



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER

LABORATORIO DE ONCOLOGÍA CELULAR

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE
IL-2, IL-15 Y SUS RECEPTORES IL-2R E
IL-15R EN CÉLULAS DE CARCINOMA
HEPATOCELULAR**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

BIÓLOGO

PRESENTA:

SALOME RAYADAN REYES MERCADO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LEONARDO TRUJILLO CIRILO



IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO

MAYO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 L-4 PB de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer en 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 y el Dr. Benny Weiss Steider.

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



“Adelante, siempre adelante... (me gusta esta frase, y si yo tuviera escudo no le pondría otra divisa)”

– Benito Pérez Galdós –

DEDICATORIA

A mi abuelo José Luis Mercado Cuarenta, por haber sido el pilar de mi hogar, por todo el cariño y protección, y porque aún tras tu partida seguiste contribuyendo en que este sueño fuera posible.

A mi madre Eloisa Mercado Vázquez por los valores inculcados y todas aquellas veces que me llevaste la comida hasta el escritorio mientras pasaba el tiempo frente a la computadora haciendo este trabajo. A mi padre José Reyes Manuel por estar dispuesto siempre a ofrecerme todo a cambio de nada. A mi padre Raúl Chávez Cervantes por el cariño fraternal que siempre me has dado y por la familia que contigo he conseguido.

A mis tíos Ramón Mercado, Olivia Mercado, Mario Quiroz, y Ricardo Mercado; por su apoyo durante mi formación. A mis primos Cinthya, Abish y Job por ser como mis hermanos mayores y haber sido un ejemplo para mí.

A mi hermana cósmica Erandhi por caminar juntos en esta aventura por cumplir nuestros sueños. A mis amigas Dana, Rosi, Tania, Naye y Cinti por ser mi círculo de apoyo y haberme alentado a concluir este proyecto.

A todos quienes han confiado en mí, porque hoy me siento orgulloso de hasta donde he logrado llegar gracias a su apoyo y hoy este logro es de todos.

“Cancer is a wound that does not heal”
[“El cáncer es una herida que no cicatriza”]

*Harold F. Dvorak (1986)

*Dvorak, H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal: Similarities between Tumor Stroma Generation and Wound Healing. *N. Engl. J. Med.* 315, 1650–1659.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, porque en sus aulas adquirí tantos conocimientos y experiencias, conocí grandes profesores y forme amistades que llevo en mi corazón. Por seguir la noble convicción de ser la Universidad de la Nación y llevar al pueblo a la Universidad y la Universidad al pueblo.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza que a través de quienes forman parte de la Licenciatura en Biología me permitieron desarrollarme profesionalmente.

A Fundación UNAM y a Fundación Telmex-Telcel por las becas proporcionadas a lo largo de mis estudios de bachillerato y licenciatura.

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

A la Dra. Rosalva Rangel Corona, titular del Laboratorio de Oncología Celular, por aceptarme como parte de su laboratorio y la confianza en mi trabajo.

Al Dr. Benny Weiss, al Dr. Alberto Monroy y a la Dra. María de Lourdes Mora, miembros de la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer, quienes formaron parte de mi sínodo y aportaron su revisión y sus observaciones para la mejora de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Adriana, Gloria, Victor, Ingrid y Tona por el apoyo que me brindaron durante mi estadía en el laboratorio.

A la Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt y el Dr. Renato León del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por el apoyo en proporcionarme células HepG2 para la conclusión de los experimentos.

Al pueblo mexicano que con sus contribuciones fiscales hacen posible el subsidio de la educación universitaria pública y gratuita.

ÍNDICE

RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. MARCO TEÓRICO	11
2.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR	11
2.2 EL PROCESO INFLAMATORIO CRÓNICO EN EL DESARROLLO DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR	12
2.3 CITOCINAS EN EL DESARROLLO DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR	12
2.4 PAPEL DE LAS CITOCINAS PROINFLAMATORIAS IL-2 E IL-15 EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL	13
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
6. METODOLOGÍA	21
6.1 CULTIVO CELULAR.....	21
6.2 OBTENCIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA	21
6.3 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.....	21
6.4 AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR DE LOS TRANSCRITOS DE IL-2, IL-15, IL-2R α , IL-2/IL-15R β , γ_c E IL-15R α	22
6.5 EVALUACIÓN POR ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN.....	23
6.6 ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LAS DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE IL-2, IL-15, IL-2R α , IL-2/IL-15R β , γ_c E IL-15R α ENTRE TUMORES DE CARCINOMA HEPATOCELULAR Y MUESTRAS DE HÍGADO SANO	23
6.7 ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LA SOBREVIVENCIA A CARCINOMA HEPATOCELULAR RELACIONADA A LA EXPRESIÓN DE IL-2, IL-15, IL-2R α , IL-2/IL-15R β , γ_c E IL-15R α	24
6.8 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN A NIVEL DE PROTEÍNA POR CITOMETRÍA DE FLUJO	24
7. RESULTADOS	25
7.1 EXTRACCIÓN DE ARN INTEGRO DE LSPH Y CÉLULAS HEPG2.....	25
7.2 EXPRESIÓN DE IL-2, IL-15 Y LAS SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES IL-2R E IL-15R EN LSPH COMO CONTROL POSITIVO	25
7.3 EXPRESIÓN DE IL-15, PERO NO DE IL-2, EN LAS CÉLULAS HEPG2	26
7.4 EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES α Y γ_c DEL IL-2R EN LAS CÉLULAS HEPG2	27
7.5 EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES α Y γ_c DEL IL-15R EN LAS CÉLULAS HEPG2	28
7.6 EXPRESIÓN REDUCIDA DE LA SUBUNIDAD IL-2/IL-15R β EN LAS CÉLULAS HEPG2	29

7.7 DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE HÍGADO SANO Y CARCINOMA HEPATOCELULAR	30
7.8 ALTA EXPRESIÓN DE IL-15R α AFECTA SIGNIFICATIVAMENTE LA SOBREVIVENCIA AL CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	32
7.9 PRESENCIA DE IL-15R α EN LA MEMBRANA CELULAR DE LAS CÉLULAS HEPG2	34
8. DISCUSIÓN	35
9. CONCLUSIONES	41
10. PERSPECTIVAS.....	42
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

RESUMEN

El carcinoma hepatocelular (CHC) está estrechamente asociado a un proceso de inflamación crónica en donde las citocinas del microambiente tumoral ejercen un papel determinante para su desarrollo y progresión. La interleucina 2 (IL-2) y la interleucina 15 (IL-15) son citocinas proinflamatorias que median la respuesta inmune antitumoral y tienen en común algunas funciones del sistema inmune ya que comparten dos de las subunidades de sus receptores IL-2R e IL-15R. No obstante, varios estudios en diversos tipos de cáncer han demostrado que las células tumorales expresan IL-2, IL-15 y sus receptores, postulando que estas citocinas pueden promover el desarrollo tumoral.

Para el caso de CHC aún no se ha determinado la expresión de IL-2, IL-15 y sus receptores por parte de las células tumorales, asimismo se requiere esclarecer la participación de dichas citocinas en esta enfermedad. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de IL-2, IL-15 y las subunidades α , β y γ de sus receptores en la línea celular HepG2 de CHC mediante la técnica de RT-PCR. Así mismo, se realizó un análisis de RNA-seq de biopsias de hígado sano y de CHC provenientes de las bases de datos TCGA y GTEx con el fin de determinar diferencias en la expresión génica de estas citocinas y sus receptores, y a su vez evaluar el impacto en la sobrevivencia al CHC.

Los resultados de este estudio demuestran que la línea celular HepG2 expresa de manera basal la IL-15 y las subunidades α , β y γ del IL-15R. Contrariamente no se detecta la expresión de IL-2 en las células HepG2, aunque sí es posible observar la expresión basal de las subunidades α , β y γ del IL-2R. Por otro lado, el análisis de RNA-seq revela una significativa sobreexpresión de la subunidad α del IL-15R en tumores de CHC en comparación con hígado sano y dicha sobreexpresión está asociada significativamente a una menor sobrevivencia.

Con base en estos resultados se puede concluir que la IL-15 tiene un papel relevante por encima de la IL-2 en el CHC, ya que IL-15 presenta una expresión basal mientras que IL-2 no se expresa en las células HepG2. Aun cuando las células HepG2 no expresan IL-2, estas células podrían responder funcionalmente a la estimulación paracrina o exógena de esta citocina ya que expresan las subunidades del IL-2R. Para el caso de IL-15 se podría considerar que esta citocina actúe no solo de manera paracrina sino que también podría actuar de manera autocrina o yuxtacrina en las células HepG2 dado que expresan la subunidad α del IL-15R. Además, la presencia de la subunidad IL-15R α pudiera ejercer un papel relevante en la progresión y malignidad del CHC, ya que presenta una sobreexpresión significativa en los tumores de CHC y está asociada a una menor sobrevivencia al CHC. Ante esto se requieren más estudios para confirmar la importancia y establecer los mecanismos de acción de estas citocinas en el CHC.

1. INTRODUCCIÓN

El carcinoma hepatocelular (CHC) es una de las neoplasias malignas más frecuentes en el mundo y es uno de los tumores más agresivos debido a su alta tasa de metástasis y reincidencia. El desarrollo del CHC está estrechamente relacionado a un proceso inflamatorio crónico causado por lesiones recurrentes en el hígado. Durante la inflamación crónica del hígado se genera un desequilibrio entre el perfil de citocinas proinflamatorias Th1 y antiinflamatorias Th2, lo que conduce a la evasión de la respuesta inmune y promueve el desarrollo tumoral.

Entre las citocinas proinflamatorias Th1, la interleucina 2 (IL-2) e interleucina 15 (IL-15) son citocinas fundamentales para una correcta respuesta inmune y comparten varias funciones en común como son la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos T; promueven la síntesis de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B; y estimulan la generación y proliferación de las células NK; pero a su vez tienen acciones opuestas que compiten en la modulación de la respuesta inmune. Las diferentes actividades fisiológicas de la IL-2 y la IL-15 dependen de la unión a sus respectivos receptores IL-2R e IL-15R, los cuales están conformados por tres subunidades: α , β y γ . La subunidad α proporciona la especificidad correspondiente a cada receptor, mientras que las subunidades β y γ son comunes para ambos receptores, de ahí que tengan algunas funciones en común.

De manera normal IL-2, IL-15 y sus receptores IL-2R e IL-15R se expresan en diversas células hematopoyéticas, por lo que han presentado un potencial en la inmunoterapia contra el cáncer. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias estas citocinas y sus receptores pueden promover la carcinogénesis y se ha reportado que en algunos tipos de cáncer su expresión contribuye al desarrollo y progresión tumoral. Por consiguiente, la IL-2 e IL-15 pueden modular la eliminación o promoción de las células tumorales dependiendo el tipo de tumor, estadio del tumor y contexto celular.

Aunque se han realizado estudios sobre IL-2 e IL-15 en el CHC, únicamente se ha evaluado su presencia en suero de pacientes y en células no tumorales del microambiente, por lo que en la actualidad se desconocen las posibles funciones de la expresión de IL-2, IL-15 y sus receptores en las células de CHC. Por tanto, en este trabajo se analizó la expresión de IL-2, IL-15 y sus receptores IL-2R e IL-15R en la línea celular HepG2 de CHC mediante la técnica de RT-PCR. Así mismo, se realizó un análisis de datos de secuenciación de ARN de biopsias de CHC e hígado sano obtenidos a través de la plataforma bioinformática UCSC Xena para comparar la expresión de estas citocinas y sus receptores, además de evaluar el impacto de su expresión en la sobrevivencia al CHC. Para lo cual se aplicó una prueba *t* de Welch para identificar diferencias significativas en los valores de expresión y se realizó las gráficas de sobrevivencia por el método de Kaplan-Meier.

El estudio de la expresión de IL-2 e IL-15, así como de sus receptores IL-2R e IL-15R, en las células HepG2 de CHC permitirá esclarecer la participación de estas citocinas en la modulación del microambiente tumoral y la progresión tumoral del CHC. Por su parte el análisis de datos de secuenciación de ARN en tumores de CHC nos permitirá identificar aquellos genes que se encuentran sobreexpresados y que impactan de manera significativa en la sobrevivencia al CHC, siendo así posible establecer su potencial uso como biomarcadores en la hepatocarcinogénesis.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 CARCINOMA HEPATOCELULAR

El carcinoma hepatocelular (CHC) o hepatocarcinoma es una neoplasia maligna primaria en el hígado producto de la proliferación descontrolada de los hepatocitos alterando las funciones del órgano. A nivel mundial, el CHC es el sexto tipo de cáncer más frecuente entre hombres y mujeres, y además es uno de los tumores más agresivos ya que representa el tercer tipo de cáncer con mayor índice de mortalidad, afectando así a más de 1.6 millones de personas al año (GLOBOCAN, 2018). Los principales factores que contribuyen al desarrollo de CHC son las infecciones crónicas del virus de hepatitis B (VHB) o del virus de hepatitis C (VHC), cirrosis, enfermedades de hígado graso y el consumo excesivo de alcohol. Así mismo, el tabaquismo, obesidad, diabetes, altas reservas de hierro, exposición a aflatoxinas en alimentos y niveles elevados de hormonas androgénicas se encuentran como factores de riesgo asociados al CHC (González-Aguirre et al., 2013; Uribe-Esquivel et al., 2010).

Estos factores generan lesiones recurrentes en el hígado que desencadenan una inflamación crónica. A su vez, las lesiones en el hígado inducen una proliferación compensatoria de los hepatocitos para restaurar la función hepática, sin embargo, una excesiva proliferación compensatoria puede generar cambios patológicos en el hígado y la transformación maligna de los hepatocitos (Sun y Karin, 2013). Es entonces que la hepatocarcinogénesis se desarrolla bajo un contexto inflamatorio y de daño del ADN por estrés replicativo (Sun y Karin, 2013; Yu *et al.*, 2018) (Figura 1). Por esta razón se ha establecido que la inflamación crónica es un factor relevante para el desarrollo del CHC (De Visser *et al.*, 2006; Greten y Grivennikov, 2019), de hecho, el estado inflamatorio se ha determinado como una de las características distintivas del cáncer (Cavallo *et al.*, 2011; Colotta *et al.*, 2009; Hanahan & Weinberg, 2011).

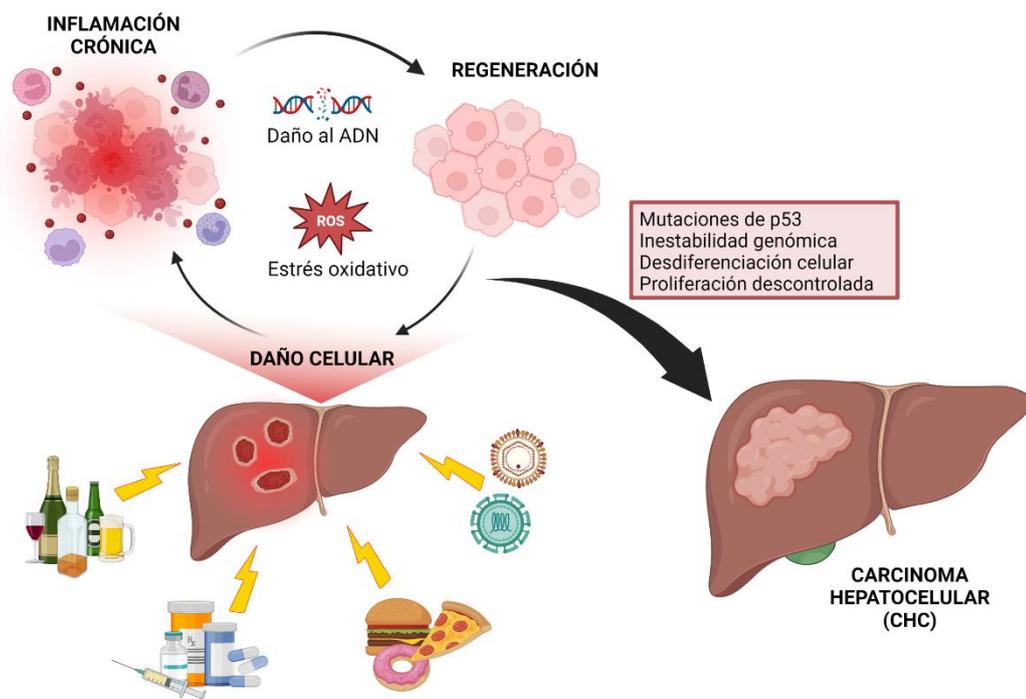


Figura 1. Proceso de hepatocarcinogénesis relacionado a una inflamación crónica. El hígado sufre daños por factores como infección por VHB o VHC, ingesta de alcohol, dieta alta en grasas y consumo de drogas esteroideas. Ante estos daños se desencadena un proceso inflamatorio a la vez que los hepatocitos proliferan para regenerar el tejido dañado. Durante esta proliferación se genera un estrés oxidativo y se producen daños en el ADN que conducen a inestabilidad genómica y pérdida del control de proliferación ocasionando en última instancia la transformación maligna de los hepatocitos y el desarrollo del CHC (Imagen creada con BioRender.com)

2.2 EL PROCESO INFLAMATORIO CRÓNICO EN EL DESARROLLO DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR

La relación entre la inflamación crónica y el cáncer esta mediada por las interacciones que hay entre células mesenquimales y no mesenquimales del microambiente tumoral, por la activación e interconexión de vías de señalización celular, y por la secreción de citocinas (Sun y Karin, 2013). Las interacciones celulares en el microambiente tumoral tienen una función crítica en la transformación maligna, el desarrollo tumoral, la metástasis y la evasión de la respuesta inmune (Whiteside, 2008). Las interacciones celulares en el microambiente tumoral son muy complejas debido a la presencia no sólo de células tumorales sino también de células no tumorales como fibroblastos, células endoteliales y células inmunológicas infiltrantes. Entre las células inmunológicas infiltrantes en el tumor se encuentran neutrófilos, macrófagos asociados a tumores (MAT), células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), células natural killer (NK), linfocitos T citotóxicos (LTc CD8+), linfocitos T cooperadores (LTh CD4+) y linfocitos T reguladores (LTreg) (Whiteside, 2008; Sachdeva *et al.*, 2015).

Las células inmunológicas presentes en el microambiente tumoral, junto con la secreción de moléculas inmunomoduladoras, como las quimiocinas y citocinas, polarizan la respuesta inmune del huésped hacia un fenotipo antitumoral o de tolerancia tumoral (Whiteside, 2008). La tolerancia tumoral es un estado de inmunosupresión que puede derivarse de factores como la disminución del reconocimiento antigénico de células malignas, la expresión de receptores inhibidores o sus ligandos, la inflamación crónica inducida por una infección viral o una desregulación inmunológica, y cambios en el número y función de las células inmunológicas debido a un desbalance en las citocinas (Greten y Grivennikov, 2019; Schreiber *et al.*, 2011). De ese modo, alteraciones en la función inmune generan un ambiente de tolerancia tumoral que favorece la iniciación y progresión tumoral (Sachdeva *et al.*, 2015), en especial la del CHC (Aravalli, 2013). Es por esto que el tipo y la extensión de la respuesta inmune en el microambiente tumoral puede estar fundamentalmente regulado por el equilibrio de citocinas que se ve afectado durante la inflamación crónica (Sun y Karin, 2013).

