



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

**DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y
PATOGENESIS MOLECULAR**

**“Participación de IL-17A/IL-17RA en el
desarrollo tumoral en un modelo murino de
cáncer de ovario”**

T E S I S

Que presenta

M. en C. María Elena Sánchez Bello

Para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias
en Infectómica y Patogénesis Molecular**

Directoras de tesis:

**Dra. Patricia Talamás Rohana
Dra. Yevel Flores García**

Ciudad de México

Agosto, 2023

DEDICATORIAS

A dios

Por todas las bendiciones que me ha dado en la vida, por darle salud a lo que más amo en esta vida, mi hijo Leonardo, mi esposo y toda mi familia. Gracias por siempre enfocar nuestros esfuerzos.

A mi familia

A mi esposo Irving por todo tu apoyo y amor, por ser mi soporte en los momentos difíciles y por ser un padre excelente con nuestro hijo. Sin duda hace 12 años tomamos la mejor decisión al unir nuestras vidas y metas, te amo mi vida.

A mi hijo Leonardo por ser mi motor de vida. Dejarte 6 meses para hacer la estancia fue lo más difícil que hice, pero recuerda que tú eres mi mayor impulso para lograr esta meta y sé que en unos años estarás orgulloso de tu mamá.

A mis padres María Elena Bello y José Luis Sánchez

Por su apoyo tan incondicional que me han dado en la vida. Siempre estaré agradecida por su ayuda desde que decidimos tener a Leo, son los mejores abuelos y padres. Créanme que hicieron un excelente trabajo con sus tres hijos y todo ese amor se les será retribuido.

A mis hermanos Miguel Ángel y José Luis

En cada paso de este camino, su apoyo ha sido mi fuerza. Esta tesis refleja la importancia de nuestros lazos familiares y la pasión por el conocimiento. Gracias por ser mis cómplices en el crecimiento y el logro.

A mis sobrinas Nayeli, Fernanda, Yoali y Sarita

Por ser la alegría de nuestra familia, por todo su amor y amar tanto a su primo Leo. Siempre serán parte importante de mi vida y estaré para apoyarlas cuando me necesiten.

AGRADECIMIENTOS

Al Cinvestav

Por brindarme el entorno propicio para desarrollar mis estudios de posgrado. Su compromiso con la excelencia académica y la investigación que enriqueció mi camino y contribuyó significativamente a esta tesis.

Al Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

Por ser un departamento de excelencia académica, con un enfoque de convivencia muy integrador y de mucho apoyo. Agradezco todos los consejos y cariño al colegio de profesores.

A la Dra. Patricia Talamás Rohana

Por todo su apoyo en mi carrera profesional, por confiar en mí para realizar mi doctorado en su laboratorio y por permitirme generar una línea de investigación diferente a las del laboratorio. Le agradezco ser una guía para nosotros, por todos sus consejos académicos y personales, y por valorar mi desempeño de manera individual y reconocer mis logros.

A la Dra. Yewel Flores García

Le agradezco por confiar en mí y el apoyo que me brindó para la realización de este proyecto. Por la oportunidad de realizar una estancia de investigación en *Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University* para superar los retos que sufrió mi proyecto a consecuencia de la pandemia, lo que me permitió concluir este proyecto. Sé que puedo confiar en ti y obtener tu ayuda cuando la necesite. Te aprecio mucho.

Al Dr. Fidel P. Zavala

Por recibirnos en su laboratorio y poder realizar la estancia de investigación en *Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University* proporcionándonos

todos los recursos para la realización de este proyecto. Le agradezco su apoyo en el siguiente paso de mi carrera científica.

A mis asesores, la **Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano**, el **Dr. Marco A. Vega López**, el **Dr. José Luis Rosales Encina**, el **Dr. José Eduardo Pérez Salazar** y la **Dra. Laura C. Bonifaz Alfonzo**, por sus comentarios y todas las recomendaciones que me proporcionaron a lo largo de este proyecto, siempre brindándome la oportunidad de mejorar mi trabajo.

A los auxiliares de laboratorio, la **Dra. Verónica Ivonne Hernández Ramírez** y el **M. en C. Juan Carlos Osorio Trujillo**, por todo su apoyo para la realización de los experimentos, su paciencia e interés por discutir mis resultados y escucharnos cuando necesitamos de sus consejos.

A mis compañeros de laboratorio, por todos sus consejos y apoyo

Al Fondo SEP-Cinvestav

Por el financiamiento otorgado para la realización de la primera parte de este proyecto, a través del proyecto 194 de la Dra. Patricia Talamás Rohana.

Al programa de becas Elisa Acuña-Cinvestav

Por el otorgamiento de becas para apoyar de manera parcial la realización de mi estancia de investigación en *Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University* y los apoyos extraordinarios para la finalización de mi doctorado.

Al Conahcyt

Por el financiamiento otorgado a través de la beca 780755 a lo largo de 4 años del doctorado. Gracias por impulsar la ciencia en nuestro país México.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Arid5a	Proteína que contiene un dominio interactivo rico en AT 5a
ATP	Trifosfato de adenosina
BbsI	Enzima de restricción con sitio de corte GAAGAC(2/6)
BRCA	Gen de cáncer de mama
C/EBP	Proteína de unión al potenciador CCAAT
CaOv	Cáncer de ovario
CBAD	Dominio de activación a C/EBP beta
CCL2	Ligando de quimiocinas 2
Células NK	Células natural killer (células asesinas naturales)
Células T $\gamma\delta$	Células T gamma delta
CFSE	Éster de succinimidil-carboxifluoresceína
CO ₂	Dióxido de carbono
COE	Cáncer de ovario epitelial
CRISPR-Cas9	Endonucleasa 9 asociada a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y espaciadas-regularmente
CXCL10	Ligando de quimiocinas motivo C-X-C 10
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DDX3X	DEAD-Box Helicase 3 X-Linked
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK1/2	Cinasa regulada por señales extracelulares
FABP4	Proteína de unión a ácidos grasos 4
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HRP	Peroxidasa de rábano
HuR	Proteína de antígeno humano R
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
ID8dv-Luc	Células ID8-Defb29 Vegf-Luciferasa

IgG	Inmunoglobulina G
IL-17A	Interleucina-17A
IL-17RA	Receptor A de interleucina 17
ITS	Insulina-transferrina-selenio
LA	Líquido ascítico
Luc	Luciferasa
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MMP1	Metaloproteinasa de matriz 1
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
PBS	Buffer fosfato salino
PE	Ficoeritrina
RIPA	Tampón de ensayo de radioinmunoprecipitación
RNA	Ácido ribonucleico
SEFEX	Dominio extendido SEFIR de activación a C/EBP beta
SEFIR	Dominio de homología SEF/IL-17R/CIKS/ACT1
SFB	Suero fetal bovino
sgRNA	ARN guía
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TBS-T	Buffer salino tamponado con Tris con Tween 20
TGF- β	Factor de crecimiento beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF6	Factor asociado a receptor de TNF 6
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1
Vía i.p.	Vía de inoculación intraperitoneal
Vía s.c.	Vía de inoculación subcutánea
WT	Silvestre
WT1	Proteína del tumor de Wilms 1

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUCCIÓN	13
<i>Generalidades del cáncer de ovario.....</i>	<i>13</i>
<i>Microambiente tumoral.....</i>	<i>14</i>
<i>Relación entre la inflamación crónica y el cáncer de ovario</i>	<i>16</i>
<i>Familia de citocinas IL-17 y sus receptores.....</i>	<i>18</i>
<i>Funciones indirectas y directas de la IL-17 en cáncer</i>	<i>23</i>
<i>Funciones de IL-17A en cáncer de ovario.....</i>	<i>25</i>
<i>Modelo murino de cáncer de ovario</i>	<i>26</i>
JUSTIFICACIÓN.....	30
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS.....	31
<i>Objetivo general.....</i>	<i>31</i>
<i>Objetivos específicos.....</i>	<i>31</i>
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
<i>Líneas celulares</i>	<i>32</i>
<i>Ratones.....</i>	<i>32</i>
<i>Western blot</i>	<i>32</i>
<i>Citometría de flujo.....</i>	<i>33</i>
<i>Ensayo de proliferación CFSE.....</i>	<i>34</i>
<i>Ensayo de quimiorresistencia</i>	<i>35</i>
<i>Ensayo de migración celular en cámaras Transwell.....</i>	<i>35</i>
<i>Generación de células ID8-Defb29 Vegf-Luc modificadas en IL-17RA mediante CRISPR-Cas9 .</i>	<i>36</i>
<i>Inmunofluorescencia</i>	<i>37</i>
<i>Modelo tumoral intraperitoneal singénico y monitoreo del crecimiento tumoral mediante bioluminiscencia por imagenología</i>	<i>37</i>
<i>Análisis estadístico</i>	<i>38</i>
RESULTADOS.....	39
<i>Las células murinas ID8 de CaOv expresan IL-17RA y son sensibles a la estimulación con IL-17A recombinante, activando a ERK1/2.</i>	<i>39</i>
<i>IL-17 no tiene efecto sobre la proliferación de las células ID8</i>	<i>43</i>

<i>IL-17 promueve una mayor susceptibilidad a carboplatino en células ID8</i>	45
<i>La IL-17 reduce la migración de células ID8.....</i>	46
<i>El IL-17RA se requiere para el desarrollo tumoral y la producción de ascitis en el modelo murino de células ID8dv-Luc.....</i>	48
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIÓN	57
PERSPECTIVAS.....	57
BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes celulares y factores solubles en el microambiente tumoral.	15
Figura 2. Mediadores inflamatorios que contribuyen a la progresión, metástasis y angiogénesis en cáncer de ovario epitelial.....	18
Figura 3. Familia de citocinas de IL-17 y sus receptores.....	20
Figura 4. Esquema representativo de los dominios del gen IL-17RA de humano.	22
Figura 5. Vías de señalización del receptor IL-17R.	23
Figura 6. Función de IL-17 en la progresión tumoral.	25
Figura 7. La IL-17A promueve una mayor captación de ácidos grasos en CaOv.	26
Figura 8. Formación de ascitis en ratones C57BL/6 inmunocompetentes con inoculación ortotópica de células ID8 parentales.	28
Figura 9. Seguimiento del desarrollo tumoral del modelo murino de células ID8-Defb29 Vegf-Luc mediante 2D y 3D IVIS.	29
Figura 10. Expresión relativa de mRNA de los genes IL-17RA, RB, RC, RD y RE en células ID8.....	39
Figura 11. Expresión a nivel de proteína de IL-17RA en células ID8.	40
Figura 12. Expresión de IL-7RA en células derivadas de ascitis.....	41
Figura 13. Activación de ERK1/2 en respuesta a IL-17A en células ID8.	43
Figura 14. Efecto de IL-17A, F y A/F sobre la proliferación de células ID8.	44
Figura 15. Efecto de IL-17A, F y A/F sobre la quimioresistencia a carboplatino de células ID8.....	46
Figura 16. Efecto de las citocinas IL-17A, F y A/F sobre la migración de células ID8.	47
Figura 17. Diseño y clonación de sgRNA contra el gen IL17RA de ratón.	49
Figura 18. Expresión de IL-17RA en células ID8dv-Luc WT y modificadas en IL-17RA (Δ IL-17RA).....	50
Figura 19. Activación de ERK1/2 en células ID8dv-Luc WT y Δ IL-17RA estimuladas con IL-17A.	51
Figura 20. Desarrollo tumoral in vivo de células ID8dv-Luc WT y Δ IL-17RA.	52

Figura 21. Medición del diámetro abdominal sagital y análisis de supervivencia Kaplan-Meier durante el desarrollo tumoral in vivo de células ID8dv-Luc WT y Δ IL-17RA. 53

RESUMEN

La IL-17A es una citocina pleiotrópica involucrada en la inflamación, la autoinmunidad y el cáncer. Esta citocina es producida por varias poblaciones inmunológicas en varios tipos de cáncer y se ha asociado tanto con funciones antitumorales como protumorales. Se ha descrito que señala a través del complejo de receptores IL-17RA y RC, los cuales se expresan en varios linajes celulares, incluyendo células tumorales de ovario. A la fecha se han realizado varios estudios que demuestran el papel de la IL-17A en modelos de cáncer *in vitro* e *in vivo*; sin embargo, la función del receptor IL-17RA sigue siendo poco estudiada. En este proyecto, utilizando el modelo murino singénico inmunocompetente de células ID8 de cáncer de ovario, encontramos que la estimulación con las citocinas ligando IL-17A, F y A/F en forma homodimérica o heterodimérica, no produjeron un efecto significativo en la proliferación celular, pero sí un efecto antitumoral en la quimioresistencia y migración de las células ID8 *in vitro*. Sin embargo, *in vivo*, la deficiencia del receptor IL-17RA indujo un retraso en el desarrollo tumoral, y también se observó un retraso en la formación de ascitis debido a una reducción en la activación de las cinasas ERK1/2, lo que aumentó en la supervivencia global de los ratones y sugiere que el IL-17RA es necesario para el desarrollo tumoral. En general, demostramos que IL-17RA promueve la tumorigénesis en un modelo murino de células ID8 de cáncer de ovario.

