity. *International journal of cancer*, 152(8), 1698–1706. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1002/ijc.34389>
- Waldmann T., A. (2003). IL-15 in the life and death of lymphocytes: immunotherapeutic implications. *Trends in molecular medicine*, 9(12), 517–521. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2003.10.005>

- Waldmann, T. A. (1999). The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *17*, 19–49. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.17.1.19>
- Waldmann, T. A., Miljkovic, M. D., y & Conlon, K. C. (2020). Interleukin-15 (dys)regulation of lymphoid homeostasis: Implications for therapy of autoimmunity and cancer. *The Journal of experimental medicine*, *217*(1). <https://doi.org/10.1084/jem.20191062>
- Wan, F., Miao, X., Quraishi, I., Kennedy, V., Creek, K. E., y & Pirisi, L. (2008). Gene expressions changes during HPV mediated carcinogenesis a comparison between an in vitro cell model an cervical cancer. . *International Journal of Cancer*, *123*(1), 32-40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.23463>
- Wang, Y., Zhang, Y., Yi, P., Dong, W., Nalin, A. P., Zhang, J., . . . & Yu, J. (2019). The IL-15-AKT-XBP1s signaling pathway contributes to effector functions and survival in human NK cells. *Nature immunology*, *20*(1), 10–17. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0265-1>
- Watkinson, F. N., Elhage, O., Papaevangelou, E., Dasgupta, P., y & Galustian, C. (2021). IL-15 Upregulates Telomerase Expression and Potently Increases Proliferative Capacity of NK, NKT-Like, and CD8 T Cells. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.594620>
- Wei, J., Guo, C., An, X., Miao, W., Zhang, C., Wang, B., . . . & Zhang, F. (2020). Tumor cell-expressed IL-15R α drives antagonistic effects on the progression and immune control of gastric cancer and is epigenetically regulated in EBV-positive gastric cancer. *Cellular oncology*, *43*(6), 1085–1097. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1007/s13402-020-00542-4>
- Yamada, Y., Sugawara, K., Hata, T., Tsuruta, K., Moriuchi, R., Maeda, T., . . . Kohno, T. T. (1998). Interleukin-15 (IL-15) can replace the IL-2 signal in IL-2-dependent adult T-cell leukemia (ATL) cell lines: expression of IL-15 receptor alpha on ATL cells. *Blood*, *91*(11), 4265–4272.
- Yamaji, K. N. (2006). Interferon-alpha/beta upregulate IL-15 expression in vitro and in vivo: analysis in human hepatocellular carcinoma cell lines and in chronic hepatitis C patients during interferon-alpha/beta treatment. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, *55*(4), 394–403. <https://doi.org/10.1007/s00262-005-0005-x>
- YG, H., E., M., J., M., y JY., N. (2004). Expression and possible function of IL-2 and IL-15 receptors on human uveal melanoma cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, *45*(12), 4240-6. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0599>.
- Zambello, R., Facco, M., Trentin, L., Sancetta, R., Tassinari, C., Perin, A., . . . & Semenzato, G. (1997). Interleukin-15 triggers the proliferation and cytotoxicity of granular lymphocytes

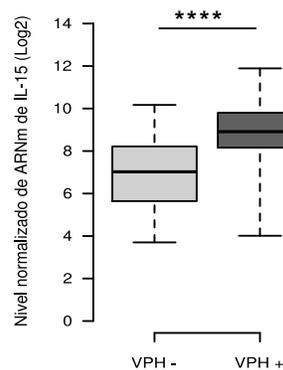
- in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood*, 89(1), 201–211. <https://doi.org/10.1182/blood.V89.1.201>
- Zhang, M., Wen, B., Anton, O. M., Yao, Z., Dubois, S., Ju, W., . . . & Waldmann, T. A. (2018). IL-15 enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by NK cells and macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(46), E10915–E10924. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811615115>
- Zhang, S., Zhao, J., Bai, X., Handley, M., y & Shan, F. (2021). Biological effects of IL-15 on immune cells and its potential for the treatment of cancer. *International immunopharmacology*, 91(107318). <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107318>
- Zhao, X., Qi, H., Zhou, J., Xu, S., y & Gao, Y. (2019). Treatment with Recombinant Interleukin-15 (IL-15) Increases the Number of T Cells and Natural Killer (NK) Cells and Levels of Interferon- γ (IFN- γ) in a Rat Model of Sepsis. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 25, 4450–4456. <https://doi.org/10.12659/MSM.914026>
- Zhu, L., Kalimuthu, S., Oh, J. M., Gangadaran, P., Baek, S. H., Jeong, S. Y., . . . & Ahn, B. C. (2019). Enhancement of antitumor potency of extracellular vesicles derived from natural killer cells by IL-15 priming. *Biomaterials*, 190-191, 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.034>