2.3 CITOCINAS EN EL DESARROLLO DEL CARCINOMA HEPATOCELULAR

Las citocinas son moléculas proteicas de señalización celular con bajo peso molecular que son secretadas por varios tipos de células inmunológicas y que participan ampliamente en la comunicación intercelular durante la respuesta inmune (Abbas *et al.*, 2015). Las citocinas pueden clasificarse de manera general en proinflamatorias y antiinflamatorias, aunque muchas citocinas tienen funciones pleiotrópicas y algunas pueden actuar de manera sinérgica. Las citocinas, en particular las que son producidas por los LTh CD4+, en su mayoría son interleucinas (IL) y se pueden clasificar como citocinas proinflamatorias de tipo Th1 o como citocinas antiinflamatorias de tipo Th2 (Budhu y Wang, 2006).

Los hepatocitos pueden ser susceptibles a la acción de varias citocinas debido a la expresión de los receptores correspondientes. Algunas citocinas están involucradas en el desarrollo, regeneración y funcionamiento normal del hígado, sin embargo, algunas citocinas también pueden estar involucradas en la patogénesis del CHC (Sachdeva *et al.*, 2015). Se ha reportado que las citocinas pueden actuar como factores de crecimiento y sobrevivencia de células premalignas, además de estimular la angiogénesis y la metástasis (Sun y Karin, 2013). Se han reportado diferentes perfiles de citocinas característicos en pacientes con CHC y otras enfermedades crónicas del hígado, que pueden asociarse a los diferentes estadios de la enfermedad, a la respuesta a tratamientos o al pronóstico del paciente (Budhu y Wang, 2006).

En pacientes con CHC, se ha descrito un predominante aumento de citocinas antiinflamatorias de tipo Th2, entre las que se incluye: IL-4, IL-8, IL-10 e IL-5. Por su parte, las citocinas proinflamatorias de tipo Th1, como son: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-12p35, IL-12p40, IL-15, TNF- α e IFN- γ ; se encuentran drásticamente disminuidas. Este desequilibrio en el perfil de citocinas proinflamatorias de tipo Th1 y antiinflamatorias de tipo Th2 está asociado a la progresión metastásica del CHC (Budhu y Wang, 2006; Sachdeva *et al.*, 2015). Se ha identificado que al verse disminuido el perfil de citocinas proinflamatorias de tipo Th1 hay mayor probabilidad de una recaída tumoral en pacientes con CHC (Budhu *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2008). Se ha establecido entonces que en el CHC las citocinas proinflamatorias de tipo Th1 se encuentran involucradas primordialmente en impedir la iniciación y el establecimiento del tumor, mientras que las citocinas antiinflamatorias de tipo Th2 tienen un papel predominante en favorecer la progresión tumoral y metástasis (Budhu y Wang, 2006; Sachdeva *et al.*, 2015). La polarización hacia un aumento en el perfil de citocinas Th2 y la disminución del perfil de citocinas Th1 puede ser ocasionada por factores producidos en el microambiente tumoral o por el propio tumor (Sachdeva *et al.*, 2015).

Diferentes citocinas no clasificadas dentro de las de tipo Th1 o Th2 pueden contribuir también a la patogénesis de CHC. La IL-6 es una de las citocinas pleiotrópicas más estudiadas en el proceso inflamatorio en el hígado, ya que actúa como un factor relevante en el desarrollo de CHC. Así mismo, El TGF- β y las citocinas producidas por células Th17 y Th22 también están involucradas en la patogénesis del CHC (Budhu y Wang, 2006; Sun & Karin, 2013; Sachdeva *et al.*, 2015).

Dentro de las citocinas proinflamatorias de tipo Th1 se encuentran IL-2 e IL-15, ambas citocinas se han asociado al desarrollo de diferentes tumores. Sin embargo, no ha sido ampliamente estudiada su presencia y participación en el CHC.

2.4 PAPEL DE LAS CITOCINAS PROINFLAMATORIAS IL-2 E IL-15 EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

La interleucina 2 (IL-2) es una citocina proinflamatoria perteneciente a la familia de citocinas cuatro α -hélices, que tiene importantes actividades moduladoras del sistema inmune. La IL-2 es requerida para la función normal de los linfocitos y participa fundamentalmente en la activación, diferenciación y proliferación de varios linajes de células hematopoyéticas (Waldmann, 2006; Waldmann, 2015). La IL-2 es producida principalmente por los LTh CD4+ activados y actúa como un factor de crecimiento y diferenciación de los precursores de LTc CD8+, así como en su proliferación una vez maduros (Waldmann, 2015).

Las funciones biológicas de IL-2 son efectuadas a través de la unión con su receptor específico IL-2R. El IL-2R se expresa en todas las clases de células linfoides, en especial en células B, células T y células NK; así como células no linfoides, como monocitos y granulocitos tempranos y maduros (Waldmann, 2006; Waldmann, 2015). El IL-2R está conformado por tres subunidades distintas (α , β y γ) que se asocian de forma no covalente en la superficie celular para conformar un complejo receptor de alta afinidad funcional a IL-2 (Wang *et al.*, 2005). De forma independiente la subunidad α del IL-2R (IL-2R α / CD25) es un receptor de baja afinidad, mientras que la subunidad β (CD122) y la subunidad γ común (γ_c / CD132) se asocian para conformar un receptor de afinidad intermedia (Figura 2a). La transducción de señales tras la interacción con IL-2 está mediada únicamente por las subunidades β y γ_c , ya que IL-2R α carece de un dominio citoplasmático (Wang *et al.*, 2005).

Otra de las citocinas proinflamatorias perteneciente también a la familia de citocinas cuatro α -hélices es la interleucina 15 (IL-15). La IL-15 es una citocina pleiotrópica, inicialmente caracterizada como un factor de crecimiento de células T (Burton et al., 1994; Giri et al., 1995; Grabstein et al., 1994), que vincula *in vivo* la respuesta inmune innata y adaptativa (Waldmann, 2014). La IL-15 es producida constitutivamente por diferentes tipos de células como monocitos, macrófagos, células dendríticas, células estromales, células epiteliales y células musculares (Fehniger & Caligiuri, 2001). No obstante, a diferencia de IL-2 que es secretada en cantidades relativamente altas, IL-15 es secretada en cantidades menores (Waldmann, 2015).

La IL-15 estimula la proliferación de LTc CD8+ (Grabstein et al., 1994), e induce la proliferación y diferenciación de células B preactivadas (Armitage et al., 1995). Así mismo, induce la activación de neutrófilos (Girard et al., 1996; Rathé & Girard, 2004), regula la sobrevivencia y maduración de las células NK (Becknell & Caligiuri, 2005; Carson et al., 1997; Fehniger & Caligiuri, 2001) y actúa como un quimioatrayente para los linfocitos T (Jonuleit et al., 1997; Wilkinson & Liew, 1995).

Aunque IL-2 e IL-15 no tienen similitud en su secuencia genética, las estructuras tridimensionales de estas citocinas exhiben una modelación muy similar. Coincidentemente también el receptor para la IL-15 (IL-15R) es un complejo de tres subunidades, de las cuales comparte con el IL-2R la subunidad β (IL-2/IL-15R β) y la subunidad γ_c (Giri et al., 1994; Grabstein et al., 1994); y al igual que en el complejo receptor IL-2R, la especificidad del IL-15R hacia la IL-15 se encuentra en la subunidad α (IL-15R α /CD215)(Anderson et al., 1995; Giri et al., 1995).

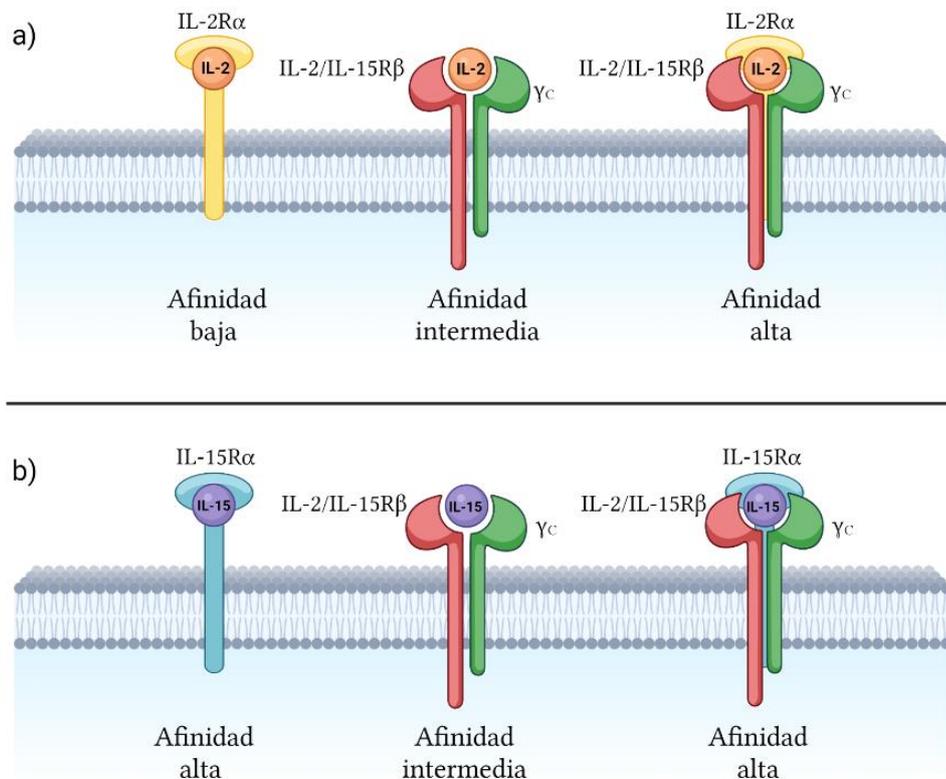


Figura 2. Representación esquemática de la conformación de los receptores IL-2R e IL-15R. Los receptores IL-2R e IL-15R son complejos triméricos integrados por una subunidad α específica para cada receptor y otras dos subunidades denominadas β y γ_c que son compartidas entre ambos receptores. a) En el IL-2R la subunidad IL-2R α por sí sola tiene baja afinidad, el heterodímero formado entre las subunidades IL-2/IL-15R β y γ_c tiene una afinidad intermedia, y el complejo trimérico tiene una afinidad alta. b) En el IL-15R el complejo trimérico representa igualmente un receptor de alta afinidad y el heterodímero IL-2/IL-15R β γ_c presenta una afinidad intermedia, pero la subunidad IL-15R α tiene una afinidad alta (Imagen creada con BioRender.com)

De esta manera las subunidades IL-15R α , IL-2/IL-15R β y γ_c forman un receptor trimérico de alta afinidad a través del cual IL-15 ejerce su señalización celular. Además, de manera semejante a la IL-2, la IL-15 también funciona al unirse con una afinidad intermedia al heterodímero formado por las subunidades IL-2/IL-15R β y γ_c (IL-2/IL-15R $\beta\gamma_c$) (Carson et al., 1994). Aunque, contrario a lo que sucede con IL-2R α , la subunidad IL-15R α es capaz de unirse a IL-15 con una alta afinidad sin requerir de las otras dos subunidades (Steel et al., 2012; Waldmann et al., 2020) (Figura 2b); además de que en contraste con IL-2R α , la subunidad IL-15R α es competente para llevar a cabo la transducción de señales por sí misma, por lo que le permite a las células responder a concentraciones bajas de IL-15 (Anderson et al., 1995; Pereno et al., 2000).

Debido a la alta afinidad entre IL-15 y la subunidad IL-15R α , esta citocina es comúnmente secretada como un complejo heterodimérico asociado a dicha subunidad, quedando así anclada en la membrana celular. Una vez en la membrana celular, el heterodímero IL-15/IL-15R α puede inducir señalización mediante el contacto célula-célula en una sinapsis inmunológica con aquellas células que presentan el heterodímero IL-2/IL-15R $\beta\gamma_c$ (Figura 3). En consecuencia, la coexpresión de IL-15 e IL-15R α asociados en la superficie externa de la membrana celular de monocitos y células dendríticas permite la presentación en forma trans de IL-15 a células NK y LTc CD8+ de memoria que expresan IL-2/IL-15R $\beta\gamma_c$ (Burkett et al., 2004; Huntington et al., 2009; Mortier et al., 2006; Stonier & Schluns, 2010; Waldmann et al., 2020). Así mismo, la presentación de forma trans del heterodímero IL-15/IL-15R α parece el principal mecanismo requerido para la diferenciación de los LTh CD4+, además de ser crucial para controlar la diferenciación de células Th17 proinflamatorias e inducir la generación de LTreg (Waickman et al., 2017). No obstante, la presentación en forma cis de IL-15 también puede actuar para la óptima activación de las células NK (Zanoni et al., 2013).

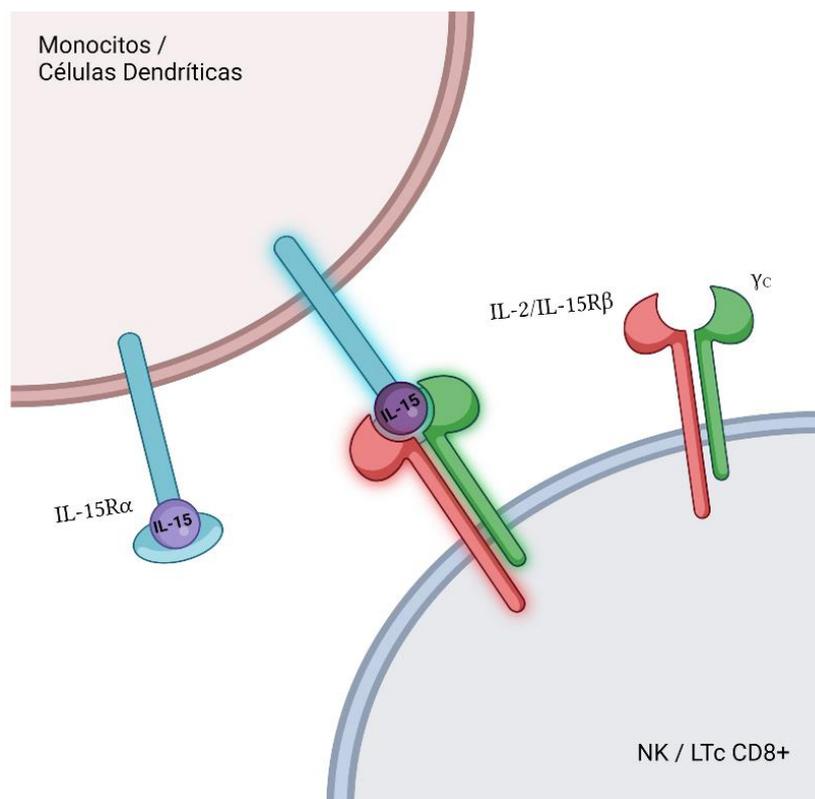


Figura 3. Mecanismo de la señalización de IL-15 por transpresentación. La IL-15 es secretada en forma de complejo a la subunidad IL-15R α , gracias a su alta afinidad, principalmente en monocitos y células dendríticas. Este complejo puede interactuar con el heterodímero formado por las subunidades IL-2/IL-15R β y γ_c expresadas principalmente por células NK y LTc CD8+ (Imagen creada con BioRender.com)

Dado que el IL-2R y el IL-15R tienen en común las subunidades β y γ_c , tanto la IL-2 como la IL-15 pueden unirse al heterodímero de IL-2/IL-15R $\beta\gamma_c$ e inducir la activación de la vía de señalización JAK1/3–STAT3/5. Al unirse la citocina al heterodímero IL-2/IL-15R $\beta\gamma_c$, la subunidad β activa a la proteína JAK1, mientras que la subunidad γ_c activa a la proteína JAK3, en consecuencia, JAK1 y JAK3 fosforilan tirosinas que inducen a su vez la fosforilación de STAT3 y STAT5A/B respectivamente. A través de las interacciones del dominio SH2, las moléculas STAT se homodimerizan y se translocan al núcleo donde actúan como factores de transcripción al unirse a las regiones reguladoras de los genes diana (Johnston *et al.*, 1995; Mishra *et al.*, 2014) (Figura 4). Debido a esto, IL-2 e IL-15 tienen algunas actividades biológicas en común como son facilitar el desarrollo de las células NK (Waldmann, 2015), e inducir la proliferación y diferenciación de linfocitos B activados (Armitage *et al.*, 1995). Así mismo, la IL-15 comparte varias propiedades estimulantes de las células T con la IL-2, incluida la capacidad de coestimular la proliferación de células T primarias e inducir la generación de LTc CD8+ y células asesinas activadas por linfocinas (LAK) (Grabstein *et al.*, 1994).

A pesar de las similitudes entre IL-2 e IL-15, cada citocina tiene funciones biológicas específicas. En el caso de IL-2, actúa como un factor de crecimiento celular durante el inicio de la respuesta inmune y participa en el mantenimiento de los LTreg, además de que juega un papel fundamental en la muerte celular inducida por activación, proceso por el cual se induce la apoptosis mediada por Fas en células T autorreactivas para prevenir la autoinmunidad y producir autotolerancia (Waldmann, 2015).

Por su parte, IL-15 es esencial en el desarrollo normal de células NK, ya que es un activador por excelencia de dichas células, además de regular su citotoxicidad. IL-15 también actúa como un factor antiapoptótico para la sobrevivencia de LTc CD8+ de memoria y proporcionar así una respuesta inmune a largo plazo contra patógenos (Waldmann, 2015).