ABSTRACT

IL-17A is a pleiotropic cytokine involved in inflammation, autoimmunity, and cancer. This cytokine is produced by various immune cell populations in multiple types of cancer and has been associated with both anti-tumor and pro-tumoral functions. It signals through the IL-17RA and RC receptor complexes, which are expressed in various cell lineages, including ovarian tumor cells. To date, several studies have demonstrated the role of IL-17A in *in vitro* and *in vivo* cancer models; however, the function of the IL-17RA receptor remains poorly studied. In this project, using the immunocompetent syngeneic murine model of ID8 ovarian cancer cells, we found that stimulation with the ligand cytokines IL-17A, F, and A/F in homodimeric or heterodimeric form, did not produce a significant effect on cell proliferation, but did produce an antitumor effect on ID8 cells chemoresistance and migration *in vitro*. However, *in vivo*, IL-17RA receptor deficiency induced a delay in tumor development, and a delay in ascites formation due to a reduction in ERK1/2 kinase activation, leading to an increase in the overall survival of mice, suggesting that IL-17RA is required for tumor development. Overall, we demonstrate that IL-17RA promotes tumorigenesis in a murine model of ID8 ovarian cancer cells.

INTRODUCCIÓN

Generalidades del cáncer de ovario

El cáncer de ovario (CaOv) es considerado uno de los cánceres ginecológicos más comunes, el cual se diagnostica en etapas avanzadas debido a la falta de síntomas específicos durante las etapas iniciales. En México, el CaOv ocupa el tercer lugar de incidencia entre los tumores ginecológicos (después de cáncer de mama y el cervicouterino), reportándose 4963 casos nuevos al año y en términos de mortalidad se estima que cada año se producen alrededor de 3038 muertes relacionadas con esta enfermedad (<https://gco.iarc.fr/today/home>, GLOBOCAN, 2020).

Alrededor del 47.4% de las mujeres fallece dentro de los primeros 5 años tras el diagnóstico, ya que se presenta en estadios avanzados (III y IV) de la enfermedad. La mayoría de los casos se diagnostican en mujeres de entre 40 y 59 años, aunque también existe un número considerable de casos en mujeres menores de 30 años (1).

La edad se destaca como el factor de mayor riesgo para desarrollar CaOv, con una prevalencia del 80% en mujeres postmenopáusicas. Otros factores de riesgo relacionados con hormonas abarcan la menarca temprana, la menopausia tardía, la nuliparidad, el uso de terapia de remplazo hormonal, la infertilidad, el síndrome de ovario poliquístico y la endometriosis. Además, se han descrito factores de riesgo no hormonales como el tabaquismo, una dieta rica en grasas y el sobrepeso (2,3). Además de los factores mencionados previamente, también se debe tener en cuenta el factor de riesgo genético, que implica un patrón hereditario donde dos miembros de la familia en línea directa presentan cáncer de mama y ovario. Si además se comprueba la presencia de mutaciones en los BRCA 1 o BRCA 2, el riesgo de desarrollar CaOv aumenta entre 35-45% y 15-25%, respectivamente (2). Existen diferentes tipos de cáncer de ovario, agrupados según el tipo de célula del que procedan; 1) células epiteliales, que representan del 85 al 95% de los casos en mujeres mayores de 50 años, 2) células estromales, que causan del 5 al 8% de los casos en mujeres de todas las edades, y 3) células germinales, que causan de 3 a 5% de los casos en mujeres jóvenes de 15 a 19 años (4).

Microambiente tumoral

El microambiente tumoral consta de varios tipos de células adyacentes al tumor que liberan citosinas o factores de crecimiento que promueven la progresión tumoral, la diseminación del cáncer y la evasión de la respuesta inmune (5). Particularmente, el líquido ascítico (LA) puede servir como microambiente en diversas patologías. La ascitis es una acumulación excesiva de líquido en la cavidad abdominal y se presenta con diversas patologías, como: cirrosis hepática (81% de los casos), insuficiencia cardíaca (3%), tuberculosis (2%) y neoplasias malignas (10%). Sin embargo, la composición del LA depende de la enfermedad con la que se asocia. El principal tipo de cáncer asociados a la formación de ascitis es el CaOv en un 38% de los casos (6).

La presencia de ascitis es un indicador de enfermedad avanzada y de mal pronóstico, ya que solo el 11% de los pacientes sobreviven más de 6 meses. En el cáncer de ovario epitelial (COE) la mayoría de las pacientes en etapas avanzadas (etapa III o etapa IV) pueden desarrollar ascitis; sin embargo, se considera un factor pronóstico independiente para el tiempo de recaída, lo que sugiere que su presencia no está limitada a un subtipo histológico específico (7). La acumulación de líquido en la cavidad abdominopélvica debido a la ascitis causa molestias como dolor, saciedad temprana y afecciones en el sistema respiratorio, gastrointestinal y urinario (6).

En el COE, el LA funciona como un microambiente tumoral debido a la presencia de componentes celulares y factores solubles que contribuyen a la progresión tumoral, metástasis y evasión inmune. Entre las células presentes en el LA se encuentran las tumorales, células NK, fibroblastos, adipocitos, células mesoteliales, macrófagos y células T. Todas ellas liberan diversas citocinas, entre las que se encuentran la IL-6, el TGF- β , el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (5). Asimismo, podemos encontrar células Th17, las cuales se asocian con la inflamación, la progresión tumoral y la respuesta inmune alterada. La presencia de factores solubles tales como IL-6 y TGF- β en el LA puede influir en el reclutamiento y activación de las células Th17 en

el microambiente tumoral, las cuales secretan IL-17 (8). De los factores solubles descritos que se encuentran en el LA, se han identificado varios genes blanco de la vía de señalización de IL-17 como son IL-6, IL-8, TNF- α , VEGF, CCL2, CXCL10 y GM-CSF (9,10).

La IL-6 y el TGF- β han sido implicados en procesos de proliferación celular, invasión y metástasis en CaOv. Estas citocinas pueden promover la transición epitelio-mesénquima (TEM, por sus siglas en inglés), un proceso mediante el cual las células tumorales adquieren características más invasivas y metastásicas, permitiéndoles diseminarse a otros tejidos (11,12).

La IL-8, el EGF y el VEGF son factores que están relacionados con la angiogénesis en CaOv, el cual es un proceso crucial para la acumulación de ascitis en la cavidad abdominopélvica de las pacientes con CaOv (6) (Figura 1).

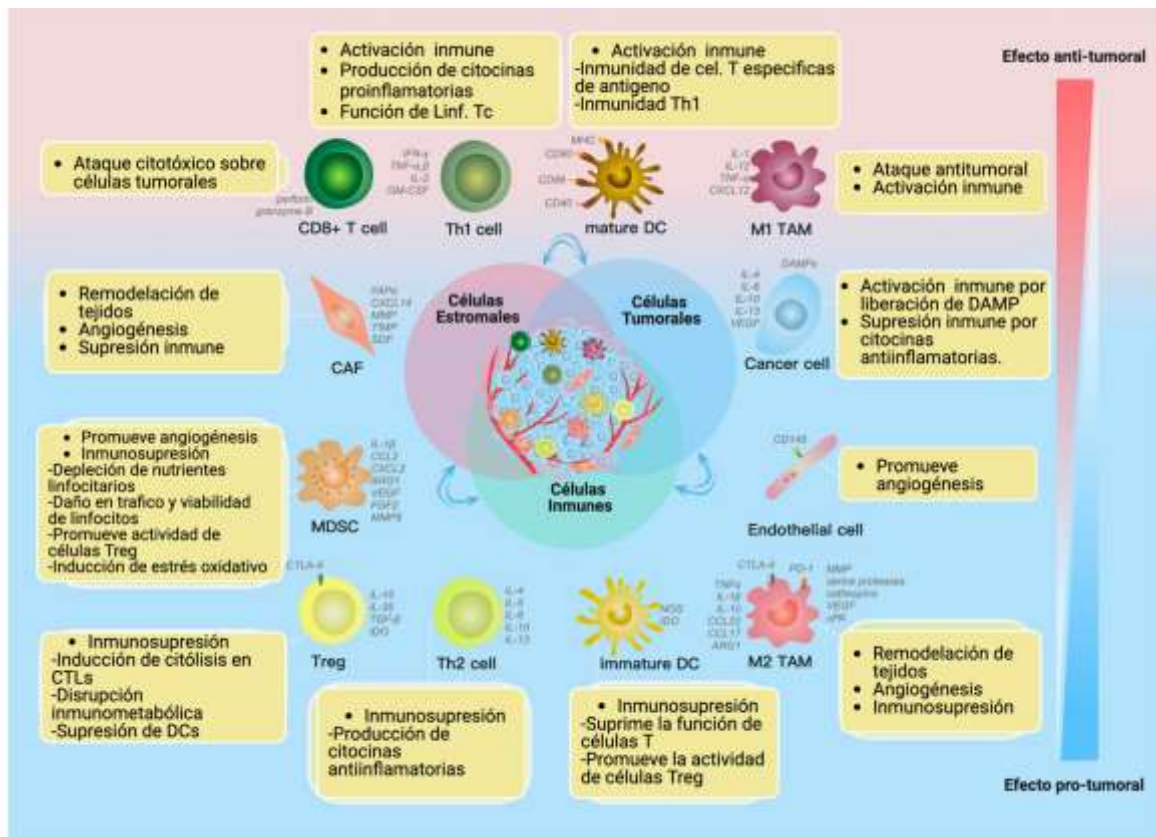


Figura 1. Componentes celulares y factores solubles en el microambiente tumoral.

Tomado de Yang, *et al* 2020 (13).

Relación entre la inflamación crónica y el cáncer de ovario

La inflamación desempeña un papel fundamental en el desarrollo y progresión del cáncer. Numerosos estudios han demostrado la estrecha relación entre la inflamación crónica y la carcinogénesis, así como la promoción de metástasis tumorales (14).

El CaOv se origina principalmente en el epitelio de la superficie ovárica. Debido a la ubicación específica de las células epiteliales ováricas en la cavidad peritoneal, están expuestas de manera distintiva a varios factores proinflamatorios. Existen diversas fuentes de este tipo de inflamación. Se ha descrito que la ovulación en sí misma es un proceso potencialmente inflamatorio y mutagénico. Durante la ovulación, las células epiteliales en las inmediaciones del folículo ovárico experimentan una proliferación, destrucción y apoptosis, lo que provoca la ruptura de la pared del folículo y su posterior remodelación y reparación. Se cree que esta secuencia de eventos causa estrés oxidativo debido al aumento de factores proinflamatorios como citocinas, interleucinas, factores de crecimiento, prostaglandinas y eicosanoides. Otro factor que relaciona la ovulación, la inflamación, el crecimiento y la propagación del tumor es la actividad de las colagenasas, enzimas que destruyen la matriz extracelular. Los ciclos repetidos de daño y reparación celular en un entorno altamente oxidativo favorecen errores durante la replicación del ADN. En pacientes con CaOv, el peritoneo, que cubre la mayoría de los órganos intraabdominales, muestra manifestaciones macroscópicas típicas de inflamación como hinchazón, enrojecimiento, aumento de la densidad de los vasos sanguíneos, adherencias o acumulación de ascitis. Esto implica que la inflamación crónica puede desempeñar un papel en la iniciación y progresión del CaOv. La presencia de células inflamatorias, la secreción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, así como la activación de vías de señalización inflamatorias en las células tumorales, pueden contribuir a la proliferación celular descontrolada, la angiogénesis, la invasión, la metástasis, la resistencia a la terapia y la evasión del sistema inmunológico (15).