Anexos

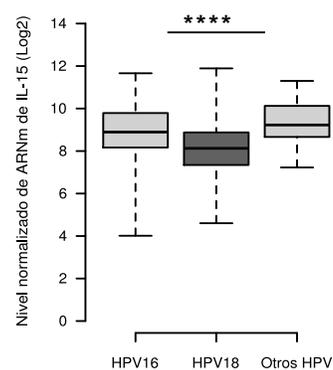
A) Impacto del estado del VPH en la expresión de IL-15 en tumores de CC a partir de la base de datos TCGA/Gtex.

Se han demostrado en diferentes estudios que la infección del Virus del Papiloma Humano (VPH) suele estar asociado con un mayor riesgo de desarrollo de CC, además de que está relacionado con cambios en la expresión de ciertos genes en las células infectadas. Para determinar si la expresión de IL-15 está asociada al VPH, se comparó la expresión de IL-15 en células tumorales de CC VPH+ con respecto a células tumorales VPH- utilizando la normalización RSEM. Los resultados muestran una mayor expresión de IL-15 en células tumorales de CC VPH-, esta diferencia de expresión es estadísticamente significativa. Además, este resultado nos demuestra que IL-15 se ve sobreexpresado en tumores VPH+. Así mismo se han descrito al VPH16 y VPH18 como los tipos virales del VPH que están más relacionados con la oncogénesis del CC, por lo que se comparó la expresión de IL-15 en células tumorales de CC VPH+ utilizando la normalización RSEM, comparando a los tipos virales VPH16, VPH18 y los tipos virales restantes se agruparon en un solo grupo de datos al que se le denominó “Otros VPH”. Los resultados muestran una diferencia de expresión de IL-15 estadísticamente significativa entre los diferentes tipos virales. Con respecto al resultado anterior podemos deducir que la simple presencia de cualquier tipo de VPH modifica la expresión de IL-15.