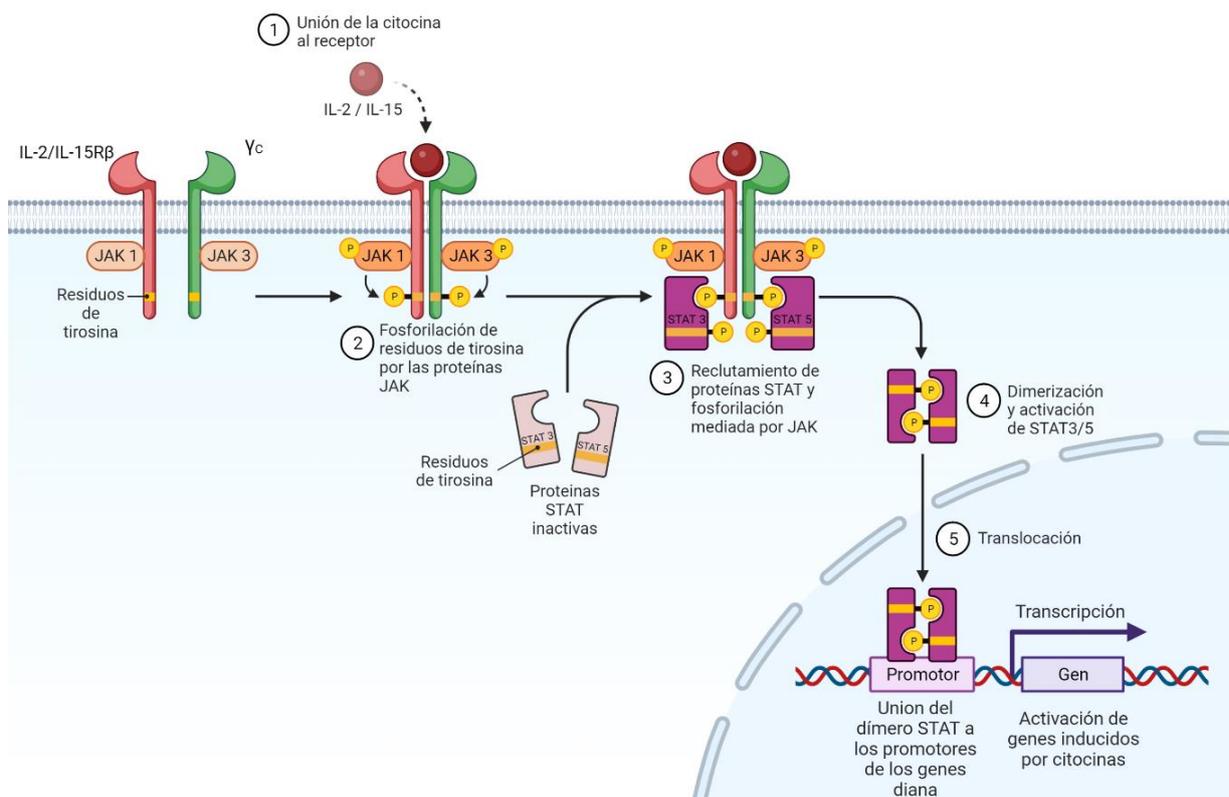


Figura 4. Activación de la vía JAK1/3 – STAT3/5 desencadenada por la unión de la IL-2 o IL-15 con el heterodímero formado por las subunidades IL-2/IL-15R β y γ_c (Imagen creada con BioRender.com)

Con todo esto, cabe resaltar que si bien tanto la IL-2 y la IL-15 en especial son importantes activadoras de la respuesta inmune innata mediada por células NK; durante la respuesta inmune adaptativa dichas citocinas tienen roles competitivos ya que mientras la IL-2 favorece la eliminación de linfocitos mediante la muerte celular inducida por activación necesaria para la tolerancia a los autoantígenos, por el contrario, IL-15 contribuye esencialmente a la generación de memoria inmunológica mediante la estimulación de la sobrevivencia de los linfocitos T de memoria. Incluso, se ha observado que una alta expresión de IL-15 conduce a la inhibición de la muerte celular inducida por activación desencadenada por IL-2 (Marks-Konczalik et al., 2000). Por lo tanto, es necesario un balance entre las concentraciones de IL-2 e IL-15 para poder llevar a cabo una respuesta inmune adaptativa adecuada.

Debido a las funciones inmunomoduladoras de IL-2 e IL-15, se ha propuesto que estas citocinas tienen un papel relevante en la carcinogénesis. IL-2 conduce a la producción de IFN- γ por las células T y estimula la actividad citotóxica de las células T asesinas naturales (NKT) y de las células LAK, las cuales ejercen una función antiviral y pueden matar una amplia gama de células tumorales (Fehniger et al., 2002; Waldmann, 2006). También se ha demostrado que IL-15, al igual que la IL-2 pero en mayor medida, aumenta la sensibilidad de las células cancerígenas a la citotoxicidad mediada por células NK (Jiang et al., 2014).

Las células NK de pacientes con CHC presentan una baja proliferación en respuesta a IL-2 e IL-15, aun cuando presentan una expresión de receptores similar a las células NK de pacientes sanos; sin embargo, la estimulación con IL-2 e IL-15 exógena promueve la actividad de células NK en contra de las células de CHC (Zhuang et al., 2019). Un estudio realizado en pacientes con CHC asociado a VHB demostró que la presencia de altos niveles de IL-2 e IL-15 en el tejido peritumoral está asociada a un menor índice de recurrencia y a una prolongada sobrevivencia después de la resección curativa (Zhou et al., 2010). Los niveles de IL-2 en pacientes con CHC igualmente han sido asociados a un pronóstico favorable ya que IL-2 podría estar activando y favoreciendo la infiltración al tumor de los linfocitos T CD8+ (Ikeguchi y Hirooka, 2005).

Gracias a sus diversas funciones antitumorales, IL-2 e IL-15 han sido propuestas como potenciales agentes en la inmunoterapia contra el cáncer (Fehniger et al., 2002; Jiang et al., 2014; Rautela y Huntington, 2017; Easom et al., 2018; Waldmann et al., 2020; Waldmann, 2015; Mantovani et al., 2020). El uso de IL-2 ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de cáncer renal y melanoma metastásicos (Fehniger et al., 2002; Waldmann, 2015), ya que se ha demostrado que los linfocitos infiltrantes de tumor expresan el IL-2R permitiéndoles activarse y proliferar en presencia de IL-2 dentro del microambiente tumoral (Trentin et al., 1994). No obstante, tanto la IL-2 como su receptor IL-2R pueden expresarse de manera anormal en células tumorales de distintos tipos de cáncer en los cuales se ha indicado que podrían estar utilizando la IL-2 como un mecanismo de proliferación y de evasión de la respuesta inmune (Yasumura et al., 1994; Reichert et al., 2000; García-Tuñón et al., 2003; Rocha-Zavaleta et al., 2004; Kasprzak et al., 2007; Rangel-Corona et al., 2010).

De igual forma, la expresión de IL-15 e IL-15R se ha reportado en diferentes tumores, en los que incluso se ha propuesto que tienen un papel importante en la progresión tumoral (Kuniyasu et al., 2003; He et al., 2004; Khawam et al., 2009; Santana Carrero et al., 2019; Barzegar et al., 1998; Tinhofer et al., 2000). Sin embargo, se desconoce si IL-2, IL-15 y sus receptores se expresan en las células tumorales de CHC, y el papel que podrían tener en el desarrollo de este tipo de tumor.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CHC representa un grave problema de salud pública debido a su incidencia, alta mortalidad y difícil tratamiento. A pesar de los avances en la terapia del CHC, el trasplante de hígado, la resección quirúrgica, la crioablación y la quimioterapia siguen siendo los únicos tratamientos que ofrecen un potencial curativo para esta enfermedad (González-Aguirre et al., 2013; Uribe-Esquivel et al., 2010). Desafortunadamente estos enfoques terapéuticos son efectivos solo para una minoría de pacientes con tumores pequeños y localizados (Forner *et al.*, 2018). Por ello, se requiere generar más información sobre la fisiología de este tipo de neoplasia para comprender los diferentes mecanismos que promueven el desarrollo tumoral.

Debido al papel relevante de la respuesta inflamatoria en el desarrollo y progresión del CHC, es necesario caracterizar y comprender los diversos componentes inmunológicos que actúan en el microambiente tumoral del CHC para poder así diseñar integralmente nuevas estrategias terapéuticas que combatan eficazmente esta enfermedad. Entre dichos componentes inmunológicos se encuentran las citocinas que actúan a través de receptores específicos, y de las que existe cada vez más evidencia de su participación en la hepatocarcinogénesis. Diversos estudios se han centrado en evaluar la presencia de citocinas y sus receptores en tumores de CHC para determinar su correlación con la progresión tumoral.

Las citocinas IL-2 e IL-15 son importantes reguladoras de la respuesta inmune y existe una amplia evidencia de su potencial como agentes en la inmunoterapia contra el cáncer; pero, por otra parte, se ha observado que dependiendo de las condiciones y tipo de tumor estas citocinas pueden ser expresadas por las células tumorales para favorecer la carcinogénesis.

No obstante, el papel de IL-2, IL-15 y sus receptores en el CHC aún no ha sido extensamente estudiado, por lo que caracterizar su presencia puede ser importante para el entendimiento de las actividades que tienen estas citocinas en el microambiente tumoral del CHC. A pesar de que se han realizado estudios sobre los niveles de IL-2 e IL-15 en el CHC, estos se han centrado en el análisis de suero y tejido peritumoral de pacientes para establecer posibles marcadores de pronóstico, pero a la fecha no se han realizado estudios sobre la expresión de ambas citocinas por parte directa de las células tumorales de CHC. De igual manera, hay escasa evidencia de la presencia de los receptores IL-2R e IL-15R en las células tumorales de CHC. Por tanto, en el presente estudio se analiza la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-2 y IL-15, así como sus receptores IL-2R e IL-15R, en un modelo *in vitro* de CHC con la línea celular HepG2 y en un análisis de datos de secuenciación de ARN de biopsias de CHC.

4. HIPÓTESIS

Durante la hepatocarcinogénesis la inflamación crónica es un factor predominante en el que las citocinas determinan la activación o supresión de la respuesta inmune antitumoral. Las citocinas proinflamatorias IL-2 e IL-15 han demostrado ser importantes activadoras de la respuesta inmune antitumoral y sinergizan en diferentes funciones biológicas puesto que comparten componentes de sus receptores. La IL-2, IL-15 y sus receptores IL-2R e IL-15R se expresan de manera normal en diferentes células del sistema inmune, sin embargo, varios estudios han demostrado su expresión en diversos tipos de cáncer, en donde actúan como factores que promueven el desarrollo tumoral. En el carcinoma hepatocelular (CHC) se desconoce la expresión de IL-2, IL-15 y las subunidades de sus receptores.

Por tanto, si se evalúa la expresión de IL-2, IL-15 y sus receptores IL-2R e IL-15R en la línea celular HepG2 de CHC mediante RT-PCR se podrá observar la presencia de transcritos para estas citocinas y sus receptores. Adicionalmente, mediante un análisis de datos de secuenciación de ARN será posible determinar aumentos en la expresión de IL-2, IL-15 y sus receptores IL-2R e IL-15R en tumores de CHC en comparación con tejidos de hígado sano; así como el impacto de estos genes en la sobrevivencia al CHC.

5. OBJETIVOS

GENERAL

- Evaluar la expresión génica de las citocinas IL-2 e IL-15, así como de sus receptores IL-2R e IL-15R, en la línea celular HepG2 mediante RT-PCRT y en biopsias de CHC mediante el análisis de datos de RNA-seq.

PARTICULARES

- Amplificar mediante la técnica de RT-PCR los transcritos de IL-2, IL-15, IL-2R α , IL-2/IL-15R β , γ_c e IL-15R α que se expresen en las células HepG2.
- Analizar las diferencias en la expresión génica de IL-2, IL-15, IL-2R α , IL-2/IL-15R β , γ_c e IL-15R α en tejidos de hígado sano y tumores de CHC con base en datos de RNA-seq obtenidos a través de la plataforma bioinformática UCSC Xena.
- Realizar los análisis de supervivencia al CHC en relación a la expresión de IL-2, IL-15, IL-2R α , IL-2/IL-15R β , γ_c e IL-15R α con base en los datos obtenidos de la plataforma bioinformática UCSC Xena.
- Evaluar mediante citometría de flujo la presencia a nivel de proteína de aquellos transcritos de los que fue detectada su expresión a nivel de ARNm mediante la RT-PCR y que además hayan mostrado una significativa sobreexpresión e impacto en la supervivencia al CHC de acuerdo al análisis de RNA-seq.

6. METODOLOGÍA

6.1 CULTIVO CELULAR

Se utilizó la línea celular HepG2, establecida de una biopsia de carcinoma hepatocelular de un paciente masculino, caucásico, de 15 años de edad. Estas células son adherentes con morfología epitelial y presentan un cariotipo con 50-60 cromosomas (Costantini et al., 2013). Se ha demostrado que dicha línea celular tiene integrado el genoma del VHB y del HPV (Ma et al., 2012). Esto hace de la línea celular HepG2 uno de los modelos *in vitro* más utilizados para el estudio del CHC.

Las células HepG2 se mantuvieron en medio de cultivo DMEM enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 10% (v/v), y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. Las células se cultivaron hasta lograr una confluencia del 80-90%. Una vez llegada esta confluencia, se contaron las células y se tomaron 2x10⁶ células para ser cultivadas en una caja Petri durante 24 horas bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Finalmente, de este cultivo se obtuvo el botón celular para ser utilizado en la extracción de ARN.

6.2 OBTENCIÓN DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA

Como un control positivo de la expresión de las citocinas IL-2 e IL-15, y sus receptores IL-2R e IL-15R, se utilizaron linfocitos de sangre periférica humana (LSPH), los cuales se obtuvieron de una muestra de aproximadamente 10 mL de sangre periférica extraída por venopunción de la fosa antecubital de un voluntario adulto joven de sexo masculino. La separación de los linfocitos se realizó por diferencias de densidad mediante una mezcla de sangre con Histopaque-1077 en una relación 1:1 y su posterior centrifugación a 400xg por 30 minutos. El disco de células mononucleares obtenido fue recolectado en un tubo con 5 mL de solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) fría y se centrifugó a 400xg por 10 minutos para obtener un botón celular. Los LSPH extraídos fueron cultivados bajo las mismas condiciones que las células HepG2 por un periodo de 24 horas y finalmente se recolectó el botón celular para la extracción de ARN.

6.3 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

Una vez obtenido los botones celulares tanto de las células HepG2 como de los LSPH se procedió a la extracción del ARN total por el método de Chomzynski y Sacchi (1987). Para esto, cada botón celular se resuspendió en 1 mL de reactivo TRIzol con el fin de provocar la lisis celular, posteriormente se adicionó 200 µL de cloroformo y después de un mezclado vigoroso se dejó incubar por 10 minutos, seguidamente se centrifugó a 12000rpm por 15 minutos a 4°C para lograr la separación de la fase acuosa y la fase orgánica. A continuación, se recuperó la fase acuosa, se le adicionó 500 µL de isopropanol y se incubó a -20°C durante toda una noche con el fin de precipitar la mayor cantidad de ARN. Posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se realizó un lavado con 1mL de etanol al 75%. Finalmente, el ARN se recuperó mediante una centrifugación a 9500 rpm a 4°C y se disolvió en 200 µL de agua libre de ARNasas. El ARN extraído se almacenó a -70°C hasta su uso.

El ARN extraído se cuantificó con la ayuda de un Biofotómetro, para lo cual se realizó una disolución de 2µL del ARN y 98µL de agua inyectable libre de ARNasas. Así mismo, se revisó la integridad del ARN mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE1x, a una corrida de 70 Voltios por 40 minutos y visualizado bajo luz ultravioleta mediante la tinción con 5µL de bromuro de etidio.

6.4 AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR DE LOS TRANSCRITOS DE IL-2, IL-15, IL-2R α , IL-2/IL-15R β , γ_c E IL-15R α

Se sintetizó el ADN complementario (ADNc) del ARN total extraído de células HepG2 y de LSPH mediante el kit de transcripción reversa M-MLV Retrotranscriptasa M1701 (Promega). En este proceso se realizó una mezcla de reacción con Buffer M-MLV RT (1x), Mix dNTP's (0.5 mM), OligoDT (0.75 μ g), enzima M-MLV RT (200 U), 5 μ g de la muestra de ARN y el volumen necesario de agua para lograr un volumen final de 25 μ L. La mezcla se incubó a 37°C por 1 hora, seguida de una inactivación de la reacción a 42°C por 1 minuto.

Después de la obtención del ADNc se realizaron las reacciones de PCR usando el KIT GoTaq Hot Start Polimerasa M5005 (Promega). Para ello, se preparó una mezcla de reacción para cada uno de los transcritos a analizar: IL-2, IL-15, IL-2R α , IL-2/IL-15R β , γ_c e IL-15R α . Como control positivo de la reacción de PCR se utilizó la amplificación de β -actina. Las mezclas de reacción contenían Buffer Green (1.4x), MgCl₂ (2.5 mM), Mix dNTP's (0.2 mM), *primer forwards* (1 mM), *primer reverse* (1 mM), Enzima Go Taq Hot Start (0.65 U), 5 μ L de cDNA y agua inyectable suficiente para completar un volumen total de 25 μ L. Los *primers* que fueron utilizados se muestran a continuación en la Tabla 1.

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

Transcrito	Tamaño en pares de bases (pb)	Primer	Secuencia	Temperatura de alineamiento (T _m)
IL-2R α	179	Sentido	5'-GGG AAA ATG AAG CCA CAG AG-3'	53.8 °C
		Antisentido	5'-GGT CTC CAT TTC ACC TGT GC-3'	56.1 °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
γ_c	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
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	262	Sentido	5'-GTC ACA AAC AGT GCA CCT AC-3'	53.9 °C
		Antisentido	5'-CCC TGG GTC TTA AGT GAA AG-3'	52.7 °C

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
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

Las mezclas de reacción se incubaron en un termociclador con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 5 minutos a 94 °C, seguida de 30 ciclos de amplificación (40 segundos a 94 °C, 40 segundos a la temperatura de alineamiento correspondiente y 2 minutos a 72 °C), y una extensión final de 7 minutos a 72 °C. Al término de los ciclos de amplificación las muestras se conservaron a 4 °C.

6.5 EVALUACIÓN POR ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

Para evaluar la presencia de los transcritos de interés, se tomaron 5 μ L de cada producto de reacción de PCR para ser visualizados en una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en TBE1x, a una corrida a 100 Voltios por 35 minutos y visualizado bajo luz ultravioleta mediante la tinción con 5 μ L de bromuro de etidio.

6.6 ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LAS DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN GÉNICA DE IL-2, IL-15, IL-2R α , IL-2/IL-15R β , γ_c E IL-15R α ENTRE TUMORES DE CARCINOMA HEPATOCELULAR Y MUESTRAS DE HÍGADO SANO

Con el fin de analizar si la expresión de las citocinas IL-2 e IL-15, junto con las subunidades de sus receptores, se encuentra elevada en las células de CHC, se realizó una comparación de la expresión entre tejidos de hígado sano y tumores de CHC. Para esto se obtuvieron datos de secuenciación de ARN (RNA-Seq) tanto de biopsias de CHC como de hígado sano. Los datos de RNA-Seq de tejidos hepáticos sanos se obtuvieron a través de la base de datos del proyecto *Genotype Tissue Expression* (GTEx; <https://gtexportal.org/home/>), mientras que los datos de RNA-Seq de biopsias de CHC se obtuvieron de la base de datos de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA; <https://portal.gdc.cancer.gov>). Los datos obtenidos se procesaron a través de la plataforma bioinformática UCSC Xena (<http://xena.ucsc.edu>) que es una plataforma desarrollada por el *Computational Genomics Lab* de la Universidad de California Santa Cruz (UCSC; <https://cglgenomics.ucsc.edu>), la cual permite realizar la comparación de los datos provenientes de GTEx y TCGA al realinearlos uniformemente y normalizarlos a través del método RSEM (Goldman et al., 2020; Li & Dewey, 2011). Finalmente, en esta plataforma se puede obtener una cuantificación de la expresión génica en términos de la metodología DESeq2 (Love et al., 2014) para el análisis de la expresión diferencial.

Una vez obtenidos los datos de expresión génica en UCSC Xena, estos fueron extraídos en un archivo de Microsoft Excel para su organización. Los datos de expresión fueron agrupados en muestras de hígado sano y en muestra de CHC para cada uno de los genes de interés. Finalmente se elaboraron diagramas de caja para la comparación de la expresión génica entre tejidos de hígado sano y tumores de CHC mediante el uso del programa estadístico GraphPad Prism v8.0 (GraphPad Software; <https://www.graphpad.com>). La diferencia estadísticamente

significativa entre los valores de expresión de tejidos de hígado sano y tumores de CHC se obtuvo mediante la prueba *t* de Welch a dos extremos para muestras independientes con varianzas desiguales, la cual fue procesada a través de GraphPad Prism v8.0.