El infiltrado de células inmunológicas en el tumor contribuye de manera importante al microambiente tumoral al interactuar con las células tumorales. Entre las diversas

citocinas producidas por estas poblaciones de células inmunológicas, se destaca la IL-17. Particularmente la IL-17A desempeña un papel importante en la inflamación, la autoinmunidad y el cáncer. Esta citocina, producida principalmente por células del sistema inmunológico, ha sido ampliamente estudiada debido a su capacidad para regular la respuesta inflamatoria y modular la respuesta inmune en diversas enfermedades.

En el contexto de la inflamación, la IL-17A juega un papel clave en la respuesta inmune frente a los patógenos y la protección de las barreras epiteliales. Se ha demostrado que la IL-17 estimula la producción de otras citocinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, lo que amplifica la respuesta inflamatoria local. Además, induce la producción de quimiocinas que reclutan células inflamatorias al sitio de la lesión o infección.

Con relación a la autoinmunidad, la IL-17A ha sido implicada en la patogénesis de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y la psoriasis. Se ha observado que la IL-17 promueve la inflamación crónica y la destrucción de tejidos en estas enfermedades y su bloqueo terapéutico ha demostrado ser eficaz en el control de los síntomas en algunos casos (16,17).

En el cáncer, la IL-17A desempeña un papel contradictorio. Se ha descrito que la IL-17 puede tener efectos tanto pro-tumorales como anti-tumorales. Por un lado, puede estimular la proliferación, la sobrevivencia y la invasión de las células tumorales, promoviendo así el crecimiento y la progresión del cáncer. Por otro lado, puede contribuir a la eliminación de células tumorales al reclutar células citotóxicas del sistema inmunológico y activar respuestas inmunes antitumorales (18).

La complejidad de la función de IL-17 en la inflamación, la autoinmunidad y el cáncer sugiere que su regulación y su papel específico dependen del contexto y las interacciones con otras moléculas y células del sistema inmunológico (Figura 2).

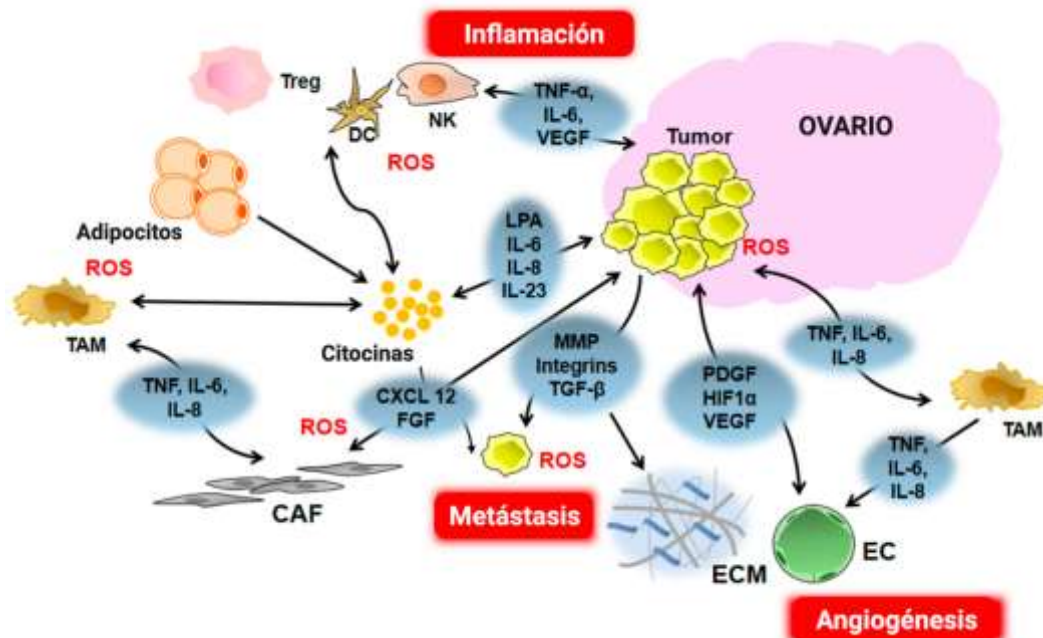


Figura 2. Mediadores inflamatorios que contribuyen a la progresión, metástasis y angiogénesis en cáncer de ovario epitelial.

Tomado de Savant, *et al*, 2018 (19)

Familia de citocinas IL-17 y sus receptores

a) Las IL-17

La IL-17A, el primer miembro descrito de esta familia de citocinas y el más estudiado, fue clonada por primera vez en 1993 y nombrada inicialmente como antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos 8 (CTLA-8, por sus siglas en inglés) (20). La familia de citocinas de la IL-17 está compuesta por 6 miembros que incluyen a IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (también conocida como IL-25) e IL-17F. Estas citocinas constituyen un grupo de proteínas secretadas y glicosiladas, que presentan una homología en su secuencia del 20-55 % con la IL-17A, siendo la IL-17E la que presenta menor homología con otros miembros de la familia (21,22). La IL-17A y la IL-17F pueden formar homodímeros o heterodímeros y se expresan conjuntamente por genes vinculados (23). Estructuralmente, las proteínas de la familia IL-17 tienen un extremo C-terminal conservado con cuatro residuos de cisteína, que forman puentes disulfuro intramoleculares (24,25).

Las citocinas de la familia de la IL-17 son producidas por células del sistema inmune, como linfocitos T CD4+ (Th17), linfocitos T CD8+ (Tc17), células natural killer (NK), células T $\gamma\delta$, células linfoides innatas grupo 3 (ILC3), neutrófilos, microglía y células cebadas. Otras fuentes principales de IL-17 incluyen a las células mieloides en riñón, pulmón y las células de Paneth en las criptas intestinales (24,26).

b) Receptores de IL-17

Esta familia de citocinas se une a cinco miembros de la familia de receptores, de la IL-17RA a la IL-17RE, expresados en células blanco de la IL-17, para realizar sus funciones biológicas. Los IL-17R se expresan en una variedad de poblaciones celulares, incluyendo queratinocitos, fibroblastos, células mesoteliales, células epiteliales y leucocitos (22). Cada uno de estos receptores puede formar complejos de señalización específicos con diversas combinaciones de subunidades. El receptor primario para la IL-17A, la citocina más estudiada de la familia IL-17, es el IL-17RA. La IL-17A se une a IL-17RA, lo que desencadena la activación de diversas vías de señalización intracelular. Esta interacción con IL-17RA también puede ocurrir en combinación con otros miembros de receptores, como IL-17RC (24).

El heterodímero IL-17A/IL-17C señala a través del complejo de receptores IL-17RA/IL-17RC, activando varias vías de señalización, incluyendo las de NF- κ B, MAPK y C/EBP (27–29) (Figura 3). Estas vías de señalización inducen la expresión de diversos genes blanco, entre los que se encuentran aquellos involucrados en la producción de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α), quimiocinas (CXCL10, CXCL2, CXCL5, CCL2, CCL20), moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1), factores de crecimiento y angiogénesis (VEGF, GM-CSF, G-CSF) y proteínas de remodelación tisular (MMP1, MMP2, MMP3, MMP13) (30).

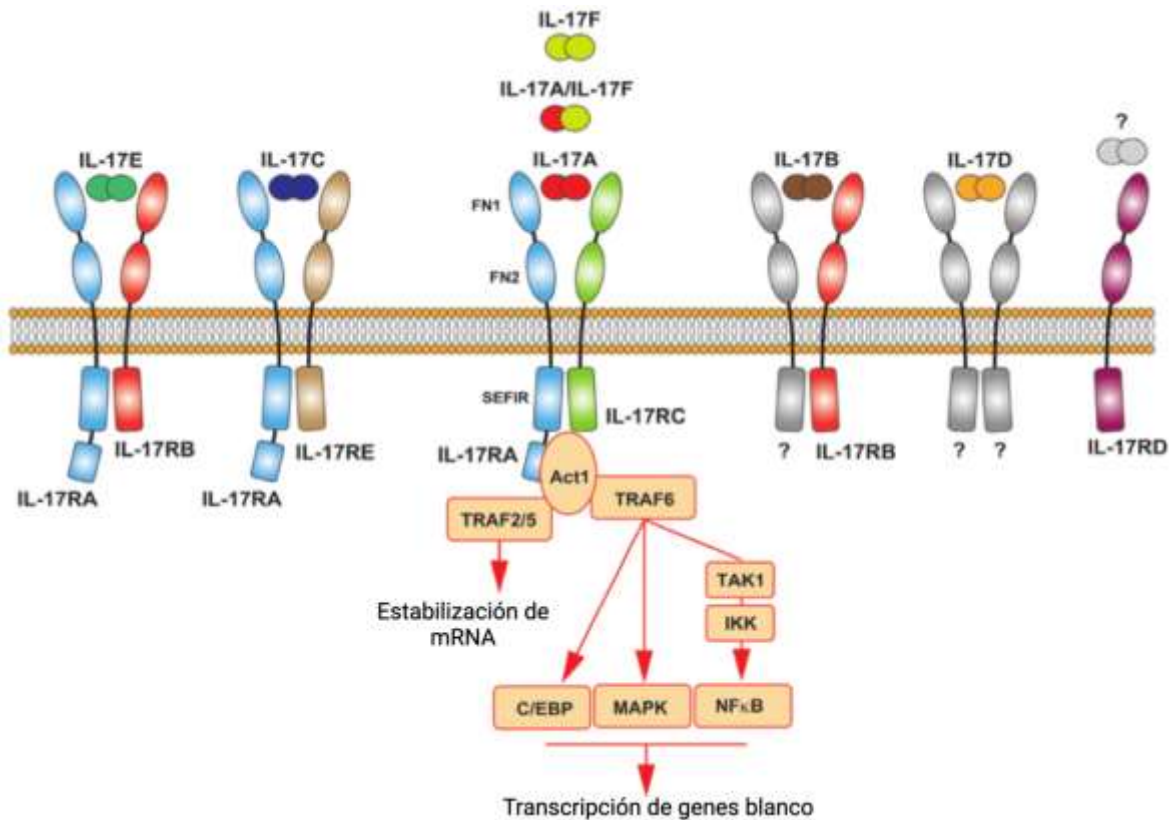


Figura 3. Familia de citocinas de IL-17 y sus receptores.

Tomado de Brembilla, *et al*, 2018 (31).

En general, todos los miembros de la familia de receptores IL-17R son moléculas de un solo pase transmembranal con características estructurales conservadas (32). Específicamente contienen dos dominios extracelulares tipo-fibronectina III, un dominio citoplásmico conservado llamado SEFIR/SEFEX, un dominio en el extremo C-terminal de SEFIR llamado TILL (loop tipo-TIR, por sus siglas en inglés) y un dominio de activación de C/EBP β llamado CBAD (33,34) (Figura 4).

Los dominios tipo-fibronectina III son una región estructural del receptor IL-17RA involucrada en la interacción proteína-proteína. Este dominio se encuentra en la región extracelular del receptor y se compone de una estructura plegada que se asemeja a un módulo de fibronectina. Esta estructura tridimensional permite que el dominio interactúe específicamente con la IL-17 y desencadene la activación de las vías de señalización NF- κ B y MAPK (35).

El dominio SEFIR/SEFEX, también conocido como dominio tipo-TIR (Toll/interleukin-1 receptor like), comparte similitudes estructurales con el dominio TIR presente en los receptores de la IL-1 y en los tipo Toll (TLRs). Este dominio permite la interacción para reclutar y activar proteínas adaptadoras como es Act1 (Activador de transcripción 1), causando la formación de un complejo de activación de las vías de señalización NF- κ B y MAPKs (36,37).

Los dominios SEFIR carecen de ciertos elementos presentes en los TIR, lo que impide su interacción con adaptadores-TIR. Sin embargo, en el receptor IL-17RA, se identificó un dominio llamado TILL que muestra similitud con el loop-BB presente en los dominios TIR. Esta región es crucial para la función de IL-17RA y se cree que puede interactuar con una molécula de señalización aún desconocida. A diferencia de otros receptores de la IL-17, el dominio TILL es exclusivo de IL-17RA, lo que podría explicar por qué IL-17RA actúa como una subunidad compartida por varios receptores en la familia de IL-17 (36,38).

El dominio CBAD tiene la función de activar el factor de transcripción C/EBP β (C/CAAT *Enhancer-Binding Protein beta*). Este dominio es necesario para la fosforilación inducible mediada por IL-17A de C/EBP β en la treonina 179, que está mediada por la glucógeno sintasa cinasa 3 β (GSK3 β) (33).