A



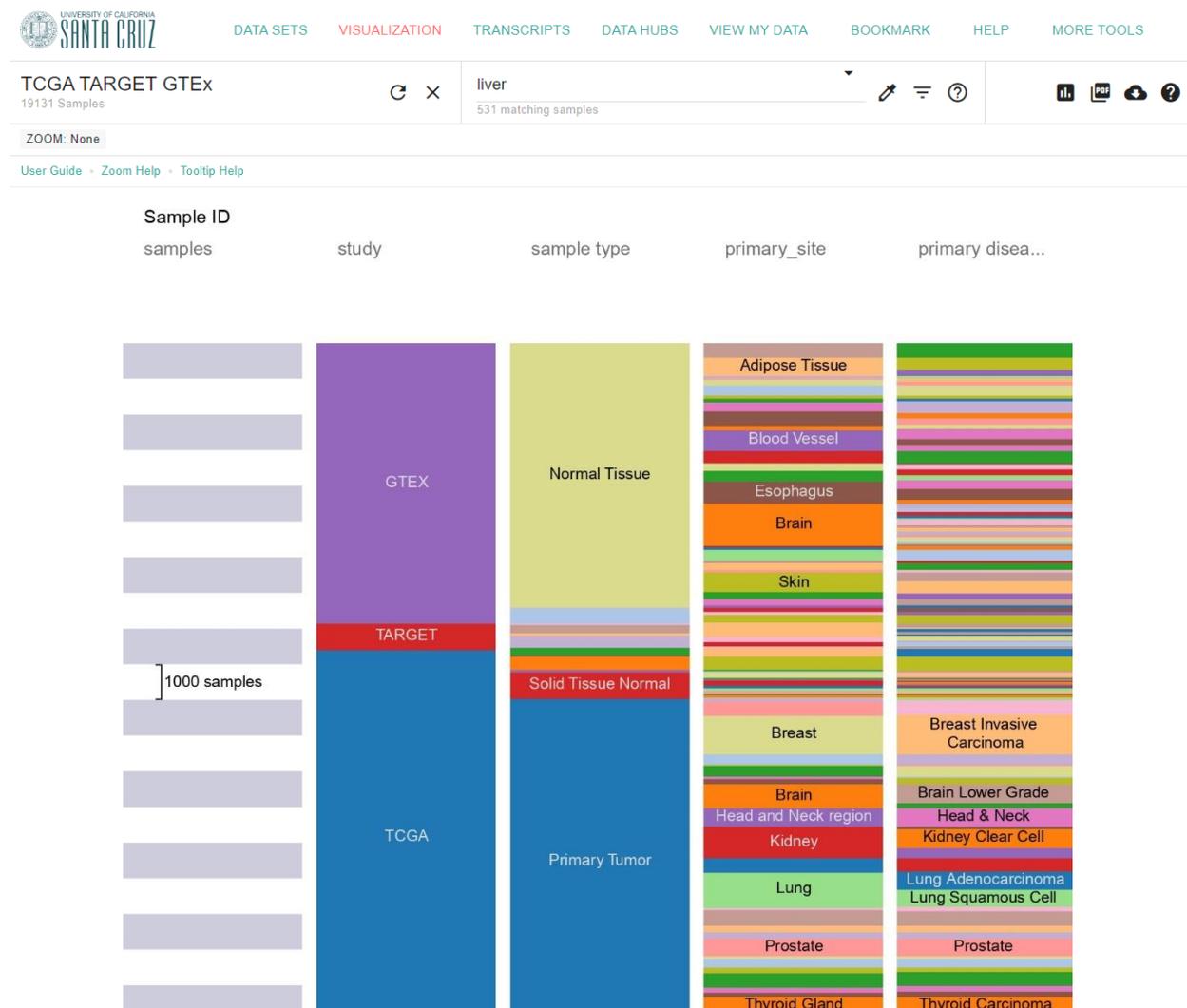
B



Anexo A. Expresión del gen IL-15 en células VPH + y VPH - de CC y su correlación con el tipo viral de VPH16 y VPH18. La expresión en tejidos tumorales de CC (TCGA) se descargaron de la herramienta de navegación UCSC Xena. Los números entre paréntesis se refieren al número de muestras incluidas en cada análisis. Los valores de significancia obtenidos después de un análisis de Mann Whitney no paramétrico se indican como * (p <0.05), ** (p <0.01) y *** (p <0.001), ns no significativo.