6.7 ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LA SOBREVIVENCIA A CARCINOMA HEPATOCELULAR RELACIONADA A LA EXPRESIÓN DE IL-2, IL-15, IL-2R α , IL-2/IL-15R β , γ_c E IL-15R α

Con los datos de expresión génica de los tumores de pacientes con CHC obtenidos de la plataforma UCSC Xena, se realizaron por el método de Kaplan-Meier los análisis de supervivencia por enfermedad específica en relación a los valores de expresión de IL-2, IL-15, IL-2R α , IL-2/IL-15R β , γ_c e IL-15R α . Se obtuvieron dos curvas de supervivencia de cada gen de acuerdo a los valores de expresión, las cuales se sometieron a un análisis estadístico mediante la prueba no paramétrica de Mantel-Cox o logaritmo del rango (Log-rank) para establecer diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$. De esta manera se logró comparar la significancia que había en la supervivencia entre los pacientes con CHC que tenían alta o baja expresión génica de las citocinas y sus receptores, tomando en cuenta aquellos decesos causados únicamente por CHC. Los gráficos y los análisis estadístico se elaboraron con la ayuda del programa GraphPad Prism v8.0.

6.8 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN A NIVEL DE PROTEÍNA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Aquellos genes que resultaron con una expresión positiva a nivel de ARNm y que mostraron tener una significancia en los valores de expresión y en la supervivencia al CHC, fueron evaluados a nivel de proteína mediante ensayos de citometría de flujo. Para cada ensayo se cultivaron 2×10^6 células HepG2 durante 24 horas. Pasado el tiempo de cultivo se realizó un lavado con PBS frío y se recolectaron las células para ser fijadas con 300 μ L de formaldehído al 0.25% por 20 minutos. Transcurrido el tiempo se procedió a la incubación con el anticuerpo correspondiente por 1 hora en un volumen de 100 μ L PBS. Finalmente, se realizó un lavado con PBS frío para remover los anticuerpos no unidos. Las muestras se analizaron mediante el citómetro de flujo FACSAria II (BD Immunocytometry Systems) con 10,000 eventos por cada muestra. Los eventos fueron capturados y analizados con la ayuda del programa BD FACSDiVa y con la ayuda del programa Flowing Software v2.5.1 (<https://flowingsoftware.com/>) se procesaron los histogramas.

7. RESULTADOS

7.1 EXTRACCIÓN DE ARN INTEGRO DE LSPH Y CÉLULAS HEPG2

En consideración de que la integridad del ARN es indispensable para los estudios de expresión génica, antes de realizar la técnica de RT-PCR se evaluó la integridad del ARN de las muestras de estudio mediante una electroforesis en gel. El uso del método de Chomeczynski y Sacchi (1987) dio un rendimiento y calidad adecuada para la extracción del ARN tanto en LSPH como de células HepG2. La integridad del ARN de ambas muestras se evidencia con la presencia de las bandas 28s y 18s del ARN ribosómico y con la intensidad de la banda 28s aproximadamente al doble que la banda 18s (Figura 5). El ARN extraído de LSPH tuvo una concentración de 0.495 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y una pureza de D.O. $A_{260/280} = 1.81$. Por su parte el ARN de las células HepG2 tuvo una concentración de 2.065 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y una pureza de D.O. $A_{260/280} = 1.59$. Estos resultados demuestran que el ARN de ambas muestras se encontraba integro y que podía ser utilizado en los ensayos posteriores.

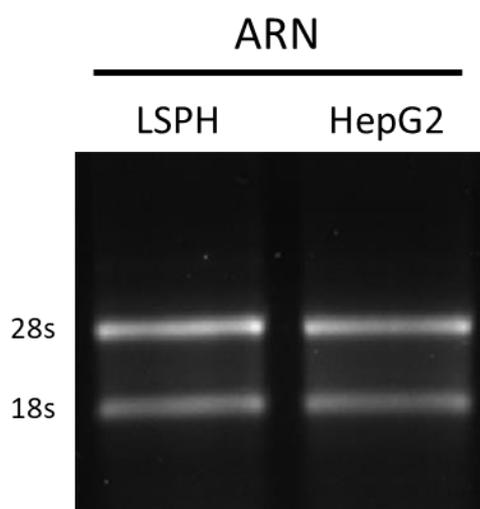


Figura 5. Integridad del ARN extraído de linfocitos de sangre periférica humana (LSPH) y de células HepG2. Se visualiza, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, las subunidades 28s y 18s de ARN ribosómico como indicadores de la integridad del ARN extraído.

7.2 EXPRESIÓN DE IL-2, IL-15 Y LAS SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES IL-2R E IL-15R EN LSPH COMO CONTROL POSITIVO

Se utilizaron LSPH como un control positivo de la expresión de IL-2, IL-15 y las subunidades del IL-2R y del IL-15R mediante la técnica de RT-PCR. Los LSPH extraídos se cultivaron durante diferentes intervalos de tiempo y fue a partir de las 24 horas de cultivo que se pudo detectar la expresión de los genes de interés con la técnica de RT-PCR empleada. Mediante una electroforesis se visualizaron los productos de amplificación de la RT-PCR y se validó que el tamaño de los productos de amplificación correspondía al diseño de los *primers* con respecto al marcador de pares de bases (pb). En la figura 6b se puede observar un producto de amplificación de 262 pb correspondiente al transcrito de IL-2 y un producto de amplificación de 152 pb correspondiente al transcrito de IL-15. De igual manera, para el caso de las subunidades de IL-2R e IL-15R, se obtuvieron productos de amplificación de los transcritos de IL-2R α (179 pb), IL-2/IL-15R β (206 pb), γ_c (159 pb) e IL-15R α (183 pb) (Figura 6c,d).

En todos los ensayos la amplificación de β -Actina se utilizó como control positivo de la técnica y se puede observar como una banda de 234 pb (Figura 6b-d).

Estos resultados nos demuestran que las condiciones de la estandarización de la RT-PCR y el diseño de los *primers* son los adecuados para analizar la expresión génica de IL-2, IL-15, IL-2R e IL-15R en las células HepG2.

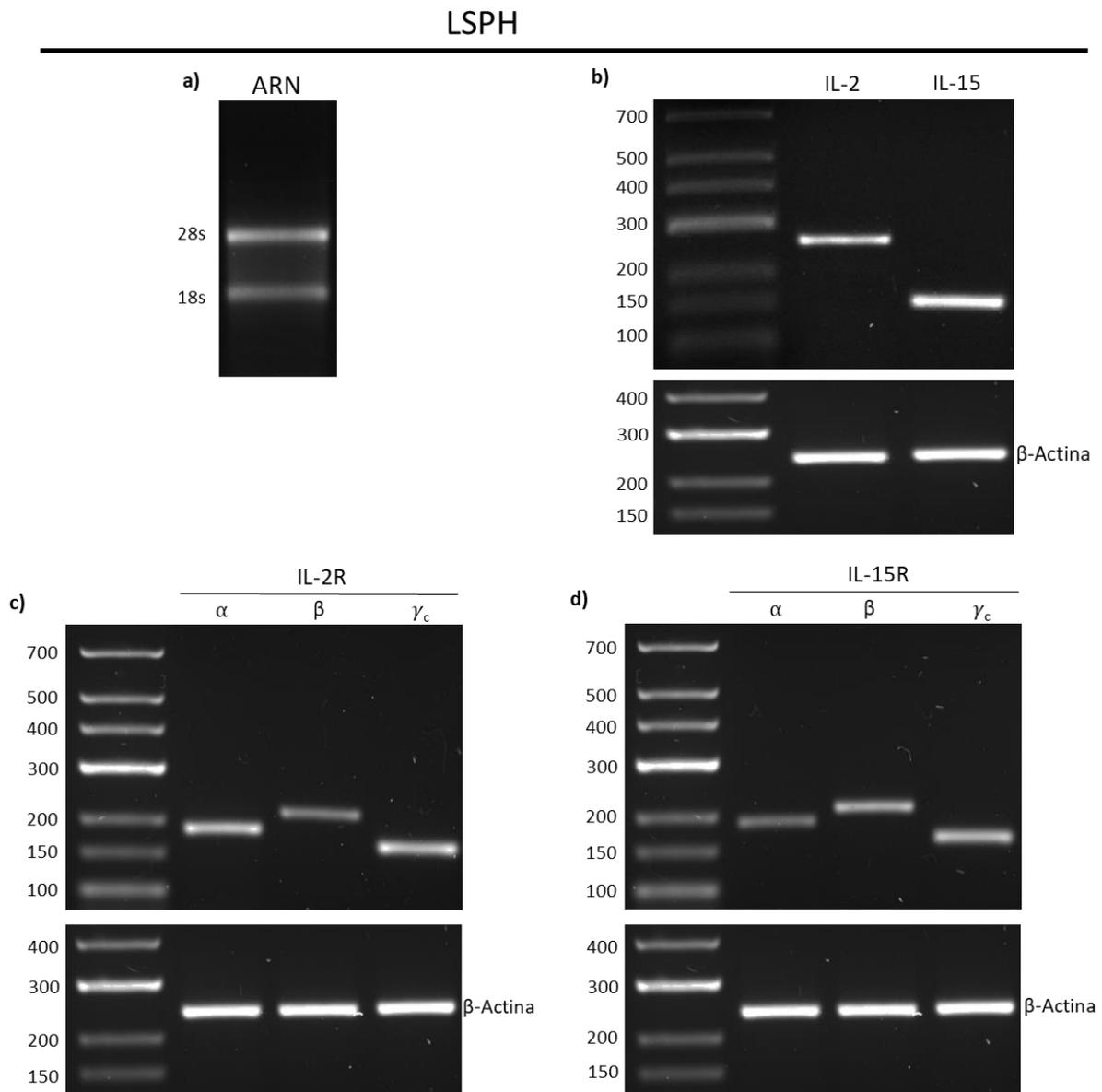


Figura 6. Evaluación de la expresión de las citocinas IL-2 e IL-15, así como las subunidades de IL-2R e IL-15R, en linfocitos de sangre periférica humana (LSPH). a) Integridad del ARN extraído de LSPH utilizado para los ensayos de RT-PCR. b) Amplificación por RT-PCR de los transcritos para IL-2 (262pb) e IL-15 (152pb). c) Amplificación por RT-PCR de los transcritos para la cadena α (179pb), β (206pb) y γ_c (159pb) del IL-2R. d) Amplificación por RT-PCR de los transcritos para la cadena α (183pb), β (206pb) y γ_c (159pb) del IL-15R. En los tres ensayos de RT-PCR se muestra β -Actina (234pb) como control positivo de la técnica. Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% y visualizado bajo luz ultravioleta por tinción con bromuro de etidio.

7.3 EXPRESIÓN DE IL-15, PERO NO DE IL-2, EN LAS CÉLULAS HEPG2

Una vez estandarizada la técnica de RT-PCR en LSPH para evaluar la expresión génica de IL-2, IL-15 y las subunidades de IL-2R e IL-15R, se procedió a evaluar la expresión de estos genes en las células de la línea celular HepG2 de CHC.

Los resultados demuestran que las células HepG2 expresan la citocina IL-15 al observarse el producto de amplificación correspondiente de 152 pb, el cual se presenta de manera intensa semejante a la expresión constitutiva de β -Actina (Figura 7b). Para el caso de IL-2 no se detectó el producto de amplificación de 262 pb correspondiente (Figura 7b), lo que demuestra que las células HepG2 no expresan IL-2, al menos a las 24 horas de cultivo. Estos resultados indican que las células HepG2 de CHC expresan IL-15 y no así IL-2. A pesar de que la IL-2 y la IL-15 comparten mecanismos de señalización y sinergizan en varias funciones celulares, parece no ser necesaria la presencia simultánea de ambas citocinas en el caso de las células HepG2, por el contrario, en estas células tumorales se observa una expresión preferente de IL-15, la cual podría resultar esencial para las células HepG2 dado su intensa expresión.

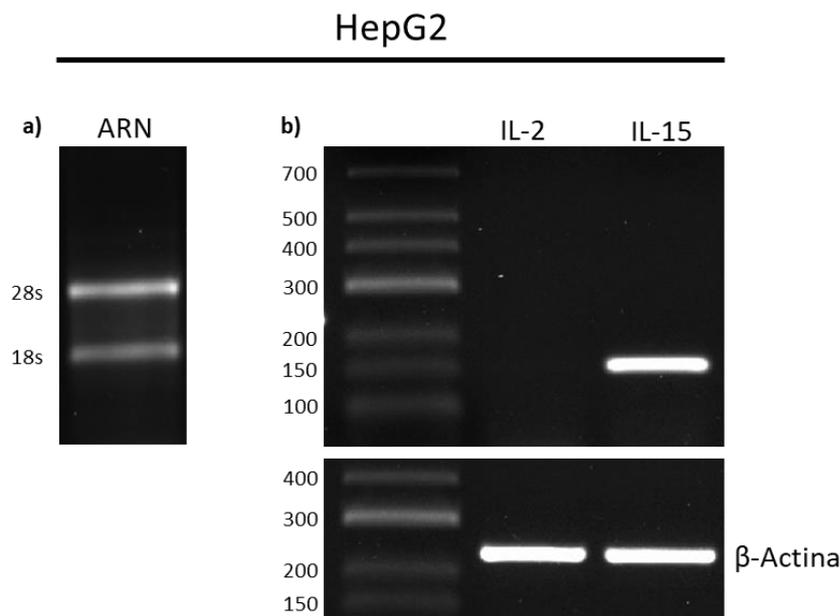


Figura 7. Evaluación de la expresión de las citocinas IL-2 e IL-15 en células HepG2 de CHC. a) Integridad del ARN extraído de las células HepG2 visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 2%. b) Visualización de los transcritos para IL-2 (262pb) e IL-15 (152pb) amplificados por RT-PCR en células HepG2 mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se muestra β -Actina (234pb) como control positivo de la técnica.

7.4 EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES α Y γ_c DEL IL-2R EN LAS CÉLULAS HEPG2

Se procedió a evaluar la expresión de las subunidades del IL-2R en las células HepG2. Los resultados revelan un producto de amplificación de 179 pb correspondiente a la subunidad IL-2R α y un producto de amplificación de 159 pb correspondiente a la subunidad γ_c . Así mismo se puede observar que la subunidad IL-2R α presenta una menor expresión comparada con la subunidad γ_c (Figura 8b). Por su parte, la expresión de la subunidad β fue indetectable al no observarse ningún producto de amplificación (Figura 8b). Estos resultados demuestran que las células HepG2 expresan las subunidades α y γ_c del IL-2R, aunque no se detectó la expresión de la subunidad β .

Aun cuando no se observó expresión de la citocina IL-2 en las células HepG2, la expresión de algunas de las subunidades del IL-2R permiten sugerir que en dichas células la IL-2 podría desencadenar una señalización.

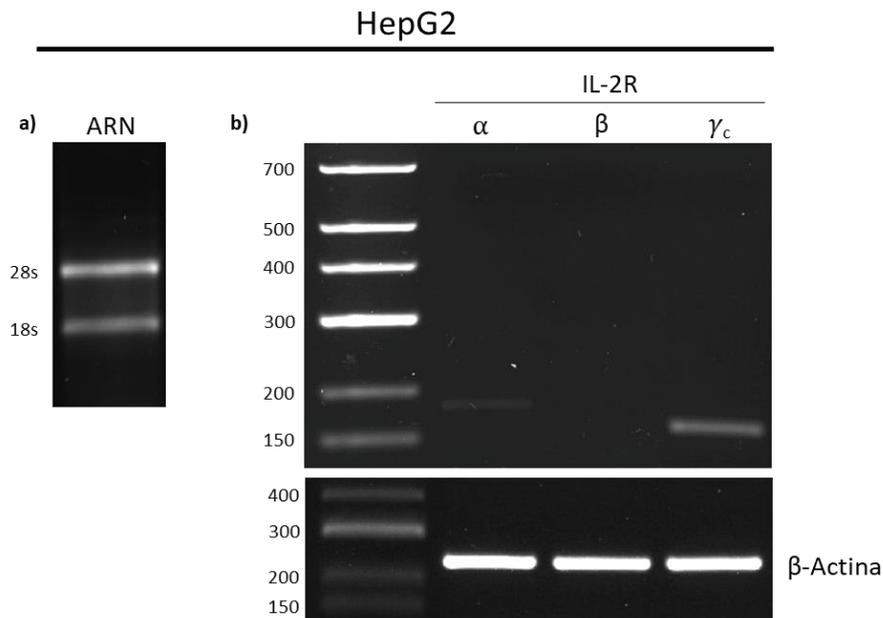


Figura 8. Evaluación de la expresión del complejo IL-2R en células HepG2 de CHC. a) Integridad del ARN extraído de las células HepG2 visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 2%. b) Visualización de los transcritos para la cadena α (179pb), β (206pb) y γ_c (159pb) del IL-2R amplificados por RT-PCR en células HepG2 mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se muestra β -Actina (234pb) como control positivo de la técnica.

7.5 EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES α Y γ_c DEL IL-15R EN LAS CÉLULAS HEPG2

En el caso de la expresión del IL-15R en las células HepG2 se observó un producto de amplificación de 183 pb propio a la subunidad IL-15R α (Figura 9b). Dicha expresión de IL-15R α resulta ser mayor en comparación con la expresión de la subunidad IL-2R α (Figuras 8b y 9b).

En congruencia con lo observado en la evaluación de la expresión de IL-2R, también se observó el producto de amplificación de 159 pb correspondiente de la subunidad γ_c y nuevamente no se detectó la expresión de la subunidad β (Figura 9b).

Estos resultados nos demuestran que las células tumorales HepG2 expresan las subunidades α y γ_c del IL-15R. La expresión de la subunidad IL-15R α en las células HepG2 podría ser el principal mecanismo a través del cual utilizan funcionalmente la IL-15 y sin la necesidad de las otras dos subunidades del IL-15R, puesto que la IL-15 presenta una mayor afinidad a la subunidad α y se ha demostrado que puede realizar una señalización yuxtacrina mediante la asociación a esta misma subunidad.