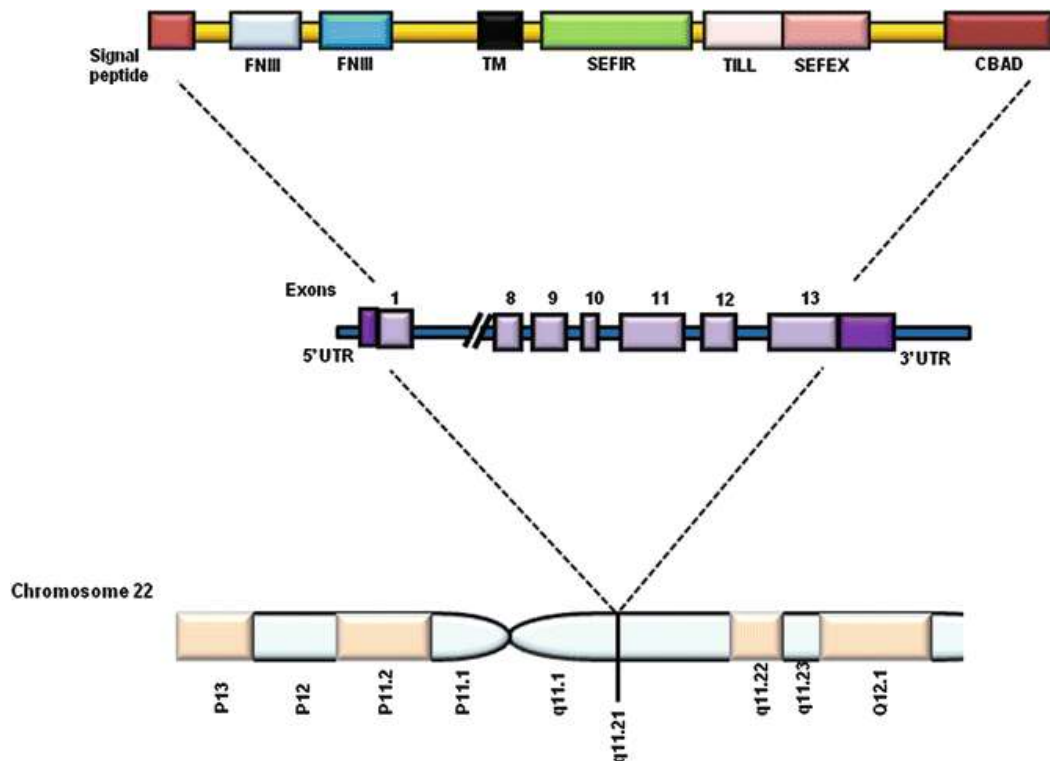


Figura 4. Esquema representativo de los dominios del gen del receptor IL-17RA de humano.

Tomado de Mojsilović, 2018 (39).

Inicialmente, la señalización del receptor de IL-17 activa el reclutamiento de Act1, una proteína adaptadora multifuncional, a través de interacciones SEFIR-SEFIR necesarios para su interacción. Posteriormente, Act1 puede ubiquitinar a TRAF6 y a la ligasa de ubiquitina E3. Tras la unión del ligando, Act1 puede interactuar con TRAF2/5, TRAF4 y TRAF6 y estabilizar los mRNA al activar proteínas de unión a RNA como son Arid5a, HuR y DDX3X (24) (Figura 5).

Es importante destacar que la señalización de IL-17 no es exclusiva de una célula específica. Esto permite que la IL-17 ejerza sus efectos en una amplia gama de células y tejidos, contribuyendo así a la regulación de respuestas inflamatorias, autoinmunes y tumorales. Esto sugiere que los efectos descritos de IL-17 asociados a cáncer pueden ser una consecuencia tanto de funciones indirectas como directas (18).

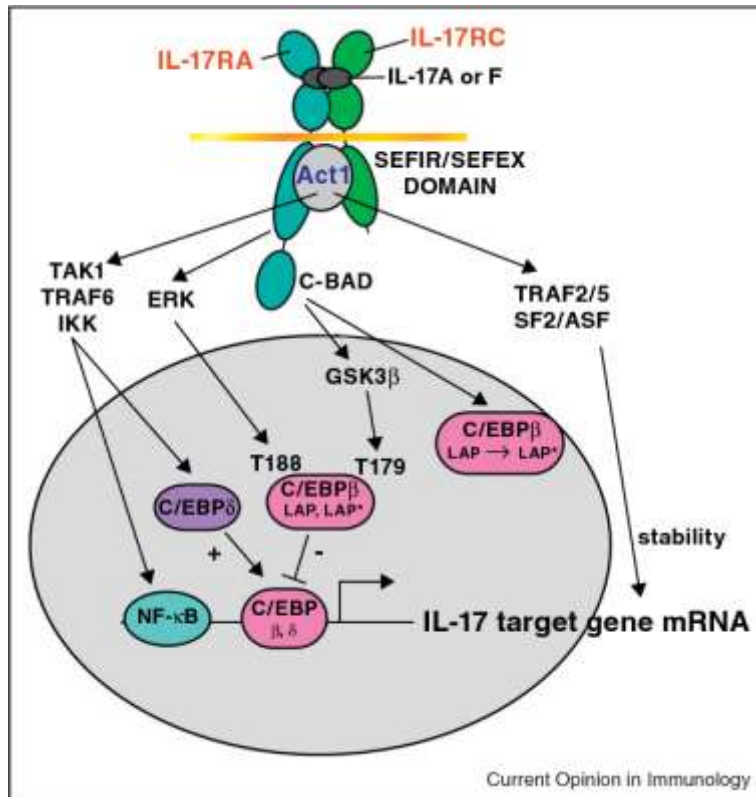


Figura 5. Vías de señalización del receptor IL-17R.

El complejo del receptor está formado por IL-17RA e IL-17RC; se muestran las principales vías de señalización activadas por este receptor. Tomado de Gaffen, 2011 (40).

Funciones indirectas y directas de la IL-17 en cáncer

Dentro de las funciones indirectas de la IL-17 en cáncer, se ha observado que esta citocina desencadena respuestas inflamatorias en el microambiente tumoral. Estas respuestas pueden tener efectos protumorales por la inflamación crónica inducida por la IL-17 que puede favorecer la proliferación y la supervivencia de las células tumorales, así como la angiogénesis y la invasión de tejidos circundantes. Esto se debe a la capacidad de IL-17 para estimular la producción de citocinas proinflamatorias, como el TNF- α y la IL-6, que pueden contribuir al crecimiento y progresión de los tumores (41). Asimismo, entre los efectos antitumorales tenemos respuestas inmunitarias mediadas por células, en donde la IL-17 estimula la producción de quimiocinas, como CCL20, que atraen células inmunitarias, como los

linfocitos T citotóxicos y las células *naturales killer* (NK), al sitio del tumor, ejerciendo una respuesta antitumoral al eliminar las células tumorales. Además, la IL-17 puede activar respuestas inmunitarias adaptativas, como la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T CD8+ y CD4+, lo que contribuye a la respuesta antitumoral (42).

En cuanto a las funciones directas de la IL-17 en cáncer, se ha observado que esta citocina puede tener efectos tanto protumorales como antitumorales, dependiendo del tipo de cáncer y del microambiente tumoral específico. Por ejemplo, en cáncer de pulmón, la IL-17 promueve la inflamación crónica y la progresión tumoral al estimular la producción de factores de crecimiento y enzimas de degradación de la matriz extracelular por las células tumorales (43). Sin embargo, en cáncer colorrectal, la IL-17 promueve el reclutamiento de neutrófilos antitumorales en el tumor, lo cual estimula una respuesta de células T y se correlaciona con una mejor supervivencia global (44). Además de estos efectos, la IL-17 estimula una mayor invasión de las células de cáncer de mama (45), promueve metástasis a través de la expresión de MMPs en hepatocarcinoma (46), exacerba la inflamación en condiciones de hiperinsulinemia y obesidad promoviendo el desarrollo del cáncer de próstata (47) e induce mayor proliferación y tumorigénesis en cáncer de células escamosas (48) (Figura 6).

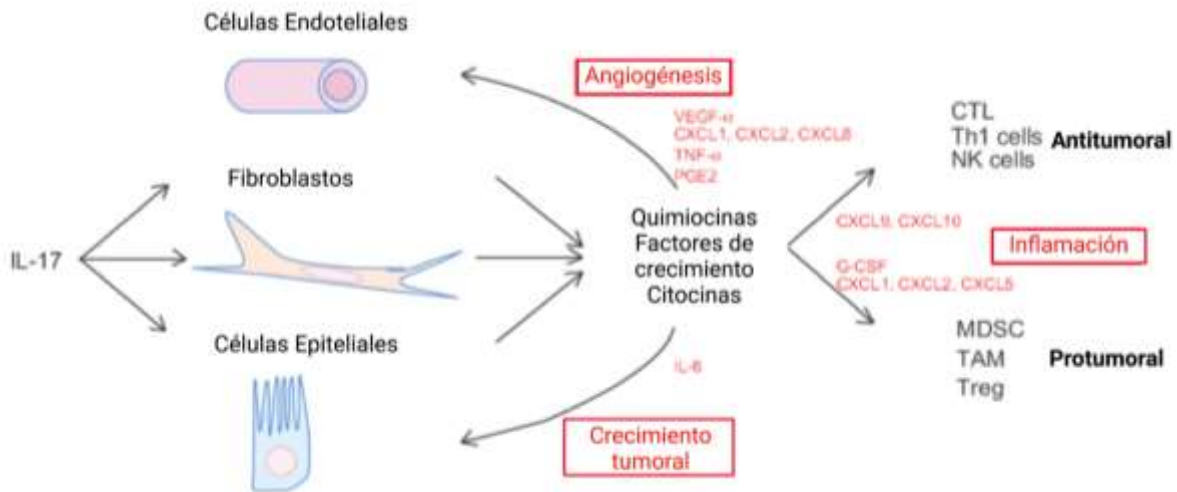


Figura 6. Función de IL-17 en la progresión tumoral.

Tomado de Llosa, *et al*, 2014 (49).

Funciones de IL-17A en cáncer de ovario

En muestras de pacientes con CaOv, se ha observado que hay una expresión elevada del mRNA de IL-17, fenómeno que promueve la angiogénesis tumoral (50), y que a su vez se correlaciona con etapas clínicas avanzadas y el grado de diferenciación (51). Además, la infiltración de células productoras de IL-17 contribuye a una mayor supervivencia libre de progresión en pacientes con CaOv epitelial avanzado (52). Por otra parte, se sabe que IL-17A promueve la autorrenovación de las células madre tumorales CD133+ contribuyendo al crecimiento tumoral, metástasis y resistencia a fármacos (53).

El grupo de Rei y cols, (2014) describieron que las células Tγδ CD27(-) Vγ6(+) productoras de IL-17A desempeñan un papel importante en el crecimiento del CaOv al movilizar macrófagos peritoneales pequeños con un fenotipo tipo-M2 protumorales (54); mientras que Yu y cols, (2020) encontraron que la IL-17A promueve la captación de ácidos grasos a través del eje IL-17A/IL-17RA/p-STAT3/FABP4 para proporcionar energía para el crecimiento del CaOv en un microambiente rico en adipocitos, destacando el posible papel metabólico de IL-17A en el desarrollo tumoral (55) (Figura 7).

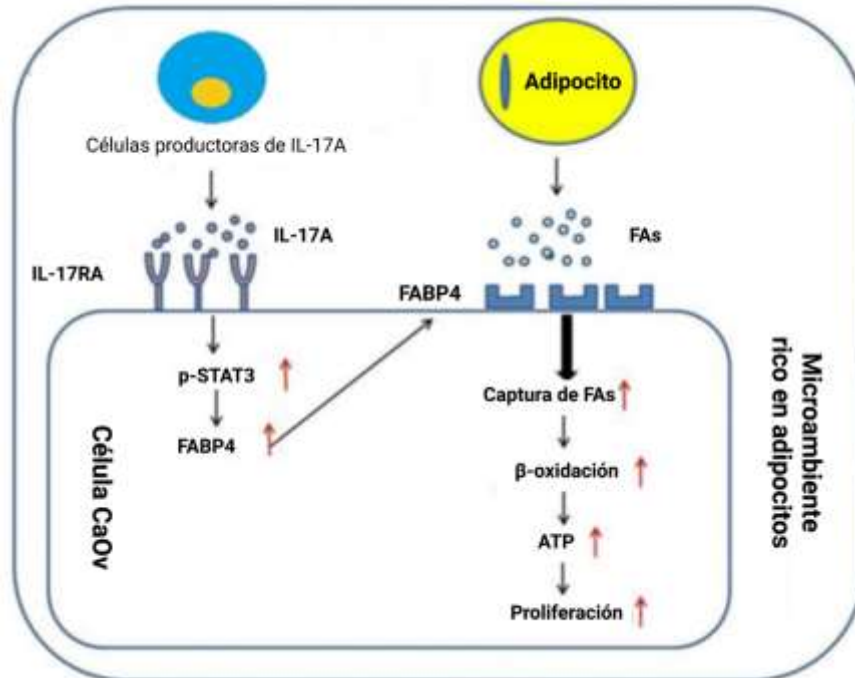


Figura 7. La IL-17A promueve una mayor captación de ácidos grasos en CaOv.