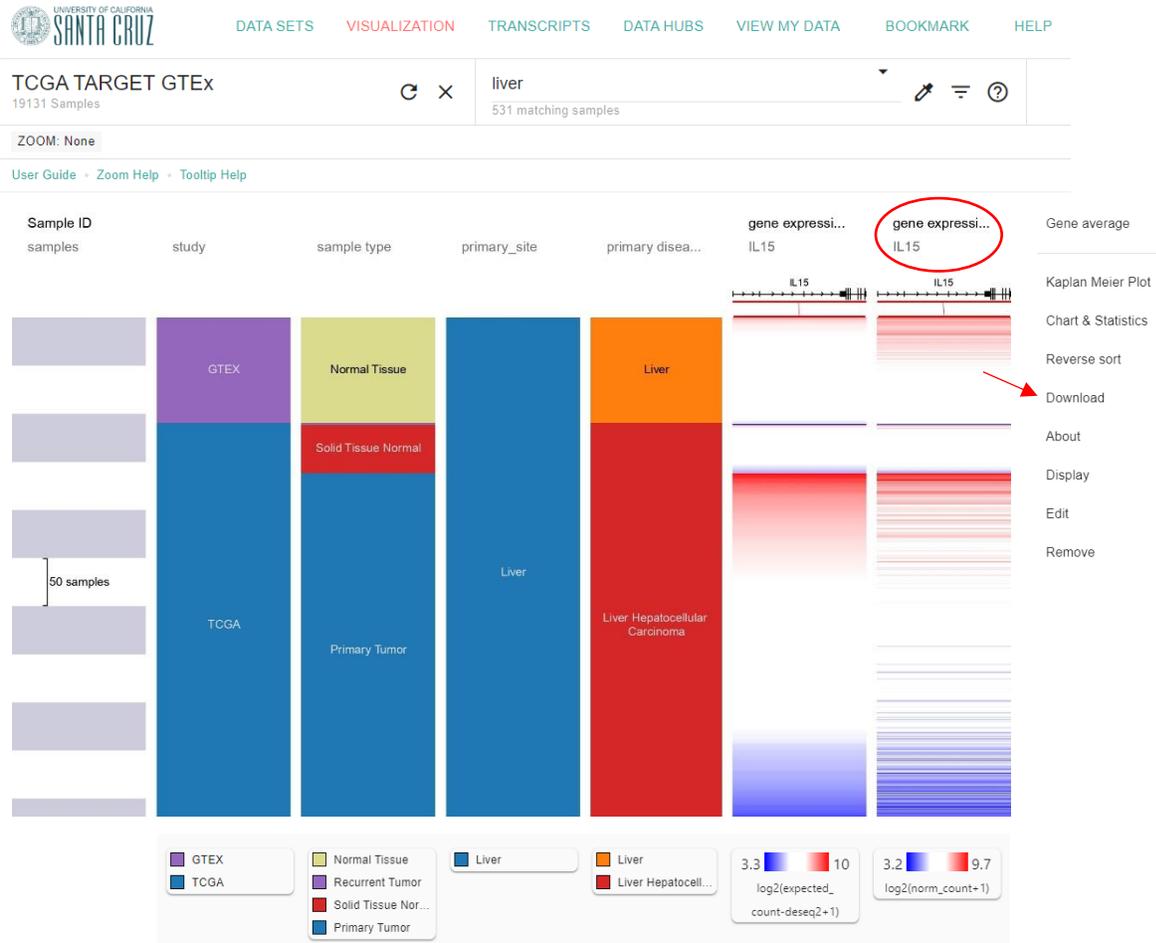
B) Plataforma Xena

Los datos de secuenciación de ARN (RNA-Seq) de muestras normales de la base de datos del proyecto Genotype Tissue Expression (GTEx; <https://gtexportal.org/home/>) y datos de muestras Tumorales de The Cancer Genome Atlas (TCGA; <https://portal.gdc.cancer.gov>), se procesaron y obtuvieron utilizando la plataforma Xena (<http://xena.ucsc.edu>), alojada por el Laboratorio de Genómica Computacional de la Universidad de California Santa Cruz (UCSC; <https://cglgenomics.ucsc.edu>).



Anexo B. TCGA incluye muestras tumorales, estas muestras de “tejido solido normal” se derivan de tejidos normales localizados proximales a tumores. En consecuencia, se puede poseer perfiles transcriptómicos tumorales en estas muestras “normales”. Por el contrario, las muestras del proyecto GTEx proporcionan datos de expresión del tejido normal de individuos sanos sin cáncer.

C) Adquisición de datos y comparación de la expresión de ARN de tejidos tumorales y normales a partir de la plataforma Xena



Anexo C. Los conjunto de datos por proyecto no se pueden comparar directamente, por tanto, los datos de GTEx y TCGA fueron realineados por Xena Toil aplicando la normalización RESEM y extraídos en Microsoft Excel para su organización.

D) Organización de datos TumORAles (TCGA) vs Normales (GTEX) extraídos de la Plataforma Xena.