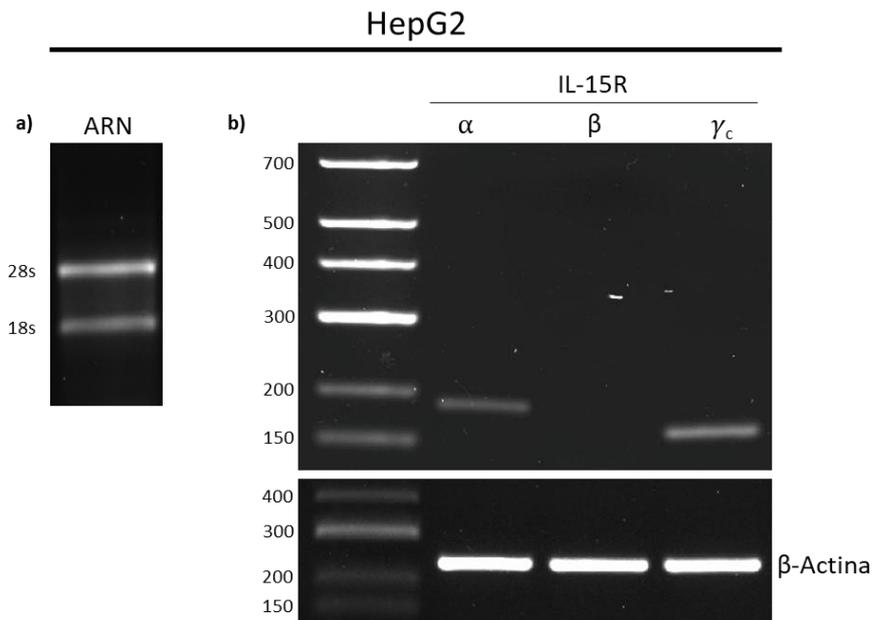


Figura 9. Evaluación de la expresión del complejo IL-15R en células HepG2 de CHC. a) Integridad del ARN extraído de las células HepG2 visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 2%. b) Visualización de los transcritos para la cadena α (183pb), β (206pb) y γ_c (159pb) del IL-15R amplificados por RT-PCR en células HepG2 mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se muestra β -Actina (234pb) como control positivo de la técnica.

7.6 EXPRESIÓN REDUCIDA DE LA SUBUNIDAD IL-2/IL-15R β EN LAS CÉLULAS HEPG2

Se sabe que la expresión de las citocinas y sus receptores está estrictamente regulada y tiende a ser muy baja en comparación a otras moléculas del sistema inmune (Foxwell et al., 1992; Miyajima et al., 1992; Zola et al., 1995). La técnica de RT-PCR se ha utilizado ampliamente para identificar la expresión de citocinas y sus receptores en células, fluidos corporales o biopsias debido a que es muy sensible y permite amplificar concentraciones bajas de ARNm, sin embargo, a pesar de la sensibilidad de la técnica, si solo una pequeña proporción de las células presentes en la muestra expresa el gen de interés, es posible que no se alcance el umbral de detección (Amsen et al., 2009; Giulietti et al., 2001). En el caso de la subunidad IL-2/IL-15R β se ha reportado una expresión diferencial entre distintos tipos de células y que en algunos casos llega a ser muy baja incluso cuando la subunidad IL-2R α y γ_c se expresan elevadamente y de manera equitativa (Smith et al., 2017; Zhang et al., 1998).

Debido a esto se procedió a confirmar que las células HepG2 tuvieran una nula expresión de la subunidad IL-2/IL-15R β o bien que su expresión fuera muy baja que apareció indetectable en los ensayos realizados. Para ello se realizó nuevamente la extracción de ARN y la RT-PCR, pero en esta ocasión se aumentó la concentración de ARN hasta 10 μ g en la reacción de RT-PCR con el fin de aumentar las posibilidades de detectar los transcritos de la subunidad IL-2/IL-15R β .

Los resultados nos muestran un producto de amplificación de 206pb correspondiente a la subunidad β (Figura 10b). Por lo tanto, las células HepG2 también expresan la subunidad IL-2/IL-15R β pero a concentraciones muy bajas que solo son detectadas por RT-PCR a partir de 10 μ g de ARN y con esto se confirma que las células HepG2 expresan las tres subunidades del IL-2R y el IL-15R.

HepG2

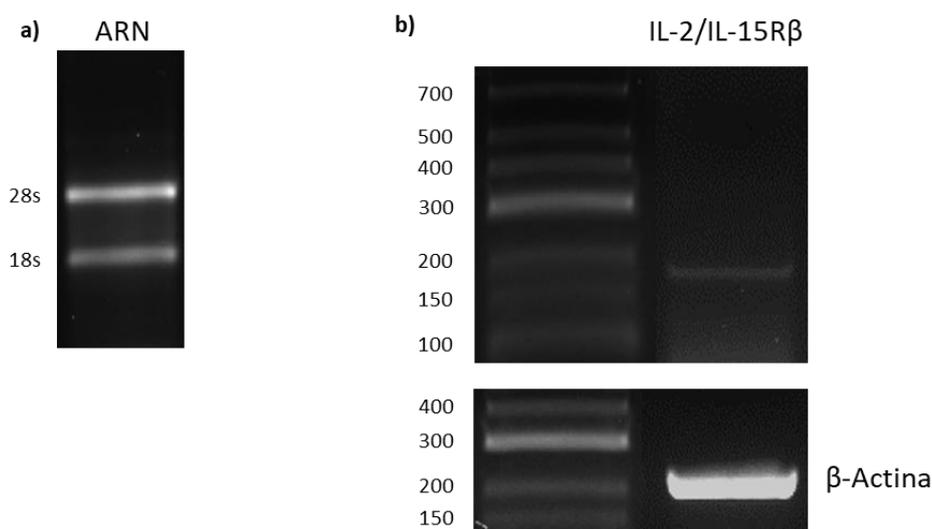


Figura 10. Evaluación de la expresión de IL-2/IL-15R β en células de carcinoma hepatocelular de la línea HepG2. a) Integridad del ARN extraído de las células HepG2 visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 2%. b) Producto de amplificación por RT-PCR del transcrito para la cadena β (206pb) del receptor de IL-2 e IL15 en células HepG2, visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se muestra β -Actina (234pb) como control positivo de la técnica. Para la realización de la RT-PCR se partió de 10 μ g de ARN extraído de las células HepG2.

7.7 DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA ENTRE HÍGADO SANO Y CARCINOMA HEPATOCELULAR

A través de la plataforma USCS Xena se recolectaron datos de RNA-Seq por Illumina HiSeq de 479 muestras, de las cuales 110 pertenecían a muestras de tejido hepático sano provenientes de *Genotype Tissue Expression Project* (GTEx), y 369 correspondían a muestras de CHC obtenidas de *The Cancer Genome Atlas* (TCGA).

El análisis de los datos obtenidos de TCGA/GTEx reveló una expresión basal de IL-2 e IL-15 tanto en hígado sano como en CHC, siendo el valor medio de expresión de IL-2 menor al de IL-15 en ambos tipos de muestras. Cuando se comparan los valores de expresión en CHC con respecto a hígado sano se tiene que la expresión de IL-15 es significativamente menor en CHC, en cambio para IL-2 no hay diferencia significativa (Figura 11a,b).

En cuanto a las subunidades de los receptores de IL-2 e IL-15, la expresión de las subunidades IL-2R α e IL-15R α es significativamente mayor en tumores de CHC en comparación con tejidos de hígado sano, y en ambos casos estas subunidades presentan valores de expresión más elevados que sus respectivas citocinas (Figura 11c,d). Para el caso de la subunidad β , se observa una expresión significativamente menor en CHC con respecto a hígado sano; y por el contrario la subunidad γ_c presenta una significativa mayor expresión en CHC (Figura 11e,f).

Estos resultados demuestran que los hepatocitos sanos y tumorales expresan basalmente IL-2, IL-15 y las subunidades de sus receptores, observándose una mayor expresión de IL-15 e IL-15R α por encima de la expresión de IL-2 e IL2R α . Por otro lado, se observa una significativa mayor expresión de IL2R α , IL-15R α y γ_c en tumores de CHC, lo que permite sugerir que si bien las señalizaciones de IL-2 e IL-15 podrían ser esenciales para la función de los hepatocitos, su aumento tiene un impacto en las células de CHC.

COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN TEJIDO SANO vs CHC

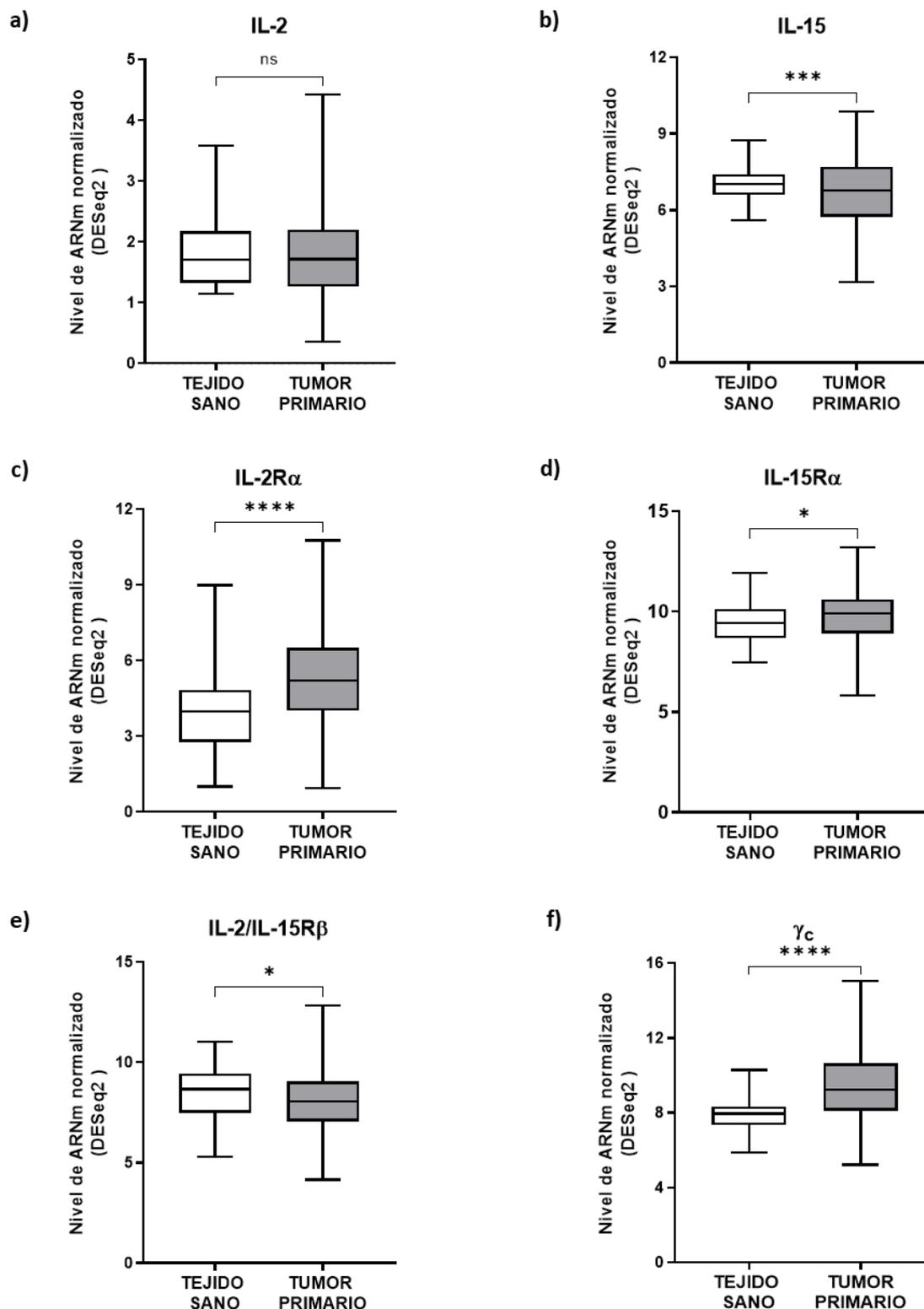


Figura 11. Comparación entre células de hígado sano y células de CHC en la expresión génica de IL-2 (a), IL-15 (b), IL-2R α (c), IL-15R α (d), IL-2/IL-15R β (e) y γ_c (f) obtenidos mediante el análisis de RNA-seq de las bases de datos TCGA y GTEx a través de la plataforma UCSC Xena. Se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba estadística *t* de Welch a dos extremos para determinar diferencia significativa entre los valores de expresión en hígado sano y CHC: ns= diferencia no significativa; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.005$; *** = $p < 0.0005$; **** = $p < 0.0001$.

7.8 ALTA EXPRESIÓN DE IL-15R α AFECTA SIGNIFICATIVAMENTE LA SOBREVIVENCIA AL CARCINOMA HEPATOCELULAR

A través de la plataforma UCSC Xena se obtuvieron los datos de supervivencia específica a CHC de los pacientes a los que correspondían los tumores de CHC con los que se realizó el análisis de RNA-Seq. Con base en los valores de expresión de IL-2, IL-15 y las subunidades de sus receptores en los tumores de CHC, se procedió a realizar un análisis de supervivencia por el método de Kaplan-Meier. Para esto se establecieron dos grupos en el caso de cada gen, uno con las muestras que presentaban valores altos de expresión (mayor o igual a la mediana) y otro grupo con las muestras que presentaban valores bajos de expresión (menor a la mediana). Se obtuvieron así dos curvas de supervivencia para cada gen de acuerdo sus valores de expresión y se identificaron aquellas diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$ (Figura 12).

De los genes analizados, únicamente la subunidad IL-15R α presentó una diferencia significativa ($p=0.016$) entre la curva de supervivencia asociada a una expresión génica alta y la curva de supervivencia asociada a una expresión génica baja (Figura 12d). Este resultado demuestra que una mayor expresión de IL-15R α por parte de las células de CHC se correlaciona significativamente con una menor probabilidad de supervivencia, lo que indica que la subunidad IL-15R α puede desempeñar un papel importante en la progresión tumoral.

SOBREVIVENCIA DE PACIENTES CON CHC EN RELACIÓN A LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA

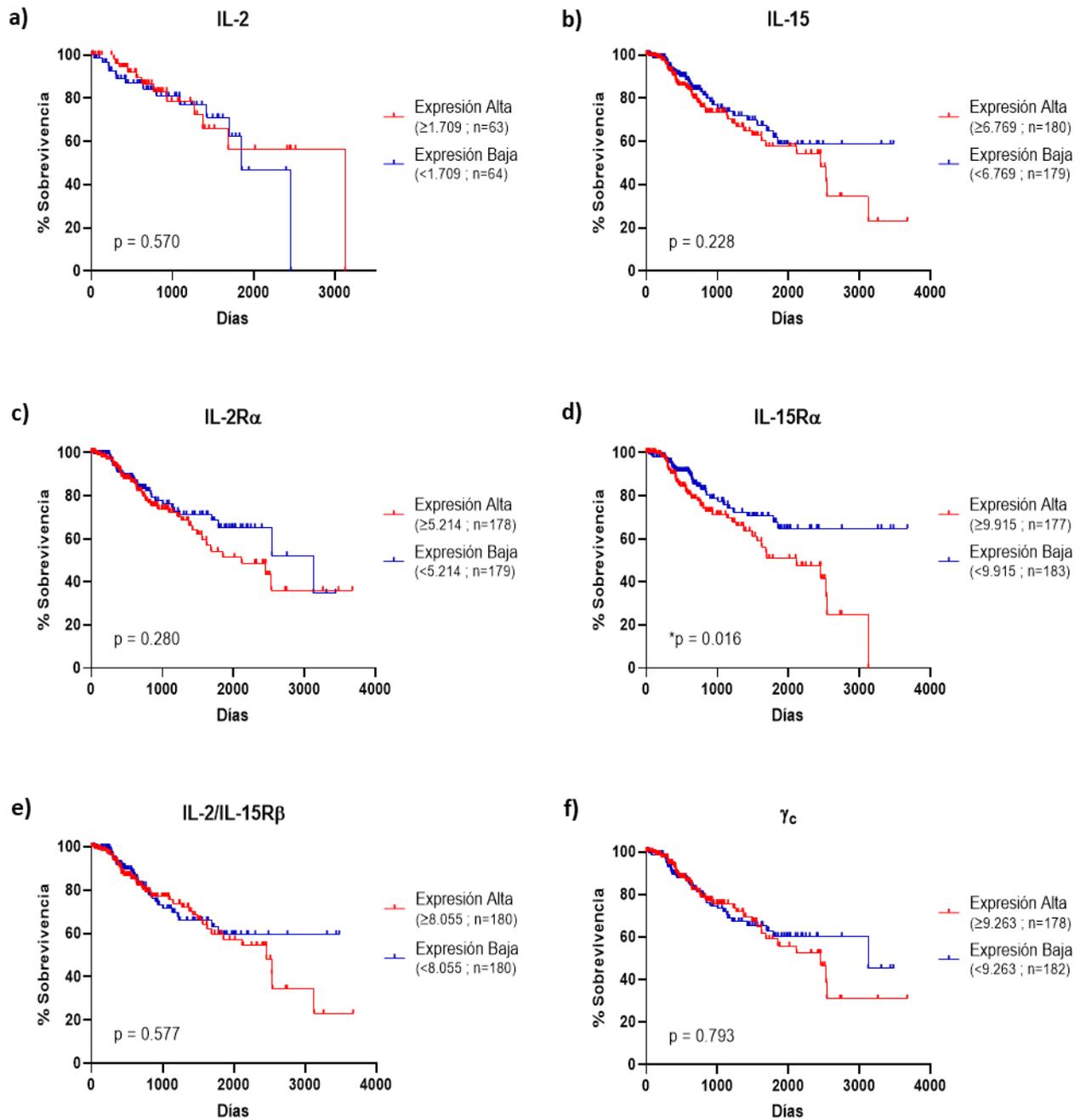


Figura 12. Curvas de supervivencia de pacientes con CHC en relación a una expresión génica alta o baja de IL-2 (a), IL-15 (b), IL-2R α (c), IL-15R α (d), IL-2/IL-15R β (e) y γ_c (f) obtenidas por el método Kaplan-Meier a través de la plataforma USCX Xena. Se realiza la prueba estadística de logaritmo del rango para identificar diferencias significativas (* = p<0.05) en la supervivencia de los pacientes con expresión alta o baja de los genes mencionados.

7.9 PRESENCIA DE IL-15R α EN LA MEMBRANA CELULAR DE LAS CÉLULAS HEPG2

Con base en los resultados obtenidos del análisis de datos de RNA-Seq, se encontró que la subunidad IL-15R α presenta una mayor expresión en CHC comparada con hígado sano y que esta expresión elevada se correlaciona con una menor probabilidad de sobrevivencia a CHC de manera significativa. Por consiguiente, se procedió a evaluar la expresión de IL-15R α a nivel de proteína en las células HepG2 mediante un ensayo de citometría de flujo. Para dicho ensayo las células fueron fijadas después de 24 horas de cultivo y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-IL-15R α conjugado con ficoeritrina (eBioJM7A4, PE, eBioscience™) a una concentración de 2.5 μ L por ensayo.

Más aún, dado que la expresión a nivel de proteína de IL-15R α se controla predominantemente durante la traducción y secreción (Budagian et al., 2006; Pereno et al., 2000), la expresión a nivel de ARNm no necesariamente se correlaciona con la cantidad presente a nivel de proteína y por ende este tipo de ensayos es relevante para confirmar la presencia de la subunidad IL-15R α en su forma proteica.

En la figura 13 se muestra la sobreposición de los histogramas correspondientes al grupo control de células HepG2 y al grupo de células HepG2 incubadas con el anti-IL-15R α . Se observa que la incubación con anti-IL-15R α resulta en un desplazamiento del 17.2% con respecto a la autofluorescencia de las células HepG2. Con este resultado se demuestra que las células HepG2 expresan IL-15R α a nivel de proteína después de 24 horas de cultivo. Al no ser permeabilizadas las células HepG2 para el ensayo de citometría de flujo, se indica que IL-15R α se encuentra expuesta en la membrana celular. La expresión de IL-15R α pudiera modificarse dependiendo el tiempo de cultivo y la exposición a diferentes concentraciones de IL-15 en el medio de cultivo.