En un microambiente rico en adipocitos las células productoras de IL-17 inducen la expresión de FABP4 (proteína de unión a ácidos grasos 4) a través de la vía p-STAT3. Los ácidos grasos producidos por los adipocitos son transportados por FABP4 y después utilizados como fuente de energía para la producción de ATP. Tomado de Yu, *et al*, 2020 (55).

Aunque varios estudios han demostrado el papel de la IL-17A en el desarrollo del cáncer, utilizando modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, algunos de ellos utilizando modelos murinos deficientes en IL-17A, se sabe poco sobre el papel de IL-17A directamente en las células tumorales enfocándose en el estudio del receptor IL-17RA.

Modelo murino de cáncer de ovario

El estudio del CaOv ha sido posible gracias al uso de modelos de trasplantes de tumores humanos en ratones atímicos, xenoinjertos y líneas celulares tumorales que se inoculan por vía subcutánea o intraperitoneal. Sin embargo, dichos modelos no se asemejan a lo que sucede en el humano. Por esta razón, en la última década

se desarrolló un modelo que utiliza células epiteliales de la superficie ovárica de ratón (MOSE, por sus siglas en inglés) que sufrieron una transformación después de 20 pases *in vitro*. Estas células fueron inoculadas por vía subcutánea (s.c.) e intraperitoneal (i.p.) en ratones C57BL/6 inmunocompetentes y en ratones Nu/Nu atímicos y singénicos, observando que mediante la vía s.c. la formación de tumores después de 4 meses exclusivamente en el sitio de inoculación; mientras que en los ratones inoculados por vía i.p. se observó la formación de implantes tumorales en la cavidad peritoneal, así como la producción de ascitis hemorrágica. La capacidad de estas células para formar tumores en animales con un sistema inmune intacto proporciona un modelo en el cual las interacciones en el establecimiento, progresión y tratamiento del CaOv pueden investigarse de una mejor manera (56).

Una de las líneas clonales que mayor carga tumoral presentó en el estudio anterior fue la línea celular ID8. La inoculación ortotópica de células ID8 en la corteza ovárica de ratones C57BL/6 mediante escisión quirúrgica, mostró un crecimiento significativo del tumor después de las 8 semanas de inoculación y un aumento de 16 veces más el peso y 7 veces más el volumen del tumor a las 12 semanas postinoculación. Asimismo, se observó que los ratones generaron metástasis en la cavidad peritoneal e implantes tumorales en peritoneo, estómago, hígado, bazo, intestino y el ovario inoculado (57) (Figura 8).

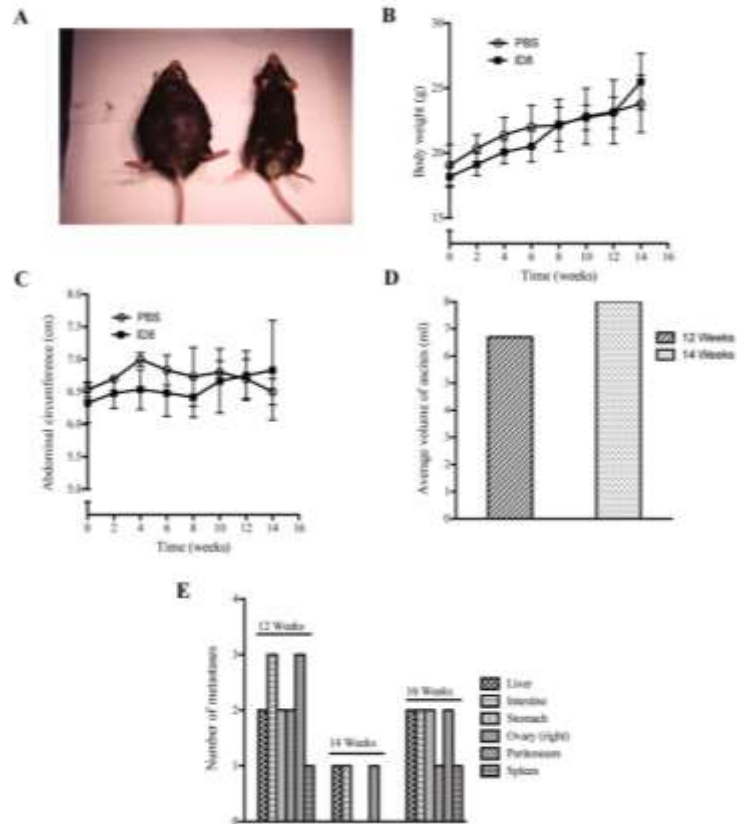


Figura 8. Formación de ascitis en ratones C57BL/6 inmunocompetentes con inoculación ortotópica de células ID8 parentales.

A) Imagen representativa de un ratón inmunocompetente C57BL/6 inyectado ortotópicamente con células ID8 mostrando formación de ascitis (animal de la izquierda) y de un ratón control inyectado con PBS (animal de la derecha). B y C) Cambios en función del tiempo del peso corporal y la circunferencia abdominal de ratones con tumor y control. D) Muestras de ascitis obtenidas de ratones tras 12 y 14 semanas de crecimiento tumoral. E) Cuantificación y localización de lesiones metastásicas en hígado y epiplón tras 12 semanas postinoculación. Tomado de Cho, *et al*, 2013 (57).

A pesar de lo útil que ha resultado el modelo murino de CaOv utilizando células ID8 para el estudio del sistema inmunológico durante la progresión de la enfermedad, las células ID8 de este modelo no tienen las mutaciones características del subtipo histológico seroso de alto grado, el cual es el más común en las pacientes con CaOv.

Con el fin de mejorar este modelo, una de las primeras modificaciones que se hicieron a las células ID8 fue la expresión estable de la β -defensina 29 (Defb29) y Vegf-A, lo que dio lugar a las células ID8-Defb29/Vegf-A. Defb29 es un péptido

antimicrobiano que pertenece a la familia de las β -defensinas, el cual al sobreexpresarse en células ID8 tumorales conduce al reclutamiento de precursores de células dendríticas (DCs, por sus siglas en inglés) protumorales, que contribuyen con el proceso de vasculogénesis dentro del microambiente tumoral. Estos precursores de DCs en presencia del factor angiogénico Vegf-A, promueven la formación de vasos sanguíneos, favoreciendo así el crecimiento tumoral y convirtiéndose en un modelo con un fenotipo más agresivo y con supervivencia reducida (7 semanas) en comparación con el modelo de células ID8 parentales (12-14 semanas) (58) (Figura 9).

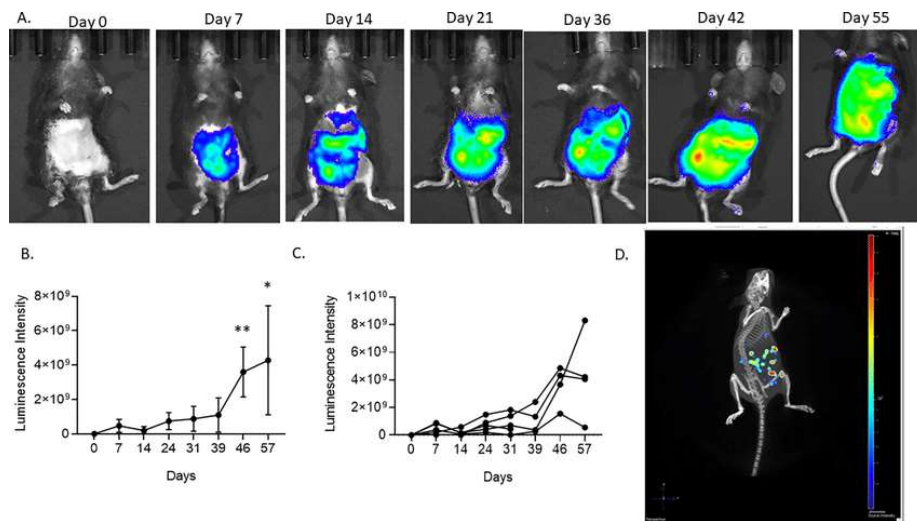


Figura 9. Seguimiento del desarrollo tumoral del modelo murino de células ID8-Defb29 Vegf-Luc mediante 2D y 3D IVIS.

Desarrollo de CaOv en 7 semanas. Tomado de Chambers, *et al*, 2020 (59).

JUSTIFICACIÓN

La IL-17 es una citocina proinflamatoria que se expresa de forma ubicua en diversos tejidos y células normales, incluso en células tumorales.

Se ha demostrado que IL-17 podría desempeñar un papel oncogénico al inhibir la apoptosis de células tumorales, alterar las respuestas antitumorales, promover la angiogénesis, la metástasis y la invasión en distintos tipos de cáncer.

En pacientes con CaOv la expresión de IL-17 en tejido tumoral se ha asociado con una mayor angiogénesis; y en los modelos murinos se ha demostrado que la IL-17 también tiene un papel protumoral, debido a que promueve el reclutamiento de macrófagos que inducen angiogénesis. Sin embargo, poco se conoce del papel de la IL-17 directamente sobre las células tumorales. Por lo anterior, es relevante analizar el papel de IL-17A/IL-17RA en las células ID8 en el desarrollo tumoral en un modelo murino de CaOv.

HIPÓTESIS

El eje IL-17A/IL-17RA promueve el desarrollo tumoral en un modelo murino de CaOv, mediante un efecto directo sobre las células tumorales.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la participación de IL-17A/IL-17RA en el desarrollo tumoral en un modelo murino de cáncer de ovario, centrándose en el efecto directo sobre las células tumorales.

Objetivos específicos

- Analizar la expresión de IL-17RA en células ID8 y células recuperadas de LA.
- Estudiar los efectos de la estimulación con IL-17 en células ID8.
- Generar células ID8 modificadas en *IL17RA* y analizar el crecimiento tumoral *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

La línea celular ID8, se obtuvo de MERCK Millipore-SIGMA (SCC145) y las células ID8-Defb29 Vegf-Luc, denominadas más adelante como ID8dv-Luc, fueron una amable donación del Dr. T.C. Wu (*School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA*) y al Dr. Fidel P. Zavala (*W. Harry Feinstone Department of Molecular Microbiology and Immunology, Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA*) a través de “*Johns Hopkins University Technology Ventures*”. Estas células se mantuvieron en DMEM con alto contenido en glucosa (Sigma, D6429) suplementado con 4% de SFB inactivado por calor y con 5 µg/mL de insulina, 5 µg/mL de transferrina y 5 ng/mL de selenito sódico (1X ITS; Sigma, I3146) a 37 °C en un incubador humidificado con 5% de CO₂.

Ratones

Ratones C57BL/6J hembras de 6-8 semanas de edad (*The Jackson Laboratory*), se criaron y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos, con comida y agua *ad libitum* en las instalaciones del CINVESTAV-UPEAL (Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio) bajo el protocolo No. 0288-19 (CDMX, México).

Asimismo, se mantuvieron ratones en las instalaciones del bioterio de *Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA* para experimentos de desarrollo tumoral monitoreados mediante imagenología por bioluminiscencia. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la guía ARRIVE (*Animal Research: Reporting of in vivo experiment*), el cual fue aprobado por el Comité de Uso y Cuidado de Animales del Cinvestav.