	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH
	sample	patient	OS	OS time	Gene expression (Rawseq - RSEM expected_count (DESeq2 standardized)) IL15	data			Tejido Normal	ENSG00000164136.16		Tumor Primario	ENSG00000164136.16
1													
2	TCGA-2Y-A9G3-0TCGA-2Y-A9G3-0		1	724	high	7.826			GTEX-11UD2-1626-SM-SEQM3	8.731		TCGA-DD-AIEC-01	9.863
3	TCGA-2Y-A9G7-0TCGA-2Y-A9G7-0		1	1624	high	8.893			GTEX-1192X-1026-SM-SH1P	8.364		TCGA-DD-A3A6-01	9.33
4	TCGA-2Y-A9GV-0TCGA-2Y-A9GV-0		1	2532	high	8.454			GTEX-1222Z-1326-SM-S9HKV	8.251		TCGA-CC-A1H7-01	9.722
5	TCGA-2Y-A9GW-0TCGA-2Y-A9GW-0		1	1271	high	7.008			GTEX-05VT-0626-SM-31V8N	7.554		TCGA-EP-A2KA-01	9.566
6	TCGA-2Y-A9GX-0TCGA-2Y-A9GX-0		0	2442	high	8.06			GTEX-2V13-1626-SM-SGLU6	7.841		TCGA-CC-A3FV-01	9.329
7	TCGA-2Y-A9GY-0TCGA-2Y-A9GY-0		1	757	high	8.096			GTEX-11N4-1326-SM-SHL5V	7.578		TCGA-ED-A3KG-01	9.749
8	TCGA-2Y-A9H0-0TCGA-2Y-A9H0-0		0	3675	high	9.451			GTEX-123AP-0426-SM-SFH8	7.535		TCGA-2V-A855-01	9.353
9	TCGA-2Y-A9H2-0TCGA-2Y-A9H2-0		0	1731	high	7.46			GTEX-1391U-0626-SM-SJFC	7.767		TCGA-G3-A25X-01	9.77
10	TCGA-2Y-A9H3-0TCGA-2Y-A9H3-0		0	1536	high	6.976			GTEX-2Y13-0626-SM-SNG2W	7.682		TCGA-LE-A7MF-01	9.102
11	TCGA-2Y-A9H4-0TCGA-2Y-A9H4-0		0	1452	high	8.373			GTEX-16MN-1226-SM-SNMA5	7.619		TCGA-DD-A4NA-01	9.501
12	TCGA-2Y-A9H6-0TCGA-2Y-A9H6-0		0	357	high	6.339			GTEX-13QJC-0726-SM-SRQJK	8		TCGA-BC-A8YD-01	8.781
13	TCGA-2Y-A9H9-0TCGA-2Y-A9H9-0		0	697	high	7.843			GTEX-13OVJ-1026-SM-SFGL	7.561		TCGA-QA-A7B7-01	8.757
14	TCGA-2Y-A9HA-0TCGA-2Y-A9HA-0		1	36	high	6.911			GTEX-12W9I-0226-SM-SGCNA	7.738		TCGA-FV-A3D0-01	9.275
15	TCGA-SC-AAPD-0TCGA-SC-AAPD-0		0	20	high	6.819			GTEX-1475I-1626-SM-SNG9L	7.876		TCGA-CC-A7LJ-01	8.637
16	TCGA-SR-AAID-0TCGA-SR-AAID-0		0	449	high	6.864			GTEX-131XE-0326-SM-SLZVO	7.62		TCGA-BC-A10Y-01	8.416
17	TCGA-SR-AAAM-0TCGA-SR-AAAM-0		1	46	high	7.358			GTEX-2VPE2-0626-SM-SM5SO	7.64		TCGA-2Y-A9H4-01	8.973
18	TCGA-BC-4072-0TCGA-BC-4072-0		1	1490	high	8.014			GTEX-13FLV-0326-SM-SN8DQ	7.46		TCGA-CC-A3M9-01	8.84
19	TCGA-BC-4073-0TCGA-BC-4073-0		0	849	high	7.38			GTEX-VECK-1926-SM-4V2IH	7.413		TCGA-GJ-A3DU-01	8.868
20	TCGA-BC-A10Q-0TCGA-BC-A10Q-0		1	1135	high	7.643			GTEX-XBEC-1926-SM-4A168	7.451		TCGA-DD-A3A1-01	7.683
21	TCGA-BC-A10T-0TCGA-BC-A10T-0		1	837	high	7.81			GTEX-U8X-1626-SM-4E3HT	7.685		TCGA-DD-AAEE-01	8.45
22	TCGA-BC-A10U-0TCGA-BC-A10U-0		1	837	high	8.211			GTEX-ZAB4-0626-SM-SLUS0	7.398		TCGA-CC-A8HT-01	9.057
23	TCGA-BC-A10V-0TCGA-BC-A10V-0		1	711	high	8.416			GTEX-1497J-0726-SM-SQ5D1	7.689		TCGA-DD-A8CH-01	8.964
24	TCGA-BC-A110-0TCGA-BC-A110-0		1	2116	high	7.614			GTEX-13PVQ-1526-SM-SFEEQ	7.393		TCGA-YA-A857-01	8.135
25	TCGA-BC-A216-0TCGA-BC-A216-0		0	1351	high	7.726			GTEX-13SLX-1226-SM-S52D6	7.643		TCGA-DD-A8E4-01	7.924

Anexo D. Los datos de tejidos tumorales (TCGA) y tejidos normales (GTEX) extraídos a partir de la plataforma Xena, se agruparon para poder comparar los niveles de expresión de IL-15 y las subunidades que conforman a su receptor IL-15R. Así mismo se compararon los niveles bajos/altos de expresión de IL-15 e IL-15R en tejidos tumorales con respecto a la supervivencia.