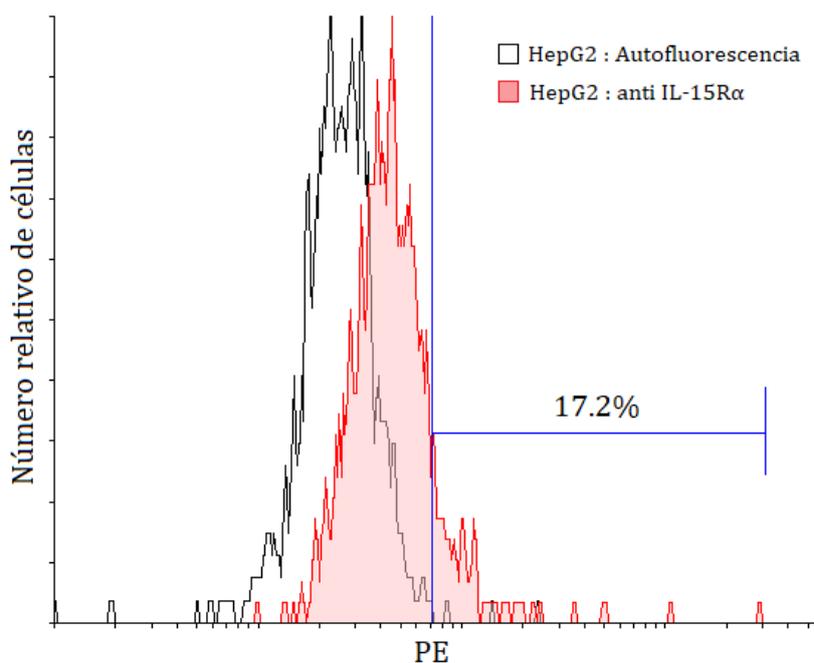


Figura 13. Histogramas de ensayos de citometría de flujo con 10,000 células HepG2 donde se gráfica la fluorescencia relativa emitida de ficoeritrina (PE). En negro se observa el histograma correspondiente al grupo control de células HepG2 sin anticuerpo y en rojo se observa el histograma correspondiente a las células HepG2 incubadas con el anticuerpo anti-IL-15R α conjugado con el fluoróforo PE. Se observa un desplazamiento del 17.2% en la fluorescencia de las células HepG2 con el anti-IL-15R α en comparación con su propia autofluorescencia.

8. DISCUSIÓN

Existen múltiples evidencias que demuestran que las citocinas en el microambiente tumoral tienen una actividad relevante tanto en el inicio como en 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). La IL-2 e IL-15 son citocinas proinflamatorias que participan en el proceso inmunológico antitumoral, pero también se ha demostrado que tienen un papel importante en el proceso carcinogénico de diversos tumores (Waldmann, 2006).

Aun cuando se ha reportado que la IL-2 puede ser expresada por células de leucemias y tumores sólidos (Yasumura et al., 1994; Reichert et al., 2000; García-Tuñón et al., 2003; Rocha-Zavaleta et al., 2004; Kasprzak et al., 2007; Rangel-Corona et al., 2010), en este estudio se demuestra que las células HepG2 de CHC no expresan IL-2, aunque el análisis de RNA-seq realizado señala que tanto en tumores de CHC como en hígado sano se expresa IL-2 pero en valores relativamente bajos. A su vez, se demuestra que las células HepG2 expresan las subunidades α , β y γ_c del IL-2R, por lo que es posible que estas células sean capaces de responder a la estimulación con IL-2 exógena e inclusive la expresión de las subunidades de IL-2R pudiera aumentar tras dicha estimulación, tal como se ha reportado en células inmunológicas (Thomas A. Waldmann, 1989) y otros modelos de cáncer como melanoma y cervicouterino (Y. G. He et al., 2004; Rocha-Zavaleta et al., 2004). Adicionalmente, se encontró que la subunidad IL-2R α está significativamente sobreexpresada en el CHC de acuerdo al análisis de RNA-seq, reforzando la idea de que las células de CHC pueden responder funcionalmente a la estimulación con IL-2.

Se ha indicado que la IL-2 forma parte de las citocinas proinflamatorias tipo Th1 que se encuentran presentes de manera sistémica durante el proceso inflamatorio que favorece la hepatocarcinogénesis y que se ven reducidas conforme progresa el CHC (Budhu y Wang, 2006; Sachdeva et al., 2015). Sin embargo, en el análisis de datos de RNA-seq no se observó una diferencia significativa en la expresión de IL-2 entre hígado sano y tumores de CHC. Esto plantea la idea de que la reducción en los niveles sistémicos de IL-2 en CHC se debería predominantemente a la disminución en la expresión por parte de las células inmunológicas y no por parte de las células tumorales.

Aunque IL-2 tiene un potencial antitumoral al ser una citocina estimulante de la respuesta inmune y ha sido utilizada en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, se ha demostrado que a bajas concentraciones la IL-2 puede actuar como un factor de crecimiento tumoral, además de reducir significativamente la sensibilidad a la apoptosis inducida por agentes quimioterapéuticos como el cisplatino (He et al., 2004; Lagunas-Cruz et al., 2019; Rangel-Corona et al., 2010). A diferencia de los linfocitos que requieren altas concentraciones de IL-2 para proliferar, estudios previos han demostrado que en células de cáncer cervicouterino positivas al VPH que expresan el IL-2R se induce la proliferación únicamente a bajas concentraciones de IL-2 (10 U/mL), mientras que a altas concentraciones de IL-2 (100 U/mL) se inhibe su proliferación (Rocha-Zavaleta et al., 2004; Rangel-Corona et al., 2010; Valle-Mendiola et al., 2014; Lagunas-Cruz et al., 2019). Esto se puede deber a la fosforilación constitutiva de JAK3 y a la ausencia de la fosforilación JAK1 en la vía de señalización del IL-2R (Valle-Mendiola et al., 2014, 2016). Así mismo, en células de

melanoma uveal metastásicas que expresan el IL-2R la estimulación con IL-2 exógena aumenta significativamente su proliferación (Y. G. He et al., 2004).

Con base en esto es posible que las células de CHC sean capaces de responder a la IL-2 ya que expresan las tres subunidades del IL-2R de manera basal, pero dado que solo a bajas concentraciones de esta citocina se favorece el desarrollo tumoral, las células de CHC no necesitan sintetizar esta citocina y solo utilizan la IL-2 secretada por las células del sistema inmune de manera reducida en el microambiente tumoral a consecuencia del desbalance de citocinas Th1/Th2 característico en el CHC. Así mismo, debido a que la IL-2 puede actuar como un inductor de apoptosis (Waldmann, 2015), favorecer la infiltración de linfocitos T CD8+ en el CHC (Ikeguchi y Hirooka, 2005) y ocasionar la muerte de las células tumorales a altas concentraciones (Rocha-Zavaleta et al., 2004; Rangel-Corona et al., 2010; Valle-Mendiola et al., 2014; Lagunas-Cruz et al., 2019), se refuerza el hecho de que la expresión de IL-2 sea baja en el CHC con el fin de permitir su progresión.

Adicionalmente, se ha reportado que células de melanoma que expresan el IL-2R al ser expuestas a IL-2 generan una resistencia a la actividad citolítica de las células NK (Boyano et al., 1997; Y. G. He et al., 2004) y aumentan su capacidad de invasión metastásica (Boyano et al., 1997). Dado que el hígado es uno de los órganos que posee una mayor actividad de células NK (O'Farrelly & Crispe, 1999), la capacidad de las células de CHC para responder a IL-2 podría ser entonces un mecanismo a través del cual se evade la respuesta inmune antitumoral mediada por las células NK.

En el caso de la IL-15, los resultados obtenidos en la RT-PCR demuestran una alta expresión de esta citocina por parte de las células HepG2, en cambio en el análisis de datos de RNA-seq se observa una significativa disminución de IL-15 en los tumores de CHC al comparar con tejidos de hígado sano, no obstante, los valores de expresión son altos con respecto a los demás genes analizados en este estudio. 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 & Caligiuri, 2001; Grabstein et al., 1994). Incluso, un estudio previo ha reportado la presencia de ARNm de IL-15 en hígado (Grabstein et al., 1994), sin embargo, la expresión de esta citocina y su receptor en células de CHC no había sido analizada. En este estudio se demuestra que efectivamente IL-15 es expresada en células hepáticas tanto sanas como tumorales, en especial en la línea celular HepG2 de CHC. Aunque el análisis de RNA-seq revela una significativa subexpresión de IL-15 en tumores de CHC, en el caso de la línea celular HepG2 la expresión de IL-15 se observa tan intensa como la expresión de β -Actina, por lo que esta citocina podría estar ejerciendo una actividad biológica esencial en estas células, posiblemente para favorecer su proliferación y sobrevivencia.

Se ha demostrado que la IL-15 actúa principalmente como un factor de proliferación y de sobrevivencia al tener un efecto antiapoptótico (Bulfone-Paus et al., 1997; Mishra et al., 2014). La 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). De hecho, en fibroblastos se ha observado que la estimulación con IL-15 transactiva al receptor tirosina-cinasa Axl asociado constitutivamente a la subunidad IL-15R α , para inducir la activación de la vía de señalización PI3K/Akt y como consecuencia regular a la alza a Bcl-xL y Bcl-2 esenciales para la inhibición de la apoptosis (Budagian et al., 2005). También se ha observado que IL-15 puede inducir la proliferación 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 (Y. G. He 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 alta expresión de IL-15 observada en las células HepG2 se puede deber a la presencia de IL-6 que se ha reportado en las células HepG2 (Hu et al., 2017) y elevadamente en el suero de pacientes con CHC (Nakagawa et al., 2009; Shakiba et al., 2018; Wong et al., 2009), ya que la IL-6 puede regular a la alza la expresión de IL-15 mediante la activación de las vías de señalización MAPKs-ERK1/2 y PI3K-AKT (Tao et al., 2012). De igual manera, se ha observado que los interferones de tipo I (IFN- α e IFN- β) inducen la sobreexpresión de IL-15 en células de CHC, aunque dicho efecto genera una inhibición de la proliferación celular, que es más significativa con la estimulación de IFN- β que con IFN- α (Yamaji et al., 2006).

La expresión de IL-15 por parte de células tumorales se ha observado en diversos tipos de cáncer. Por ejemplo, en el cáncer de colon la expresión de IL-15 induce la proliferación, la motilidad, la invasividad y la producción de factores proangiogénicos, así como aumenta la resistencia a la apoptosis. Además, la secreción de IL-15 por parte de células metastásicas de cáncer de colon está asociada a la inducción de hiperplasia en la mucosa adyacente contribuyendo así a la angiogénesis y metástasis (Kuniyasu et al., 2003).

Si bien la expresión de IL-15 puede ser claramente detectable a nivel de ARNm, a nivel de proteína la IL-15 es comúnmente indetectable en el medio extracelular, esto debido a que pueden estar siendo rápidamente consumida de manera autocrina o yuxtacrina por las células que expresan IL-15R (Tinhofer et al., 2000).

La posibilidad de que la expresión de IL-15 pueda ser funcionalmente activa en las células HepG2 se refuerza con el hecho de que la subunidad IL-15R α se vio claramente expresada en esta línea celular. Adicionalmente los resultados de los ensayos de citometría de flujo en las células HepG2 revelan la presencia de IL-15R α en su membrana celular, por lo que la IL-15 podría actuar en las células HepG2 de manera autocrina como se ha observado en otras líneas celulares de cáncer.

Por ejemplo, en distintos tipos de cáncer hematológicos se ha reportado que las células T y B malignas sobreexpresan la IL-15 y presentan las subunidades del receptor IL-15R, por lo que utilizan de manera autocrina a la IL-15 como un mecanismo que favorece su propagación (Döbbeling et al., 1998; Tinhofer et al., 2000; Yamada et al., 1998). Así mismo, se ha reportado en cáncer de mama triple negativo una señalización autocrina mediante el complejo IL-15/IL-15R α que promueve la proliferación, migración e inhibición de la apoptosis (Marra et al., 2014).

La IL-15 puede ser secretada en forma soluble IL-15 (IL-15sol) o en forma de complejo con su receptor IL-15R α (IL-15/IL-15R α) (Mortier et al., 2006). En múltiples estudios se ha demostrado que IL-15 se coexpresa de manera simultánea con la subunidad IL-15R α , predominantemente en monocitos activados y células dendríticas (Fehniger & Caligiuri, 2001; Waldmann, 2006). Se ha observado que la señalización en forma de transpresentación del complejo IL-15/IL-15R α a las células vecinas que expresan el heterodímero IL-2/IL-15R $\beta\gamma_c$ tiene una mayor bioactividad en comparación con la unión de la IL-15sol, representando así una señalización más precisa y confinada a microambientes selectivos, e incluso se ha demostrado que esta transpresentación puede potencializar inmunoterapias (Bessard et al., 2009; Dubois et al., 2008; Epardaud et al., 2008; Stoklasek et al., 2006; Van den Bergh et al., 2017). Los resultados de RT-PCR obtenidos en la línea celular HepG2 demuestran una mayor expresión de IL-15 que de la subunidad IL-15R α , lo que permite sugerir que una parte de la transcripción de IL-15 pudiera ser traducida y secretada en forma de complejo unida a IL-15R α y otra parte pudiera ser traducida y secretada en la forma soluble. Ante esto, cabe la posibilidad que en las células HepG2 no solo se presente

una señalización autocrina de IL-15, sino que también pudiera señalar de manera yuxtacrina por medio de la transpresentación del complejo IL-15/IL-15R α con células adyacentes que expresen el heterodímero IL-2/IL-15R $\beta\gamma_c$.

La forma en que las células HepG2 podrían estar secretando la IL-15 es relevante, puesto que los mecanismos de acción entre la IL-15sol y el complejo IL-15/IL-15R α desencadenan respuestas fisiológicas diferentes. En un estudio de leucemia en modelo murino se demostró que las células malignas que secretaban IL-15sol proliferaban considerablemente en un inicio, pero avanzado el tiempo eran completamente eliminadas por el sistema inmunológico ya que se favorecía la expansión de células T CD4+ y CD8+ en el microambiente tumoral, propiciando así una respuesta inmune adaptativa de larga duración y un mayor índice de supervivencia a largo plazo. Por el contrario, las células malignas que secretaban el complejo IL-15/IL-15R α proliferaban lentamente en un inicio, pero persistían con el tiempo debido a que se favorecía una mayor infiltración y activación de células NK en el microambiente tumoral mientras se inducía un agotamiento de las células T CD4+ y CD8+, permitiendo así un ataque inmediato por parte de la célula NK de la respuesta inmune innata pero inhibiendo la respuesta adaptativa de memoria de células T, lo que eventualmente ocasionó la evasión del sistema inmune, la progresión tumoral y una menor supervivencia (Berger et al., 2019).

Si bien la transpresentación del heterodímero IL-15/IL-15R α ha sido propuesto como un mecanismo potenciador de las inmunoterapias contra el cáncer para generar una mayor supervivencia, es necesario considerar que la supervivencia a largo plazo podría depender del tipo de células que se activen ya que las diferentes formas de IL-15 pueden activar diferentes tipos celulares. En el caso de la IL-15sol parece ser un mecanismo que activa mayormente la respuesta inmune adaptativa permitiendo una mayor protección al largo plazo, en cambio el complejo IL-15/IL-15R α activa mayormente una respuesta inmune innata a través de las células NK, pero no genera una protección al largo plazo. De hecho, la presencia de células NK activas limita la respuesta inmune adaptativa de las células T, principalmente en infecciones virales crónicas (Cook et al., 2014). Incluso en pacientes con infección de VHB se ha evidenciado que durante la inflamación crónica del hígado las células NK desencadenan por contacto directo la apoptosis de las células T CD8+ periféricas e intrahepáticas, a través de la interacción del receptor de muerte TRAIL-R2 de las células T y el ligando TRAIL de las células NK (Dunn et al., 2007; Peppas et al., 2013). De esta manera, la expresión de IL-15 en complejo con IL-15R α en las células HepG2 infectadas con VHB podría ser resultado del desarrollo de un mecanismo de persistencia del virus y de evasión de la respuesta inmune antitumoral al limitar a las células T CD8+ a través de la activación de las células NK en el microambiente tumoral.

La secreción de IL-15 en sus dos formas podría actuar como un mecanismo modulador que orquesta el equilibrio entre el sistema inmune innato y el adaptativo, dando como resultado una respuesta inmune afinada. Por esto se requieren más estudios para comprender la interacción dinámica entre la expresión de IL-15sol e IL-15/IL-15R α dentro del ambiente tumoral del CHC.

El análisis de RNA-Seq demuestra que la subunidad IL-15R α tiene una mayor expresión en tumores de CHC y su sobreexpresión se ve correlacionada de manera significativa con una menor supervivencia. Por lo que la presencia de IL-15R α sola o en complejo con la citocina IL-15 podría no solo estar estimulando la proliferación de las células de CHC, sino que además podría favorecer su resistencia a la respuesta inmune antitumoral o a la acción de quimioterapias, o también favorecer una mayor capacidad metastásica. De hecho estos efectos mediados por la IL-15R α se han observado en otros modelos de cáncer (Y. G. He et al., 2004; Wei et al., 2020).

Ante esto se sugiere que la señalización de IL-15 - IL-15R α en las células cancerígenas puede actuar como un potenciador de inmunoterapias o bien como un factor protumoral dependiendo del contexto tumoral. En cáncer gástrico se ha observado que una mayor expresión de IL-15R α en la superficie de las células tumorales está directamente correlacionada a un fenotipo más maligno y la estimulación con IL-15 conlleva a un aumento significativo en la proliferación celular, la migración y la invasión, así como una disminución significativa de la apoptosis, esto debido a la activación de las vías de señalización STAT1, STAT3 y ERK1/2. Sin embargo, en presencia de células mononucleares de sangre periférica, la estimulación con IL-15 activa a las células mononucleares aumentando significativamente sus niveles de fosforilación de STAT5, lo que desencadena una respuesta antitumoral que conduce a la muerte de las células tumorales. Posiblemente dicha activación se deba a la transpresentación de IL-15/IL-15R α por parte de las células de cáncer gástrico a las células inmunológicas del microambiente tumoral que expresan el heterodímero IL-2/IL-15R $\beta\gamma_c$, lo que permite una mayor infiltración de las células inmunológicas en el tumor y favorece la eliminación de las células cancerígenas (Kobayashi et al., 2005; Wei et al., 2020).

Por lo tanto, la presencia de IL15/IL15R α podría ser un factor favorable en el cáncer ya que mediante la transpresentación se activaría 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 CHC (Easom et al., 2018). No obstante, si se inhibe 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, la señalización de IL-15-IL15R α 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).