Western blot

Las células se cultivaron en diferentes condiciones hasta su confluencia. Primero, se lavaron con PBS 1X frío y se lisaron directamente con un scraper en la caja de

cultivo con buffer de lisis RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 4 mM EDTA más un *cocktail* de inhibidores de proteasas (cOmplete Mini, Roche) e incubadas durante 30 min en hielo. Después, el lisado celular se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4 °C, se obtuvo el sobrenadante y se realizó una cuantificación de proteínas empleando un protocolo de Lowry modificado (500-0114, BioRad). Los extractos de proteína total (30 µg) se resolvieron en geles de poliacrilamida al 10% y enseguida las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa por toda la noche a 25 volts. La transferencia de proteínas se confirmó por tinción con rojo de Ponceau. Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5% en amortiguador Tris-HCl con Tween 20® (TBS-T al 0.1%) por 1 h a temperatura ambiente (TA), lavadas 3X con TBS-T durante 15 min cada uno e incubadas con los siguientes anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C: IL-17RA (dilución 1/1000, conejo policlonal, ProSci, 7419) y p-ERK (dilución 1/2000, ratón monoclonal, E-4, Santa Cruz Biotechnology, sc-7383). Como control de carga, se normalizaron los niveles de proteína detectados con la incubación de los siguientes anticuerpos β-actina (dilución 1/1000, ratón monoclonal, C4, Santa Cruz Biotechnology, sc-47778) y ERK 1 (dilución 1/2000, conejo policlonal, K-23, Santa Cruz Biotechnology, sc-94). Después, se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios dilución 1/10,000 durante 1 h a TA: cabra anti-conejo HRP (IgG) (Jackson ImmunoResearch, 111-035-003) y cabra anti-ratón HRP (IgG) (Jackson ImmunoResearch, 115-035-003). Finalmente, las membranas se lavaron y revelaron con Super Signal West Femto (*Thermo Fisher Scientific*, 34094) para su visualización usando el sistema de imagen Newton 7.0 (Wilber, Francia). El análisis densitométrico se realizó usando el software ImageJ (*National Institute of Health, Bethesda, MD.*) versión 1.52.

Citometría de flujo

Las células ID8 se cultivaron bajo diferentes condiciones y tripsinizadas para la obtención de una suspensión celular. Para la tinción extracelular, las células se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 5 min a TA, lavadas con PBS 1X, bloqueadas con bloqueador de receptores Fc de ratón (anticuerpo CD16/32,

BioLegend, 101330) durante 30 min a TA y teñidas con anticuerpo primario IL-17RA (dilución 1/200, conejo policlonal, ProSci, 7419) durante toda la noche a 4 °C. Después, las células se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo FITC o burro anti-conejo Alexa Fluor 647 durante 1 h a TA.

Para la tinción intracelular, las células fueron lavadas, fijadas y permeabilizadas con reactivo de lavado y permeabilización basado en saponina (Invitrogen, C10632) durante 15 min a TA, lavadas 2 veces y teñidas con los anticuerpos primarios IL-17RA y WT-1 (dilución 1/200, ratón monoclonal conjugado con PE, Novus biologicals, NBP2-47931PE) durante toda la noche a 4 °C. Después, las células se lavaron y se incubaron con cabra anti-conejo FITC durante 1 h a TA. La adquisición de las células se realizó en un citómetro de flujo BD Fortessa LSR-II. Los datos se analizaron usando el software FlowJo (BD Biosciences) versión 10.6.

Ensayo de proliferación CFSE

Las células fueron cultivadas y marcadas usando un kit de proliferación celular CellTrace™ (CFSE, Thermo Fisher Scientific, C34554), el cual atraviesa la membrana celular y se une covalentemente a las aminas libres en el interior de la célula diluyéndose a través de las generaciones de células proliferantes, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron lavadas con PBS 1X estéril, tripsinizadas y resuspendidas a una densidad de 1×10^6 células/mL en una solución de trabajo de tinción (5 μ M en PBS) durante 20 min a 37 °C. Después, para detener la tinción se agregaron 5 volúmenes de medio de cultivo, y después las células fueron contadas con una cámara de Neubauer y se cultivaron en cantidades iguales en una placa de 24 pozos. Al día siguiente, las células fueron mantenidas en ayuno (medio de cultivo sin SFB/ITS) durante 4 h y después estimuladas con 10, 50 y 100 ng/mL de citocinas IL-17 recombinantes murinas: IL-17A (BioLegend, 576004), IL-17F (Novus biologicals, NBP2-76309-5ug) e IL-17A/F (Novus biologicals, NBP2-76246-5ug) durante 24 h a 37 °C. Las células marcadas con CFSE no estimuladas fueron usadas como control (no proliferantes). Finalmente, las células fueron tripsinizadas, fijadas con 4% paraformaldehído y adquiridas usando un citómetro de

flujo Attune Next (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA.). Los datos se analizaron usando el software FlowJo (BD Biosciences) versión 10.6.

Ensayo de quimiorresistencia

Para determinar el efecto de la IL-17 sobre las células ID8 en la quimiorresistencia a carboplatino, las células fueron cultivadas en placa de 48 pozos a una densidad de 1.5×10^4 y fueron tratadas solo con carboplatino (1 mg/mL, Sigma, C2538) o en combinación con las proteínas recombinantes murinas IL-17A, IL-17F, IL-17A/F (10 ng/mL) durante 24 h a 37 °C. Después, las células se tiñeron con Annexina V- PE (ficoeritrina) (BD Pharmingen™ PE Annexin V, 51-65875X) y LIVE/DEAD™ Fixable Scarlet (723) viability (dilución 1/1000, Invitrogen, L34987) para monitorear la apoptosis celular en cada condición de la siguiente manera: las células fueron lavadas, tripsinizadas, resuspendidas en medio de cultivo completo, incubadas durante 20 min a 37 °C, lavadas con PBS 1X y resuspendidas en solución de tinción con 5 μ L de Annexin V-PE y 0.1 μ L de Scarlet (diluidos en 100 μ L de buffer de unión de Annexina) durante 15 min a TA. Finalmente, las células fueron lavadas y resuspendidas en buffer de unión para su adquisición en el citómetro de flujo Attune Next (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA.). Los datos se analizaron usando el software FlowJo (BD Biosciences) versión 10.6.

Ensayo de migración celular en cámaras Transwell

Las células ID8 fueron cultivadas a una densidad de 5×10^4 en una placa de 48 pozos. Al siguiente día, las células fueron mantenidas en ayuno (medio de cultivo sin SFB/ITS) durante 4 h y tratadas con 10 ng/mL de citocinas recombinantes murinas IL-17A, IL-17F, IL-17A/F durante 24 h a 37 °C. Se utilizó mitomicina C (10 μ g/mL, Sigma, M4287) para inhibir la proliferación celular incubando a las células 2 h antes de que terminara el tiempo de estimulación. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas, se contaron y se cultivaron a una densidad de 5×10^4 células (diluidas en 200 μ L de medio libre de SFB/ITS) en la cámara superior de soportes transwell de membranas de policarbonato con poro 8.0 μ m en placa de 24 pozos

(Corning, 3422). En la cámara inferior se agregó medio de cultivo completo y en el caso de la condición “control negativo” se agregó medio de cultivo sin SFB/ITS y se dejaron durante 14 h de migración a 37 °C. Después, las células que migraron a través de la membrana fueron fijadas con 4% de paraformaldehído y las que no migraron fueron removidas de la superficie superior de la membrana por raspado con hisopo. Después, las membranas fueron teñidas con 0.5% de cristal violeta y/o DAPI, y las células fueron visualizadas con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti-E. Para el análisis de las imágenes se capturaron 4 campos de visión a un objetivo 10x de cada membrana, se contaron las células usando el software Fiji (*National Institutes of Health, Bethesda, MD.*, versión 2.3.0) y se obtuvo el promedio de los 4 campos analizados.

Generación de células ID8-Defb29 Vegf-Luc modificadas en IL-17RA mediante CRISPR-Cas9

El diseño del RNA guía (sgRNA) fue realizado usando la herramienta digital <http://crispr.dbcls.jp/> y se escogió una de las opciones de RNA guías obtenidas en el software con solo una coincidencia en la búsqueda 20mer+PAM y 12-mer+PAM, siendo una secuencia blanco altamente específica. Se diseñó un RNA guía contra el exón 13 del gen de ratón *IL17RA* (5´-CGAGGGCTGCACACCCTCTG-3´) y un par de oligonucleótidos agregando el sitio de restricción de BbsI (Forward: 5´-CACCCGAGGGCTGCACACCCTCTG-3´, Reverse: 5´-AAACCAGAGGGTGTGCAGCCCTCG-3´). Los oligonucleótidos sentido y anti-sentido fueron hibridados y clonados en el sitio de BbsI en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (donado por Feng Zhang, Addgene, 62988), el cual está dirigido por el promotor U6 y codifica la endonucleasa Cas9 necesaria para el funcionamiento del sgRNA, utilizando el protocolo descrito por Ran *et al*, 2013 (60). El DNA plasmídico se usó para transformar bacterias y se realizó PCR colony para verificar la correcta ligación del inserto mediante amplificación por PCR y secuenciación a partir del promotor U6 utilizando el oligonucleótido U6-Fwd (5´-GAGGGCCTATTTCCCATGATT-3´) y el oligonucleótido sgRNA-Rev. El constructo de DNA plasmídico CRISPR/Cas9-sgRNA se purificó mediante el kit QIAprep SPIN

Miniprep (Qiagen). Las células ID8-Defb29 Vegf-Luc fueron transfectadas con 2 μ g de DNA plasmídico en 100 μ L de solución de Nucleofector (Amaxa® Cell Line Nucleofector Kit V), en una cubeta certificada usando un dispositivo Amaxa Nucleofector (Lonza). Tras 8 h de transfección, el medio se cambió a medio completo y después de 48 h las células se cultivaron selectivamente por su resistencia a puromicina, utilizando 3 μ g/mL de puromicina (MP Biomedicals™, 0219453910).

Inmunofluorescencia

Para confirmar los cambios en la expresión a nivel de proteína de IL-17RA en la línea celular generada anteriormente, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Células ID8dv-Luc WT y células ID8dv-Luc modificadas en *IL17RA* (ID8dv-Luc- Δ IL-17RA) fueron cultivadas en cubreobjetos hasta que alcanzaron confluencia. Las células se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 10 min a TA, se permeabilizaron con 0.2% de Tritón X-100 en PBS 1X durante 10 min y se bloquearon con 10% de SFB durante 1 h. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X entre cada paso. Después, las células fueron incubadas durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario anti-IL-17RA (dilución 1/100, conejo policlonal, ProSci, 7419), lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario burro anti-conejo IgG acoplado con Alexa Fluor® 647 (dilución 1/100, BioLegend, 406414). Posterior a la tinción, se lavaron las células y se montaron en portaobjetos con ProlongGold con DAPI. Finalmente, las laminillas se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Zeiss AxioImager M2 tomando 3 campos diferentes por muestra y las imágenes se analizaron con el software Fiji (NIH), versión 2.3.0 obteniendo los píxeles de fluorescencia por célula.

Modelo tumoral intraperitoneal singénico y monitoreo del crecimiento tumoral mediante bioluminiscencia por imagenología

Ratones C57BL/6 hembra de 6-8 semanas de edad fueron inoculadas vía intraperitoneal con 5 x 10⁶ células ID8dv-Luc-WT (n=6) o células ID8dv-Luc- Δ IL-

17RA (n=8). Los animales fueron monitoreados una vez por semana por imagenología y se tomaron mediciones físicas como son el peso corporal (g) y el diámetro abdominal sagital (mm). Asimismo, todos los animales se mantuvieron hasta su punto final humanitario, basado en que alcanzaran más de 30 g de peso, letargia o dificultad para moverse, para la obtención del tiempo de sobrevivencia global. Para la imagenología realizada semanalmente, los animales fueron inyectados vía intraperitoneal con 100 μ L de D-Luciferina (30 mg/mL, PerkinElmer, 122799), anestesiados con isoflurano inhalado y la bioluminiscencia se observó usando el equipo *IVIS[®] Spectrum In Vivo Imaging System* (PerkinElmer). Todas las imágenes de bioluminiscencia se cuantificaron durante 5 min, con un tiempo de exposición de 30 seg, a intervalos de 1 minuto. Los datos se analizaron usando la emisión de flujo total de fotones (Photons/sec, que indica la intensidad de la señal emitida por la luciferasa) en las regiones de interés cubriendo todo el abdomen del animal.

Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como media \pm desviación estándar. La normalidad de los datos se analizó mediante las pruebas de SaphiroWilk o Kolmogorov test. La prueba estadística específica, los valores de p y el número de muestras o células (n) analizados se mencionan en la leyenda de cada figura. Todos los análisis estadísticos y generación de los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA.).