Como parte de la señalización intracelular que desencadenan IL-2 e IL-15 al unirse con sus receptores se encuentra la activación de STAT3, una proteína perteneciente a la familia de transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT). Si bien se ha visto que STAT3 actúa de manera crítica en la organogénesis y la regeneración compensatoria del hígado, se ha observado también que está fuertemente implicado en la inducción y desarrollo del CHC. Se ha determinado que la activación de STAT3 es indispensable para la sobrevivencia y la capacidad invasiva de las células de CHC. Inclusive los tumores con mayores niveles de fosforilación de STAT3 son más agresivos ya que los pacientes tienen menor tasa de sobrevivencia. Coincidentemente, la activación de STAT3 se observa únicamente en las células tumorales y no en el tejido circundante o en hepatocitos sanos, por lo que se puede afirmar que STAT3 se encuentra activado en células tumorales debido a citocinas y factores de crecimiento producidos dentro del microambiente tumoral (G. He & Karin, 2011). En relación a esto la expresión de IL-6, una de las citocinas activadoras por excelencia de STAT3, se encuentra igualmente elevada en el CHC (Nakagawa et al., 2009; Shakiba et al., 2018; Wong et al., 2009). Por lo tanto, IL-2 e IL-15 podrían estar también contribuyendo en la activación de STAT3 en el CHC.

Se ha reportado que la expresión del IL-2R podría estar asociada a la presencia de los oncogenes virales E6 y E7 de VPH en las células de cáncer cervicouterino (Trujillo-Cirilo et al., 2021). Por lo que cabe resaltar que las células HepG2 están asociadas también a la infección del VPH y podrían servir como un modelo para estudiar la correlación entre la presencia de las proteínas E6 y E7 del VPH y la expresión de IL-2, IL-15 y sus receptores en el CHC. Incluso, se ha demostrado que la expresión de IL-15 puede ser activada tras una infección viral gracias a la presencia de una región inducible por virus en el promotor del gen de IL-15, en el que se unen

de manera cooperativa IRF-1 y NF- κ B para activar dicho promotor, como sucede con la activación de IFN- β (Azimi et al., 2000), por lo que la activación de la expresión de IL-15 puede ser un mecanismo de defensa antiviral de las células.

Mientras que la expresión de la subunidad IL-15R α es más ubicua, la expresión de la subunidad IL-2/IL-15R β está predominantemente restringida a las células hematopoyéticas (Anderson et al., 1995). Si bien la cadena IL-2R β es un componente necesario para la señalización proliferativa en células hematopoyéticas (Chae et al., 1996), estudios realizados en la línea celular T84 de carcinoma de colon muestran que IL-15 puede actuar de manera funcional sin necesidad de la subunidad IL-2/IL-15R β (Stevens et al., 1997), lo cual podría explicar la escasa expresión de esta subunidad por parte de las células HepG2. Si bien en este modelo de estudio dicha señalización no tuvo un papel proliferativo, si desencadenó otras respuestas fisiológicas como la formación de uniones estrechas intercelulares. Por lo que la actividad biológica de la IL-15 se extiende de las funciones en el sistema inmune y depende del tipo de célula sobre la que ejerza su efecto. Por ejemplo, en células musculares tienen una actividad anabólica al aumentar la acumulación de cadenas pesadas de miosina (Quinn et al., 1995). Dado esto, la presencia de IL-15 e IL-15R α en las células HepG2 podría estar desencadenando una señalización independiente de IL-2/IL-15R β que podría tener otros efectos fisiológicos más allá de la proliferación o evasión del sistema inmune.

Finalmente, en el caso de la subunidad γ_c , no solamente es compartida entre la IL-2 y la IL-15, sino también forma parte de los receptores de IL-4, IL-7, IL-9 e IL-21, de ahí la denominación de común (Liao et al., 2011). Por esto, la presencia de γ_c en las células HepG2, así como su significativa sobreexpresión observada en el CHC de acuerdo al análisis de RNA-seq, podría deberse a que se activen también señalizaciones producidas por algunas de las otras citocinas que comparten la subunidad γ_c , y no únicamente en respuesta a IL-2 e IL-15.

9. CONCLUSIONES

En las células HepG2 de CHC no se observa la expresión de IL-2, pero sí expresan las subunidades del IL-2R. En el análisis de RNA-Seq se revela una mayor expresión de la subunidad IL-2R α en biopsias de CHC con respecto a tejidos de hígado sano. Esto podría sugerir que las células de CHC podrían ser capaces de responder a la estimulación con IL-2 de manera paracrina o exógena.

Las células HepG2 tienen una alta expresión de IL-15 seguida de la subunidad IL-15R α . De acuerdo al análisis de RNA-Seq, en los tumores de CHC hay una mayor expresión de la subunidad IL-15R α en comparación a tejidos de hígado sano, y la alta expresión de esta subunidad se correlaciona significativamente con una menor probabilidad de sobrevivencia al CHC. Dado que es común que la IL-15 sea secretada unida en forma de complejo a la subunidad IL-15R α , entonces es posible que las células de CHC presenten el complejo IL-15/IL-15R α y les sirva como un mecanismo de proliferación autocrina o yuxtacrina mediante la transpresentación con células adyacentes que expresen el heterodímero IL-2/IL-15R $\beta\gamma_c$. Así mismo, se resalta que en este modelo de cáncer la señalización mediada por IL-15R α podría ser un mecanismo que contribuye considerablemente a la progresión o agresividad del tumor.

La expresión de la subunidad IL-2/IL-15R β es muy reducida en las células HepG2, por lo que las posibles funciones de la señalización IL-15 - IL-15R α podrían ejercerse de manera independiente de esta subunidad. Por el contrario, la subunidad γ_c se encuentra altamente expresada en las células HepG2, sin embargo, al ser una subunidad común su presencia se puede deber a la activación de vías de señalización desencadenadas por otras citocinas de las que forma parte de su receptor.

En general los resultados de este trabajo demuestran La IL-2, IL-15 y sus receptores pueden desempeñar un papel importante en el desarrollo del CHC; y la línea celular HepG2 puede ser un modelo de estudio adecuado para esclarecer su función. Así mismo, la subunidad IL-15R α podría sugerirse como un marcador en el CHC debido a que impacta significativamente en la sobrevivencia al CHC.

10. PERSPECTIVAS

Se requiere realizar estudios más específicos que permitan determinar las funciones que podrían ejercer la IL-2 y la IL-15 en las células de CHC, y con ello corroborar cada una de las conjeturas planteadas a lo largo de la discusión de este estudio. Para esto se plantean las siguientes perspectivas:

Para determinar si el IL-2R y el IL-15R presentes en las células HepG2 son funcionales se podría estimular a las células con IL-2 e IL-15 exógena para evaluar el aumento en la expresión de las subunidades de los receptores y la fosforilación de las moléculas implicadas en su señalización como son JAK1, JAK3, STAT3 y STAT5A/B.

Para demostrar si la IL-2 e IL-15 favorecen la proliferación, la migración o la inhibición de la apoptosis en las células de CHC igualmente se podría exponer a las células HepG2 con IL-2 e IL-15 exógena a diferentes concentraciones y realizar ensayos de cinética de proliferación celular, ensayos de cierre de herida, ensayos de invasividad y ensayos de resistencia a la inducción de apoptosis por agentes quimioterapéuticos.

Para confirmar que la presencia de la subunidad IL-15R α y la señalización de IL-15 mediada por esta subunidad desempeñan un papel determinante en el desarrollo y progresión del CHC se podrían realizar experimentos con las células HepG2 en los que se refleje el impacto en la proliferación y actividad metastásica tras exponer a las células a RNAs de interferencia o anticuerpos neutralizantes contra esta subunidad.

Por otra parte, se podría evaluar la posible inducción que ejercen las infecciones virales de VPH y VHB sobre la expresión de IL-2, IL-15 y sus respectivos receptores en las células HepG2, para lo que es necesario realizar ensayos de transfección y bloqueo de proteínas virales; y evaluar la modulación de la expresión de estas citocinas y sus receptores.

Finalmente, también se podría analizarse la interacción con otras citocinas, como la IL-6, en la regulación de las funciones que posiblemente estén ejerciendo IL-2 e IL-15 en las células HepG2.

La ampliación del estudio con otras líneas celulares de CHC es necesaria para contrastar los resultados observados en la línea celular HepG2.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Inmunología celular y molecular*. Elsevier.
- Amsen, D., Visser, K. E., & Town, T. (2009). *Approaches to Determine Expression of Inflammatory Cytokines* (pp. 107–142). https://doi.org/10.1007/978-1-59745-447-6_5
- Anderson, D. M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Valentine, V., Shapiro, D. N., Morris, S. W., Park, L. S., & Cosman, D. (1995). Functional Characterization of the Human Interleukin-15 Receptor α Chain and Close Linkage of IL15RA and IL2RA Genes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(50), 29862–29869. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.50.29862>
- Aravalli, R. N. (2013). Role of innate immunity in the development of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 19(43), 7500–7514. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i43.7500>
- Armitage, R. J., Macduff, B. M., Eisenman, J., Paxton, R., & Grabstein, K. H. (1995). IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 154(2), 483–490. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7814861>
- Azimi, N., Tagaya, Y., Mariner, J., & Waldmann, T. A. (2000). Viral Activation of Interleukin-15 (IL-15): Characterization of a Virus-Inducible Element in the IL-15 Promoter Region. *Journal of Virology*, 74(16), 7338–7348. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.16.7338-7348.2000>
- Barzegar, C., Meazza, R., Pereno, R., Pottin-Clemenceau, C., Scudeletti, M., Brouty-Boyé, D., Doucet, C., Taoufik, Y., Ritz, J., Musselli, C., Mishal, Z., Jasmin, C., Indiveri, F., Ferrini, S., & 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>
- Becknell, B., & Caligiuri, M. A. (2005). *Interleukin-2, Interleukin-15, and Their Roles in Human Natural Killer Cells* (pp. 209–239). [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(04\)86006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(04)86006-1)
- Berger, A., Colpitts, S. J., Seabrook, M. S. S., Furlonger, C. L., Bendix, M. B., Moreau, J. M., McKillop, W. M., Medin, J. A., & 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/10.1186/s40425-019-0777-8>
- Bessard, A., Solé, V., Bouchaud, G., Quémener, A., & Jacques, Y. (2009). High antitumor activity of RLI, an interleukin-15 (IL-15)–IL-15 receptor α fusion protein, in metastatic melanoma and colorectal cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(9), 2736–2745. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0275>
- Boyano, M. D., Garcia de Galdeano, A., Smith-Zubiaga, I., & Cañavate, M. L. (1997). IL-2 treatment of B16F10 melanoma cells stimulates metastatic colonization in the liver. *Anticancer Research*, 17(2A), 1135–1141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9137461>
- Budagian, V., Bulanova, E., Orinska, Z., Thon, L., Mamat, U., Bellosta, P., Basilico, C., Adam, D., Paus, R., & Bulfone-Paus, S. (2005). A promiscuous liaison between IL-15 receptor and Axl receptor tyrosine kinase in cell death control. *The EMBO Journal*, 24(24), 4260–4270. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600874>
- BUDAGIAN, V., BULANOVA, E., PAUS, R., & BULFONEPAUS, S. (2006). IL-15/IL-15 receptor biology: A guided tour through an expanding universe. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 17(4), 259–280. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.05.001>
- Budhu, A., Forgues, M., Ye, Q., Jia, H., He, P., Zanetti, K. A., Kammula, U. S., Chen, Y., Qin, L., Tang, Z., & Wang, X. W. (2006). *Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment*. August, 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.016>

- Budhu, A., & Wang, X. W. (2006). The role of cytokines in hepatocellular carcinoma. *Journal of Leukocyte Biology*, *80*(6), 1197–1213. <https://doi.org/10.1189/jlb.0506297>
- Bulfone-Paus, S., Ungureanu, D., Pohl, T., Lindner, G., Paus, R., Rückert, R., Krause, H., & Kunzendorf, U. (1997). Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. *Nature Medicine*, *3*(10), 1124–1128. <https://doi.org/10.1038/nm1097-1124>
- Burkett, P. R., Koka, R., Chien, M., Chai, S., Boone, D. L., & Ma, A. (2004). Coordinate Expression and Trans Presentation of Interleukin (IL)-15R α and IL-15 Supports Natural Killer Cell and Memory CD8+ T Cell Homeostasis. *Journal of Experimental Medicine*, *200*(7), 825–834. <https://doi.org/10.1084/jem.20041389>
- Burton, J. D., Bamford, R. N., Peters, C., Grant, A. J., Kurys, G., Goldman, C. K., Brennan, J., Roessler, E., & Waldmann, T. A. (1994). A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(11), 4935–4939. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.11.4935>
- Carson, W. E., Fehniger, T. A., Haldar, S., Eckhert, K., Lindemann, M. J., Lai, C. F., Croce, C. M., Baumann, H., & Caligiuri, M. A. (1997). A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *Journal of Clinical Investigation*, *99*(5), 937–943. <https://doi.org/10.1172/JCI119258>
- Carson, W. E., Giri, J. G., Lindemann, M. J., Linett, M. L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., & Caligiuri, M. A. (1994). Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *Journal of Experimental Medicine*, *180*(4), 1395–1403. <https://doi.org/10.1084/jem.180.4.1395>
- Cavallo, F., De Giovanni, C., Nanni, P., Forni, G., & Lollini, P. L. (2011). 2011: The immune hallmarks of cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *60*(3), 319–326. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>
- Chae, D. W., Nosaka, Y., Strom, T. B., & Maslinski, W. (1996). Distribution of IL-15 receptor alpha-chains on human peripheral blood mononuclear cells and effect of immunosuppressive drugs on receptor expression. *The Journal of Immunology*, *157*(7), 2813–2819. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.157.7.2813>
- Chomzynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis*, *30*(7), 1073–1081. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp127>
- Cook, K. D., Waggoner, S. N., & Whitmire, J. K. (2014). NK Cells and Their Ability to Modulate T Cells during Virus Infections. *Critical Reviews in Immunology*, *34*(5), 359–388. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2014010604>
- Costantini, S., Di Bernardo, G., Cammarota, M., Castello, G., & Colonna, G. (2013). Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene*, *518*(2), 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.106>
- De Visser, K. E., Eichten, A., & Coussens, L. M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*, *6*(1), 24–37. <https://doi.org/10.1038/nrc1782>
- Döbbeling, U., Dummer, R., Laine, E., Potoczna, N., Qin, J. Z., & Burg, G. (1998). Interleukin-15 is an autocrine/paracrine viability factor for cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood*, *92*(1), 252–258. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9639524>
- Dubois, S., Patel, H. J., Zhang, M., Waldmann, T. A., & Müller, J. R. (2008). Preassociation of IL-15 with IL-15R α -IgG1-Fc Enhances Its Activity on Proliferation of NK and

- CD8+/CD44high T Cells and Its Antitumor Action. *The Journal of Immunology*, 180(4), 2099–2106. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.4.2099>
- Dunn, C., Brunetto, M., Reynolds, G., Christophides, T., Kennedy, P. T., Lampertico, P., Das, A., Lopes, A. R., Borrow, P., Williams, K., Humphreys, E., Afford, S., Adams, D. H., Bertolotti, A., & Maini, M. K. (2007). Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *Journal of Experimental Medicine*, 204(3), 667–680. <https://doi.org/10.1084/jem.20061287>
- Easom, N. J. W., Stegmann, K. A., Swadling, L., Pallett, L. J., Burton, A. R., Odera, D., Schmidt, N., Huang, W. C., Fusai, G., Davidson, B., & Maini, M. K. (2018). IL-15 overcomes hepatocellular carcinoma-induced NK cell dysfunction. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01009>
- Epardaud, M., Elpek, K. G., Rubinstein, M. P., Yonekura, A., Bellemare-Pelletier, A., Bronson, R., Hamerman, J. A., Goldrath, A. W., & Turley, S. J. (2008). Interleukin-15/Interleukin-15R α Complexes Promote Destruction of Established Tumors by Reviving Tumor-Resident CD8+ T Cells. *Cancer Research*, 68(8), 2972–2983. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0045>
- Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001). Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*, 97(1), 14–32. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.1.14>
- Fehniger, T. A., Cooper, M. A., & Caligiuri, M. A. (2002). Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13(2), 169–183. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(01\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(01)00021-1)
- Forner, A., Reig, M., & Bruix, J. (2018). Hepatocellular carcinoma. *The Lancet*, 391(10127), 1301–1314. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30010-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30010-2)
- Foxwell, B. M. J., BARRETT, K., & FELDMANN, M. (1992). Cytokine receptors: structure and signal transduction. *Clinical and Experimental Immunology*, 90(2), 161–169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1992.tb07922.x>
- García-Tuñón, I., Ricote, M., Ruiz, A., Fraile, B., Paniagua, R., & Royuela, M. (2003). Interleukin-2 and its receptor complex (α , β and γ chains) in in situ and infiltrative human breast cancer: An immunohistochemical comparative study. *Breast Cancer Research*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/bcr730>
- Girard, D., Paquet, M., Paquin, R., & Beaulieu, A. (1996). Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood*, 88(8), 3176–3184. <https://doi.org/10.1182/blood.V88.8.3176.bloodjournal8883176>
- Giri, J. G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L. S., Cosman, D., & Anderson, D. (1994). Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *The EMBO Journal*, 13(12), 2822–2830. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06576.x>
- Giri, J. G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D. J., Loomis, A., Shanebeck, K., DuBose, R., Cosman, D., Park, L. S., & Anderson, D. M. (1995). Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *The EMBO Journal*, 14(15), 3654–3663. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00035.x>
- Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., & Mathieu, C. (2001). An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. *Methods*, 25(4), 386–401. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1261>
- Globocan 2018. (2018). Liver Cancer Global WHO Report. *Iarc*, 876, 2018–2019. <http://gco.iarc.fr/today>
- Goldman, M. J., Craft, B., Hastie, M., Repečka, K., McDade, F., Kamath, A., Banerjee, A., Luo, Y., Rogers, D., Brooks, A. N., Zhu, J., & Haussler, D. (2020). Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nature Biotechnology*, 38(6), 675–678.

<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0546-8>

- González-Aguirre, A. J., Casanova-Sánchez, I. E., Vilatobá-Chapa, M., Contreras-Saldivar, A., Castro-Narro, G., García-Juárez, I., & Huitzil-Meléndez, F. D. (2013). Carcinoma hepatocelular: diagnóstico y tratamiento. *Gaceta Mexicana de Oncología*, *12*(5), 334–343.
- Grabstein, K. H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M. A., Ahdieh, M., Johnson, L., Alderson, M. R., Watson, J. D., Anderson, D. M., & Giri, J. G. (1994). Cloning of a T Cell Growth Factor that Interacts with the β Chain of the Interleukin-2 Receptor. *Science*, *264*(5161), 965–968. <https://doi.org/10.1126/science.8178155>
- Greten, F. R., & Grivennikov, S. I. (2019). Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity*, *51*(1), 27–41. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2011). *Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. Cell. 2010;140(6):883–899. 140(6), 883–899.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>Immunity
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- He, G., & Karin, M. (2011). NF- κ B and STAT3 – key players in liver inflammation and cancer. *Cell Research*, *21*(1), 159–168. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.183>
- He, Y. G., Mayhew, E., Mellon, J., & Niederkorn, J. Y. (2004). Expression and possible function of IL-2 and IL-15 receptors on human uveal melanoma cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *45*(12), 4240–4246. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0599>
- Hu, Z., Luo, D., Wang, D., Ma, L., Zhao, 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*, *43*(6), 2379–2390. <https://doi.org/10.1159/000484390>
- Huntington, N. D., Legrand, N., Alves, N. L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., & Di Santo, J. P. (2009). IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, *206*(1), 25–34. <https://doi.org/10.1084/jem.20082013>
- Ikeguchi, M., & Hirooka, Y. (2005). Interleukin-2 gene expression is a new biological prognostic marker in hepatocellular carcinomas. *Onkologie*, *28*(5), 255–259. <https://doi.org/10.1159/000084695>
- Inagaki-Ohara, K., Nishimura, H., Mitani, A., & Yoshikai, Y. (1997). Interleukin-15 preferentially promotes the growth of intestinal intraepithelial lymphocytes bearing $\gamma\delta$ T cell receptor in mice. *European Journal of Immunology*, *27*(11), 2885–2891. <https://doi.org/10.1002/eji.1830271121>
- Jiang, W., Zhang, C., Tian, Z., & Zhang, J. (2014). Immunobiology hIL-15 gene-modified human natural killer cells (NKL-IL15) augments the anti-human hepatocellular carcinoma effect in vivo. *Immunobiology*, *219*(7), 547–553. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.03.007>
- Johnston, J. A., Bacon, C. M., Finbloom, D. S., Rees, R. C., Kaplan, D., Shibuya, K., Ortaldo, J. R., Gupta, S., Chen, Y. Q., Giri, J. D., & O’Shea, J. J. (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., & 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 (Baltimore, Md. : 1950)*, *158*(6), 2610–2615. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9058793>
- Kasprzak, A., Olejniczak, K., Przybyszewska, W., & Zabel, M. (2007). Cellular expression of interleukin 2 (IL-2) and its receptor (IL-2R, CD25) in lung tumours. *Folia Morphologica*,

66(3), 159–166.

- Khawam, K., Giron-Michel, J., Gu, Y., Perier, A., Giuliani, M., Caignard, A., Devocelle, A., Ferrini, S., Fabbì, M., Charpentier, B., Ludwig, A., Chouaib, S., Azzarone, B., & Eid, P. (2009). Human renal cancer cells express a novel membrane-bound interleukin-15 that induces, in response to the soluble interleukin-15 receptor α chain, epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Research*, *69*(4), 1561–1569. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3198>
- Kobayashi, H., Dubois, S., Sato, N., Sabzevari, H., Sakai, Y., Waldmann, T. A., & Tagaya, Y. (2005). Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood*, *105*(2), 721–727. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4187>
- Kuniyasu, H., Ohmori, H., Sasaki, T., Sasahira, T., Yoshida, K., Kitadai, 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*, *9*(13), 4802–4810.
- Lagunas-Cruz, M. D. C., Valle-Mendiola, A., Trejo-Huerta, J., Rocha-Zavaleta, L., Mora-García, M. D. L., Gutiérrez-Hoya, A., Weiss-Steider, B., & Soto-Cruz, I. (2019). IL-2 induces transient arrest in the G1 phase to protect cervical cancer cells from entering apoptosis. *Journal of Oncology*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7475295>
- Li, B., & Dewey, C. N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*, *12*(1), 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Ma, T., Su, Z., Chen, L., Liu, S., Zhu, N., Wen, L., Yuan, Y., Lv, L., Chen, X., Huang, J., & Chen, H. (2012). Human Papillomavirus Type 18 E6 and E7 Genes Integrate into Human Hepatoma Derived Cell Line Hep G2. *PLoS ONE*, *7*(5), e37964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037964>
- Mantovani, S., Oliviero, B., Varchetta, S., Mele, D., & Mondelli, M. U. (2020). Natural Killer Cell Responses in Hepatocellular Carcinoma: Implications for Novel Immunotherapeutic Approaches. *Cancers*, *12*(4), 926. <https://doi.org/10.3390/cancers12040926>
- Marks-Konczalik, J., Dubois, S., Losi, J. M., Sabzevari, H., Yamada, N., Feigenbaum, L., Waldmann, T. A., & Tagaya, Y. (2000). IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(21), 11445–11450. <https://doi.org/10.1073/pnas.200363097>
- Marra, P., Mathew, S., Grigoriadis, A., Wu, Y., Kyle-Cezar, F., Watkins, J., Rashid, M., De Rinaldis, E., Hessey, S., Gazinska, P., Hayday, A., & 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/10.1158/0008-5472.CAN-14-0637>
- Masuda, A., Matsuguchi, T., Yamaki, K., Hayakawa, T., & Yoshikai, Y. (2001). Interleukin-15 Prevents Mouse Mast Cell Apoptosis through STAT6-mediated Bcl-xL Expression. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(28), 26107–26113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011475200>
- Mishra, A., Sullivan, L., & Caligiuri, M. A. (2014). Molecular Pathways: Interleukin-15 Signaling in Health and in Cancer. *Clinical Cancer Research*, *20*(8), 2044–2050. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3603>
- Miyajima, A., Kitamura, T., Harada, N., Yokota, T., & Arai, K. (1992). Cytokine Receptors and Signal Transduction. *Annual Review of Immunology*, *10*(1), 295–331. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.10.040192.001455>

- Mortier, E., Quéméner, A., Vusio, P., Lorenzen, I., Boublik, Y., Grötzinger, J., Plet, A., & Jacques, Y. (2006). Soluble Interleukin-15 Receptor α (IL-15R α)-sushi as a Selective and Potent Agonist of IL-15 Action through IL-15R β/γ . *Journal of Biological Chemistry*, 281(3), 1612–1619. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508624200>
- Nakagawa, H., Maeda, S., Yoshida, H., Tateishi, R., Masuzaki, R., Ohki, T., Hayakawa, Y., Kinoshita, H., Yamakado, M., Kato, N., Shiina, S., & Omata, M. (2009). Serum IL-6 levels and the risk for hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients: An analysis based on gender differences. *International Journal of Cancer*, 125(10), 2264–2269. <https://doi.org/10.1002/ijc.24720>
- O'Farrelly, C., & Crispe, I. N. (1999). Prometheus through the looking glass: reflections on the hepatic immune system. *Immunology Today*, 20(9), 394–398. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(99\)01518-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(99)01518-2)
- Peppas, D., Gill, U. S., Reynolds, G., Easom, N. J. W., Pallett, L. J., Schurich, A., Micco, L., Nebbia, G., Singh, H. D., Adams, D. H., Kennedy, P. T. F., & Maini, M. K. (2013). Up-regulation of a death receptor renders antiviral T cells susceptible to NK cell-mediated deletion. *Journal of Experimental Medicine*, 210(1), 99–114. <https://doi.org/10.1084/jem.20121172>
- Pereno, R., Giron-Michel, J., Gaggero, A., Cazes, E., Meazza, R., Monetti, M., Monaco, E., Mishal, Z., Jasmin, C., Indiveri, F., Ferrini, S., & Azzarone, B. (2000). IL-15/IL-15R α intracellular trafficking in human melanoma cells and signal transduction through the IL-15R α . *Oncogene*, 19(45), 5153–5162. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203873>
- Quinn, L. S., Haugk, K. L., & Grabstein, K. H. (1995). Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology*, 136(8), 3669–3672. <https://doi.org/10.1210/endo.136.8.7628408>
- Rangel-Corona, R., Corona-Ortega, T., Soto-Cruz, I., López-Labra, A., Pablo-Arcos, T., Torres-Guarneros, C. F., & Weiss-Steider, B. (2010). Evidence that cervical cancer cells secrete IL-2, which becomes an autocrine growth factor. *Cytokine*, 50(3), 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2010.02.013>
- Ratthé, C., & Girard, D. (2004). Interleukin-15 enhances human neutrophil phagocytosis by a Syk-dependent mechanism: importance of the IL-15R α chain. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(1), 162–168. <https://doi.org/10.1189/jlb.0605298>
- Rautela, J., & Huntington, N. D. (2017). IL-15 signaling in NK cell cancer immunotherapy. *Current Opinion in Immunology*, 44, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.10.004>
- Reichert, T. E., Nagashima, S., Kashii, Y., Stanson, J., Gao, G., Dou, Q. P., & Whiteside, T. L. (2000). Interleukin-2 expression in human carcinoma cell lines and its role in cell cycle progression. *Oncogene*, 19(4), 514–525. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203391>
- Rocha-Zavaleta, L., Huitron, C., Cacéres-Cortés, J. R., Alvarado-Moreno, J. A., Valle-Mendiola, A., Soto-Cruz, I., Weiss-Steider, B., & 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>
- Sachdeva, M., Chawla, Y. K., & Arora, S. K. (2015). *Immunology of hepatocellular carcinoma*. 7(17), 2080–2090. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i17.2080>
- Santana Carrero, R. M., Beceren-Braun, F., Rivas, S. C., Hegde, S. M., Gangadharan, A., Plote, D., Pham, G., Anthony, S. M., & 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*, 116(2), 599–608. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814642116>
- Schreiber, R. D., Old, L. J., & Smyth, M. J. (2011). Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331(6024), 1565–1570. <https://doi.org/10.1126/science.1203486>

- Screpanti, V., Wallin, R. P. A., Ljunggren, H.-G., & 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/10.4049/jimmunol.167.4.2068>
- Shakiba, E., Ramezani, M., & 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/10.5114/ceh.2018.78122>
- Smith, G. A., Taunton, J., & Weiss, A. (2017). IL-2R β abundance differentially tunes IL-2 signaling dynamics in CD4 + and CD8 + T cells. *Science Signaling*, 10(510). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aan4931>
- Steel, J. C., Waldmann, T. A., & Morris, J. C. (2012). Interleukin-15 biology and its therapeutic implications in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.09.004>
- Stevens, A. C., Matthews, J., Andres, P., Baffis, V., Zheng, X. X., Chae, D. W., Smith, J., Strom, T. B., & Maslinski, W. (1997). Interleukin-15 signals T84 colonic epithelial cells in the absence of the interleukin-2 receptor beta-chain. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 272(5), G1201–G1208. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1997.272.5.G1201>
- Stoklasek, T. A., Schluns, K. S., & Lefrançois, L. (2006). Combined IL-15/IL-15R α Immunotherapy Maximizes IL-15 Activity In Vivo. *The Journal of Immunology*, 177(9), 6072–6080. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.6072>
- Stonier, S. W., & Schluns, K. S. (2010). Trans-presentation: A novel mechanism regulating IL-15 delivery and responses. *Immunology Letters*, 127(2), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.09.009>
- Sun, B., & Karin, M. (2013). Inflammation and liver tumorigenesis. *Frontiers of Medicine*, 7(2), 242–254. <https://doi.org/10.1007/s11684-013-0256-4>
- Tao, Q., Huang, H., Chai, Y., Luo, X., Zhang, X., Jia, B., & Zhang, S. (2012). Interleukin-6 up-regulates the expression of interleukin-15 is associated with MAPKs and PI3-K signaling pathways in the human keratinocyte cell line, HaCaT. *Molecular Biology Reports*, 39(4), 4201–4205. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1205-4>
- Tinhofer, I., Marschitz, I., Henn, T., Egle, A., & 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., Zambello, R., Bulian, P., Cerutti, A., Milani, A., Pirone, E., Nitti, D., Agostini, C., & Semenzato, G. (1994). Functional role of IL-2 receptors on tumour-infiltrating lymphocytes. *British Journal of Cancer*, 69(6), 1046–1051. <https://doi.org/10.1038/bjc.1994.206>
- Trujillo-Cirilo, L., Torres-Corioriles, E. I., Rangel-Corona, R., Corona-Ortega, M. T., & 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(November 2020), 155592. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2021.155592>
- Uribe-Esquivel, M., García Sáenz de Sicilia, M., Chávez Tapia, N., & Román Sandoval, J. de J. (2010). Carcinoma hepatocelular. *Revista de Gastroenterología de México*, 2(75), 168–176.
- Valle-Mendiola, A., Gutiérrez-Hoya, A., Lagunas-Cruz, M. D. C., Weiss-Steider, B., & Soto-Cruz, I. (2016). Pleiotropic Effects of IL-2 on Cancer: Its Role in Cervical Cancer. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2849523>
- Valle-Mendiola, A., Weiss-Steider, B., Rocha-Zavaleta, L., & Soto-Cruz, I. (2014). IL-2 enhances cervical cancer cells proliferation and JAK3/STAT5 phosphorylation at low doses, while at high doses IL-2 has opposite effects. *Cancer Investigation*, 32(4), 115–125. <https://doi.org/10.3109/07357907.2014.883526>

- Van den Bergh, J. M., Lion, E., Van Tendeloo, V. F., & Smits, E. L. (2017). IL-15 receptor alpha as the magic wand to boost the success of IL-15 antitumor therapies: The upswing of IL-15 transpresentation. *Pharmacology & Therapeutics*, *170*, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.10.012>
- Waickman, A. T., Ligons, D. L., Hwang, S., Park, J.-Y., Lazarevic, V., Sato, N., Hong, C., & Park, J.-H. (2017). CD4 effector T cell differentiation is controlled by IL-15 that is expressed and presented in trans. *Cytokine*, *99*, 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.08.004>
- Waldmann, T. A. (2015). The Shared and Contrasting Roles of IL2 and IL15 in the Life and Death of Normal and Neoplastic Lymphocytes: Implications for Cancer Therapy. *Cancer Immunology Research*, *3*(3), 219–227. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0009>
- Waldmann, Thomas A. (1989). THE MULTI-SUBUNIT INTERLEUKIN-2 RECEPTOR. *Annual Review of Biochemistry*, *58*(1), 875–905. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.004303>
- Waldmann, Thomas A. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: Implications for cancer therapy and vaccine design. *Nature Reviews Immunology*, *6*(8), 595–601. <https://doi.org/10.1038/nri1901>
- Waldmann, Thomas A., Miljkovic, M. D., & Conlon, K. C. (2020). Interleukin-15 (dys)regulation of lymphoid homeostasis: Implications for therapy of autoimmunity and cancer. *Journal of Experimental Medicine*, *217*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1084/jem.20191062>
- Waldmann, Thomas A. (2014). Interleukin-15 in the treatment of cancer. *Expert Review of Clinical Immunology*, *10*(12), 1689–1701. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.973856>
- Wang, X., Rickert, M., & Garcia, K. C. (2005). Structural biology: Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its α , β and γ c receptors. *Science*, *310*(5751), 1159–1163. <https://doi.org/10.1126/science.1117893>
- Watkinson, F., Nayar, S. K., Rani, A., Sakellariou, C. A., Elhage, O., Papaevangelou, E., Dasgupta, P., & 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/10.3389/fimmu.2020.594620>
- Wei, J., Guo, C., An, X., Miao, W., Zhang, C., Wang, B., Cai, W., Li, M., & 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/10.1007/s13402-020-00542-4>
- Whiteside, T. L. (2008). The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, *27*(45), 5904–5912. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.271>
- Wilkinson, P. C., & Liew, F. Y. (1995). Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *Journal of Experimental Medicine*, *181*(3), 1255–1259. <https://doi.org/10.1084/jem.181.3.1255>
- Wong, V. W.-S., Yu, J., Cheng, A. S.-L., Wong, G. L.-H., Chan, H.-Y., Chu, E. S.-H., Ng, E. K.-O., Chan, F. K.-L., Sung, J. J.-Y., & Chan, H. L.-Y. (2009). High serum interleukin-6 level predicts future hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis B. *International Journal of Cancer*, *124*(12), 2766–2770. <https://doi.org/10.1002/ijc.24281>
- Woo, H. G., Park, E. S., Cheon, J. H., Kim, J. H., Lee, J. S., Park, B. J., Kim, W., Park, S. C., Chung, Y. J., Kim, B. G., Yoon, J. H., Lee, H. S., Kim, C. Y., Yi, N. J., Suh, K. S., Lee, K. U., Chu, I. S., Roskams, T., Thorgeirsson, S. S., & Kim, Y. J. (2008). Gene expression-based recurrence prediction of hepatitis B virus-related human hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research*, *14*(7), 2056–2064. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1473>
- Yamada, Y., Sugawara, K., Hata, T., Tsuruta, K., Moriuchi, R., Maeda, T., Atogami, S., Murata, K., Fujimoto, K., Kohno, T., Tsukasaki, K., Tomonaga, M., Hirakata, Y., & Kamihira, S.

- (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. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9596675>
- Yamaji, K., Nabeshima, S., Murata, M., Chong, Y., Furusyo, N., Ikematsu, H., & Hayashi, J. (2006). Interferon- α/β upregulate IL-15 expression in vitro and in vivo: analysis in human hepatocellular carcinoma cell lines and in chronic hepatitis C patients during interferon- α/β treatment. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, *55*(4), 394–403. <https://doi.org/10.1007/s00262-005-0005-x>
- Yasumura, S., Lin, W. -C, Weidmann, E., Hebda, P., & Whiteside, T. L. (1994). Expression of interleukin 2 receptors on human carcinoma cell lines and tumor growth inhibition by interleukin 2. *International Journal of Cancer*, *59*(2), 225–234. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910590215>
- Yu, L.-X., Ling, Y., & Wang, H.-Y. (2018). Role of nonresolving inflammation in hepatocellular carcinoma development and progression. *Npj Precision Oncology*, *2*(1). <https://doi.org/10.1038/s41698-018-0048-z>
- Zanoni, I., Spreafico, R., Bodio, C., DiGioia, M., Cigni, C., Broggi, A., Gorletta, T., Caccia, M., Chirico, G., Sironi, L., Collini, M., Colombo, M. P., Garbi, N., & Granucci, F. (2013). IL-15 cis Presentation Is Required for Optimal NK Cell Activation in Lipopolysaccharide-Mediated Inflammatory Conditions. *Cell Reports*, *4*(6), 1235–1249. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.021>
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., & Sprent, J. (1998). Potent and Selective Stimulation of Memory-Phenotype CD8+ T Cells In Vivo by IL-15. *Immunity*, *8*(5), 591–599. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80564-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80564-6)
- Zhou, H., Huang, H., Shi, J., Zhao, Y., Dong, Q., Jia, H., Liu, Y., Ye, Q., Sun, H., Zhu, X., Fu, L., Guo, K., Gao, D., Sun, J., Yan, Z., Ren, N., Tang, Z., & Qin, L. (2010). Prognostic value of interleukin 2 and interleukin 15 in peritumoral hepatic tissues for patients with hepatitis B-related hepatocellular carcinoma after curative resection. *Gut*, *59*(12), 1699–1708. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.218404>
- Zhuang, L., Fulton, R. J., Rettman, P., Sayan, A. E., Coad, J., Al-Shamkhani, A., & Khakoo, S. I. (2019). Activity of IL-12/15/18 primed natural killer cells against hepatocellular carcinoma. *Hepatology International*, *13*(1), 75–83. <https://doi.org/10.1007/s12072-018-9909-3>
- Zola, H., Fusco, M., Macardle, P. J., Flego, L., & Robertson, D. (1995). Expression of Cytokine Receptors by Human Cord Blood Lymphocytes: Comparison with Adult Blood Lymphocytes. *Pediatric Research*, *38*(3), 397–403. <https://doi.org/10.1203/00006450-199509000-00021>