RESULTADOS

Las células murinas ID8 de CaOv expresan IL-17RA y son sensibles a la estimulación con IL-17A recombinante, activando a ERK1/2.

Inicialmente, se analizó la expresión de los mRNA de los 5 miembros de la familia de receptores de IL-17 en células ID8 basado en datos de RNA-seq obtenidos por Cai *et al*, 2018 (61). Encontramos que la mayoría de los diferentes miembros de receptores descritos se expresan en las células ID8, aunque en diferentes proporciones (Figura 10); el de mayor expresión fue IL-17RD, seguido de RA, RC y RE; mientras que el transcrito de RB no se encontró (Figura 10).

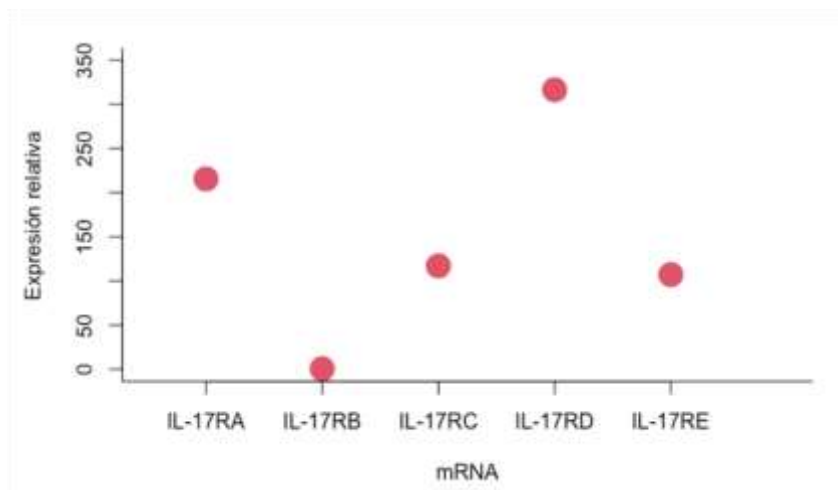


Figura 10. Expresión relativa de mRNA de los genes IL-17RA, RB, RC, RD y RE en células ID8.

Cada punto representa el promedio de dos réplicas. Gráfica generada con datos obtenidos de RNA-seq por Cai *et al*, 2018 (61).

Debido a que el IL-17RA es el principal miembro de receptores que forma complejos heterodiméricos con los diferentes miembros expresados en las células (38), analizamos la expresión de IL-17RA a nivel de proteína mediante Western blot (WB) en las células ID8 (Figura 11). Encontramos que las células ID8 expresan una banda a 135 kDa correspondiente al peso molecular esperado del receptor IL-17RA. Se utilizó actina como control de carga (Figura 11A).

Está descrito que el IL-17RA se localiza en la membrana plasmática, pero se preensambla en vesículas y se moviliza hacia ella para formar los complejos de

receptores (62); por ello, analizamos su expresión en la superficie (células no permeabilizadas) y la expresión total (células permeabilizadas) en células ID8 mediante citometría de flujo para determinar si el receptor también se encontraba intracelularmente. El histograma representativo del análisis de expresión del IL-17RA a nivel total y membranal mediante citometría de flujo muestra una proporción similar de expresión del IL-17RA en células ID8 (Figura 11B). El análisis de la intensidad media de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) de la expresión total y membranal del IL-17RA confirma que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos sitios (Figura 11C).

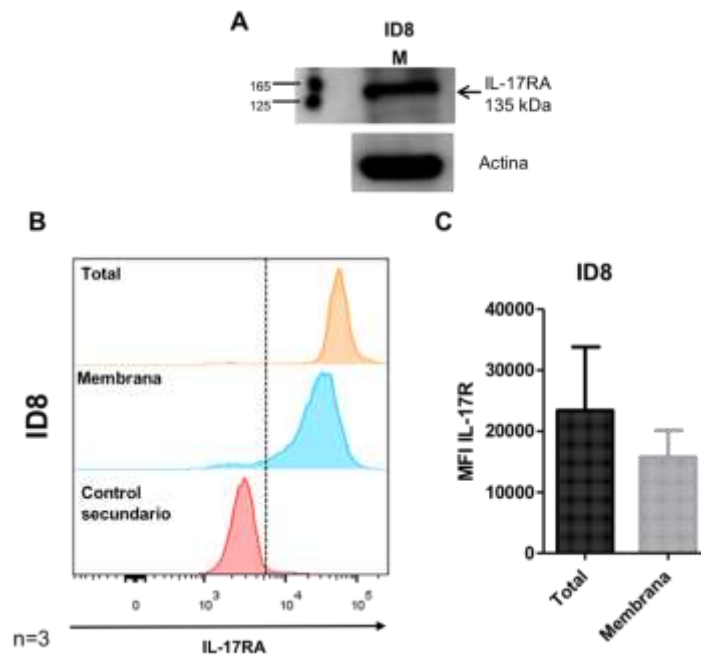


Figura 11. Expresión a nivel de proteína de IL-17RA en células ID8.

A) Imagen representativa de la expresión de IL-17RA mediante Western blot (peso molecular esperado de 135 kDa). **B)** Histograma representativo de la expresión total y membranal del IL-17RA en células ID8 mediante citometría de flujo. **C)** Intensidad media de fluorescencia (MFI) del IL-17RA total y membranal. Datos de citometría de flujo de 3 experimentos independientes. Se analizó por prueba t-student.

Para determinar si la expresión del IL-17RA se mantenía en las células a lo largo del desarrollo tumoral *in vivo*, analizamos mediante microscopía confocal la expresión del IL-17RA en células obtenidas de líquido ascítico a las 14 semanas

postinoculación de ratones C57BL/6 inoculados con células ID8 vía i.p. (CaOv) y en células obtenidas de lavado peritoneal de ratones control inoculados con PBS (Control) que se cultivaron sobre cubreobjetos para descartar células por adherencia (Figura 12). Se encontró que las células adherentes provenientes de los ratones con CaOv expresan al IL-17RA y además su expresión es mayor en comparación con la de las células adherentes provenientes de los ratones control (Figura 12A). Debido a que las células tumorales y otras células encontradas en el LA cómo son fibroblastos, macrófagos o células mesoteliales tienen un fenotipo adherente, se determinó mediante citometría de flujo la expresión de IL-17RA específicamente en células tumorales ID8 con una doble tinción usando IL-17RA y WT1 (factor transcripcional expresado en células tumorales ID8) (63). Encontramos que aproximadamente 83% de células ID8 WT1+ expresan IL-17RA (Figura 12B), indicando que la expresión de IL-17RA se mantiene durante el desarrollo tumoral.

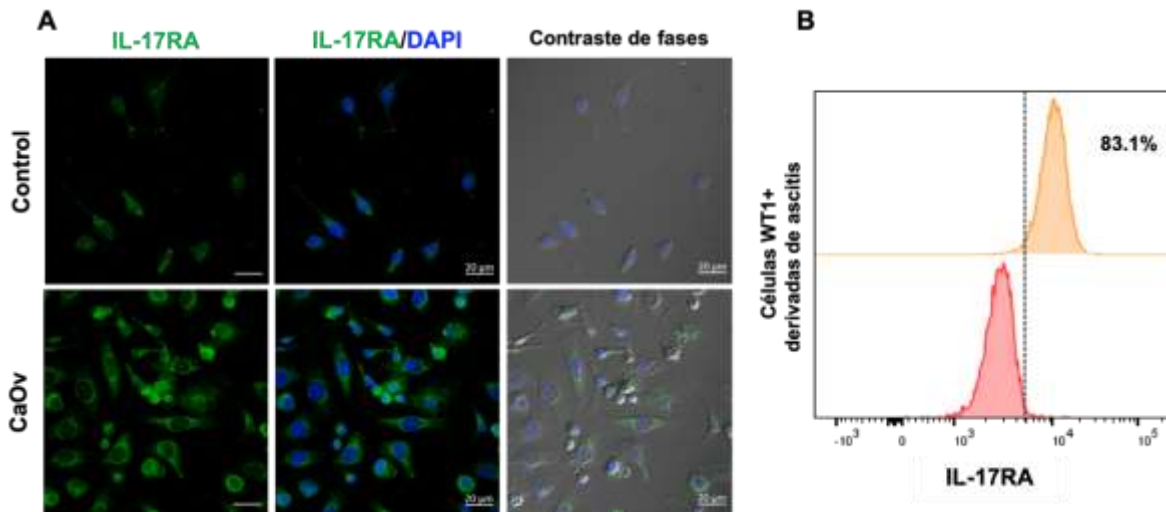


Figura 12. Expresión de IL-7RA en células derivadas de ascitis.

A) Imagen representativa de microscopía confocal de la expresión de IL-17RA de células obtenidas de lavado peritoneal de ratones inoculados con PBS (Control) y células de líquido ascítico de ratones inoculados con células ID8 (CaOv) a las 14 semanas post inoculación. **B)** Histograma representativo de la expresión de IL-17RA en células WT1+ recuperadas de ascitis de ratones con CaOv. Los datos representan tres experimentos independientes.

Por otro lado, para determinar si el receptor IL-17RA expresado en las células ID8 era sensible a la estimulación con IL-17A, uno de sus ligandos conocidos, se analizó la activación (fosforilación) de la proteína ERK de la vía MAPKs, la cual ya

se ha descrito que es una vía de señalización que se activa (Figura 13) (64). Las células ID8 se estimularon con 10 ng/ml de la IL-17A recombinante murina durante 5, 10 y 30 min y se analizó la expresión de la proteína fosforilada ERK1/2 en el residuo Tyr 204; como control de carga se analizó la proteína ERK1/2 total mediante WB, observando ambas proteínas en el peso molecular esperado de 42/44 kDa (Figura 13A). El análisis densitométrico de la expresión de p-ERK1/2 normalizada con respecto a ERK total, mostró que las células ID8 estimuladas con IL-17A presentan una mayor activación de ERK a los 5 min post-estimulación y esta diferencia es estadísticamente significativa. La activación de ERK mostró una disminución a los 10 min y regresó a su estado basal a los 30 min (Figura 13B). Además, para analizar si esta activación era dependiente de la concentración utilizada de IL-17A, las células ID8 se estimularon con 10, 50 y 100 ng/ml de IL-17A durante 5, 10 y 30 min. Los resultados obtenidos muestran que la activación de ERK1/2 no es dependiente de la concentración de IL-17A utilizada (Figura 13C). Lo anterior sugiere que las células ID8 de CaOv expresan el receptor IL-17RA, el cual responde de manera sensible a la estimulación con IL-17A, y a su vez activa a ERK1/2.

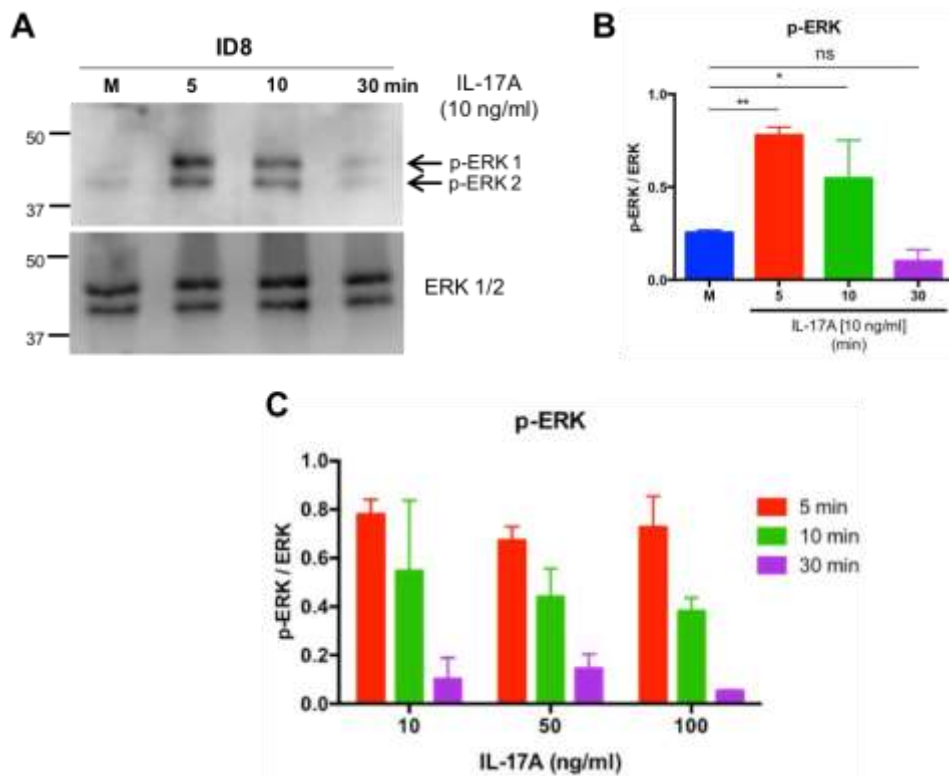


Figura 13. Activación de ERK1/2 en respuesta a IL-17A en células ID8.

A) Imagen representativa de la expresión de p-ERK1/2 y ERK1/2 analizada por Western blot de células ID8 estimuladas con 10 ng/mL de la IL-17A recombinante murina durante 5, 10 y 30 min (42/44 kDa). **B)** Análisis densitométrico para cada condición, normalizado con respecto al control de ERK1/2 total. **C)** Análisis densitométrico de la activación de ERK en células ID8 estimuladas con 10, 50 y 100 ng/ml de IL-17A durante 5, 10 y 30 min. Los datos representan tres experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante la prueba one-way ANOVA. P value= * <0.05 , ** <0.005 .

IL-17 no tiene efecto sobre la proliferación de las células ID8

Está descrito que en células de cáncer de mama la IL-17A induce una mayor proliferación (45), debido a ello, aquí analizamos el papel del IL-17RA en la proliferación de las células ID8 estimuladas con sus ligandos conocidos en forma homodimérica o heterodimérica IL-17A, IL-17F e IL-17A/F, mediante el ensayo de proliferación por dilución del marcador CFSE. Las células ID8 previamente marcadas con CFSE, se estimularon con 10, 50 y 100 ng/mL de las citocinas IL-17A, F y A/F recombinantes durante 24 h y se analizó la dilución del marcador CFSE mediante citometría de flujo (Figura 14). En histogramas representativos

encontramos que después de 24 h de estimulación, la mayoría de las células ID8 sufrieron al menos un ciclo de proliferación con las diferentes citocinas y a las diferentes concentraciones utilizadas. Células marcadas con CFSE en medio de cultivo completo se usaron como control (Ctrl) y células marcadas no estimuladas se usaron como control negativo de proliferación (No proliferación) (Figura 14A). Al analizar las proporciones de células en proliferación, observamos que solo una pequeña parte de las células estimuladas con 10 ng/mL de IL-17A alcanzaron un segundo ciclo de proliferación. Sin embargo, cuando se analizaron las proporciones de células en los diferentes ciclos de proliferación (ciclo 0, 1 y 2), las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 14B), indicando así que las IL-17A, F y A/F no inducen cambios en la proliferación de células ID8.

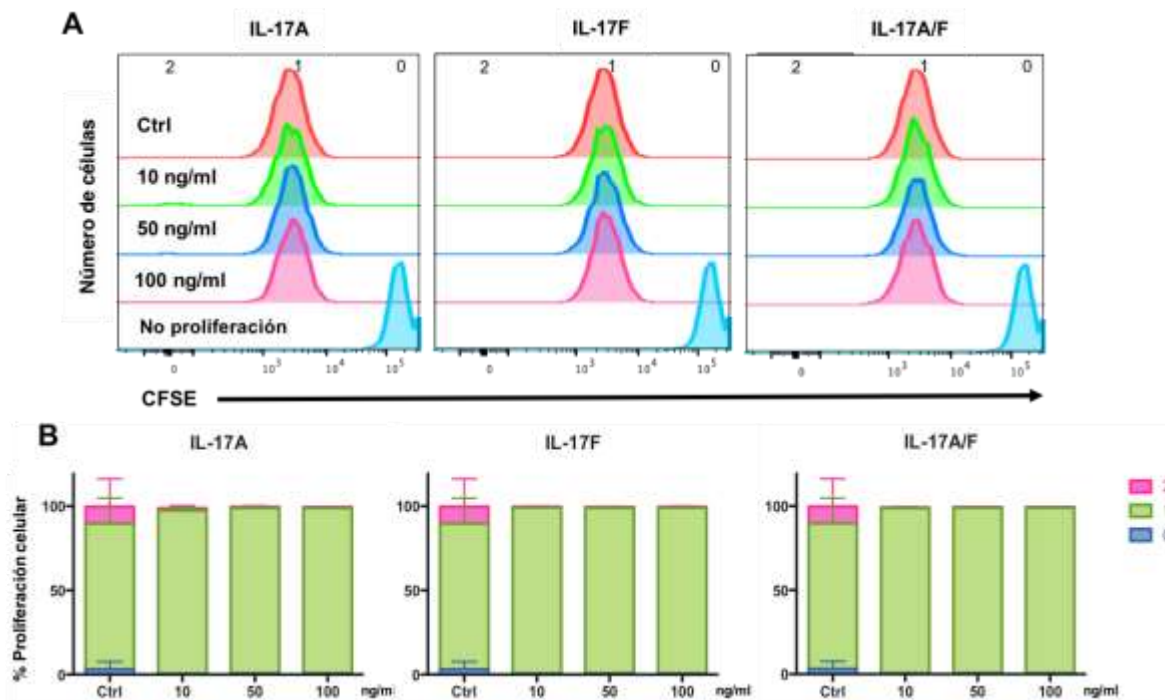


Figura 14. Efecto de IL-17A, F y A/F sobre la proliferación de células ID8.

A) Histogramas representativos del ensayo de proliferación por dilución del marcador CFSE en células ID8 estimuladas con 10, 50 y 100 ng/mL de citocinas IL-17A, F o A/F recombinantes durante 24 h. Células estimuladas en medio se usaron como control (Ctrl). Células marcadas no estimuladas se usaron como control de no proliferación (No proliferación). **B)** Porcentaje de proliferación celular a 0 (barra azul), 1 (barra verde) y 2 (barra rosa) ciclos proliferativos por la dilución de CFSE. Los datos representan 3 experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante la prueba one-way ANOVA.

IL-17 promueve una mayor susceptibilidad a carboplatino en células ID8

Se sabe que la IL-17 induce una mayor quimiorresistencia a docetaxel en células de cáncer de mama (45), por lo que analizamos cual es el efecto de la IL-17 en la quimiorresistencia de las células ID8 a carboplatino. Las células ID8 estimuladas con 10 ng/mL de IL-17A, F y A/F solas o en co-estimulación con 1 mg/mL de carboplatino durante 24 h fueron analizadas por ensayo de apoptosis con la tinción de Annexin-V y el marcador de viabilidad LIVE/DEAD™ Fixable Scarlet (723) mediante citometría de flujo (Figura 15A). Encontramos que la coestimulación de células ID8 con IL-17A más carboplatino induce un incremento estadísticamente significativo en la proporción de células en apoptosis tardía (Annexin V⁺, Scarlet⁺) comparada con la condición de medio. No se encontraron cambios significativos en apoptosis temprana o necrosis (Figura 15B). Estos resultados sugieren que IL-17A induce una mayor susceptibilidad a la muerte por carboplatino en células ID8.

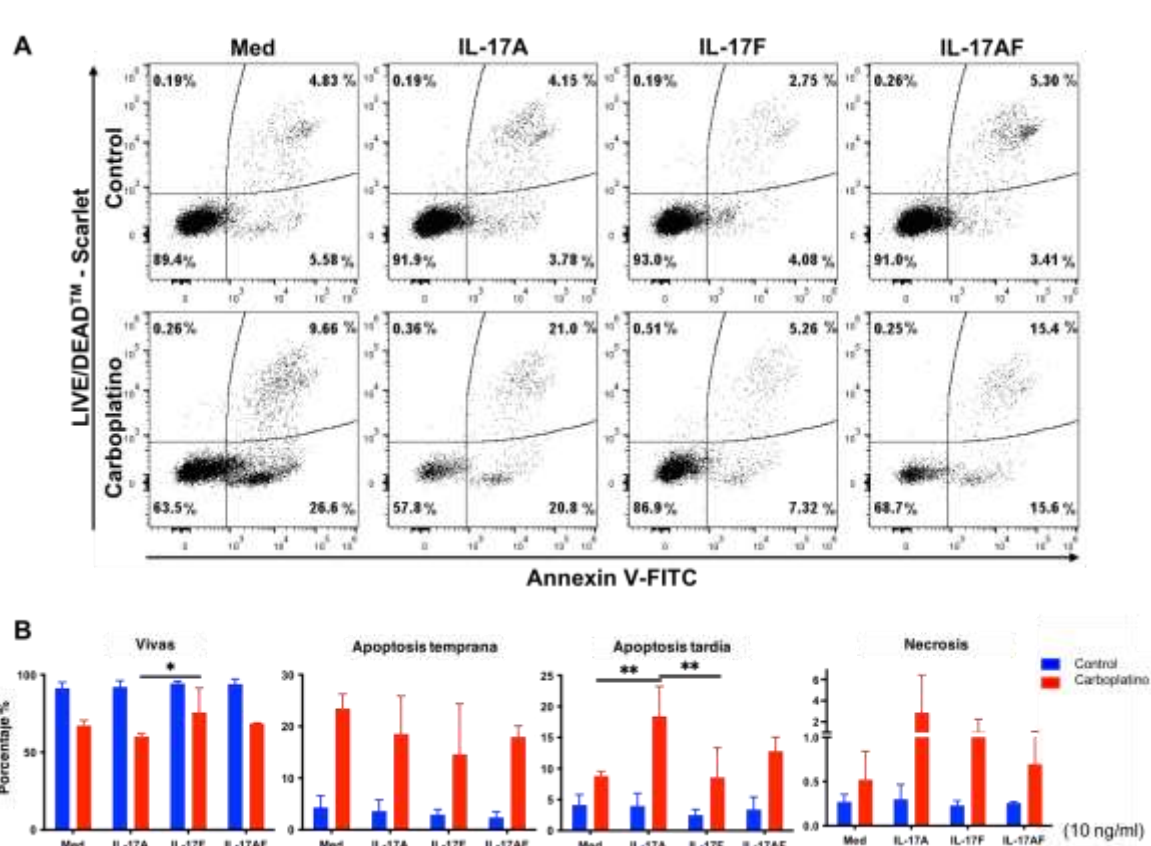


Figura 15. Efecto de IL-17A, F y A/F sobre la quimiorresistencia a carboplatino de células ID8.

A) Análisis representativo de la estrategia de selección de células ID8 estimuladas con 10 ng/mL de IL-17A, F o A/F recombinantes o en combinación con 1 mg/mL de carboplatino durante 24 h. Las células se analizaron por citometría de flujo posterior a la tinción con Annexin V/Scarlet viability. **B)** Gráficos del porcentaje de células vivas (Annexin V-, Scarlet-), en apoptosis temprana (Annexin V+, Scarlet-), en apoptosis tardía (Annexin V+, Scarlet+) y necrosis (Annexin V-, Scarlet+) analizadas usando el software FlowJo. Los datos representan 3 experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey.

La IL-17 reduce la migración de células ID8

Debido a que IL-17 ha sido relacionada a una mayor migración en diferentes tipos de cáncer (45,65–67), analizamos el efecto directo de la IL-17 en la migración *in vitro* de las células ID8 de CaOv mediante ensayos de migración en cámaras *transwell* de células ID8 previamente estimuladas con 10 ng/mL de IL-17A, F y A/F, posteriormente se colocaron en la cámara superior del *transwell* y se les permitió

migrar durante 14 h hacia el medio completo colocado en la cámara inferior. Como control positivo de migración se utilizaron células no estimuladas que migraron hacia el medio completo (Ctrl) y como control negativo de migración se ocupó medio solo sin SFB/ITS (Neg) (Figura 16A). Las células que migraron a través de los filtros transwell se tiñeron con DAPI para contarlas mediante microscopía por epifluorescencia; el promedio del conteo de 4 campos visuales a un objetivo 10x se muestra en la Figura 16B. Encontramos que la pre-estimulación con 10 ng/mL de las citocinas IL-17A, F y A/F durante 24 h antes del proceso de migración hacia el medio completo, provocó una disminución en el número de células que pasaron a través de la membrana, siendo esta disminución estadísticamente significativa cuando se compara con la condición control (Figura 16C). El análisis del porcentaje de migración celular muestra una disminución con respecto al control de 45, 56 y 32% cuando se estimulan con IL-17A, F y A/F, respectivamente (Figura 16D). Estos resultados sugieren que la IL-17 tiene un efecto negativo en la migración celular de las células ID8 *in vitro*.

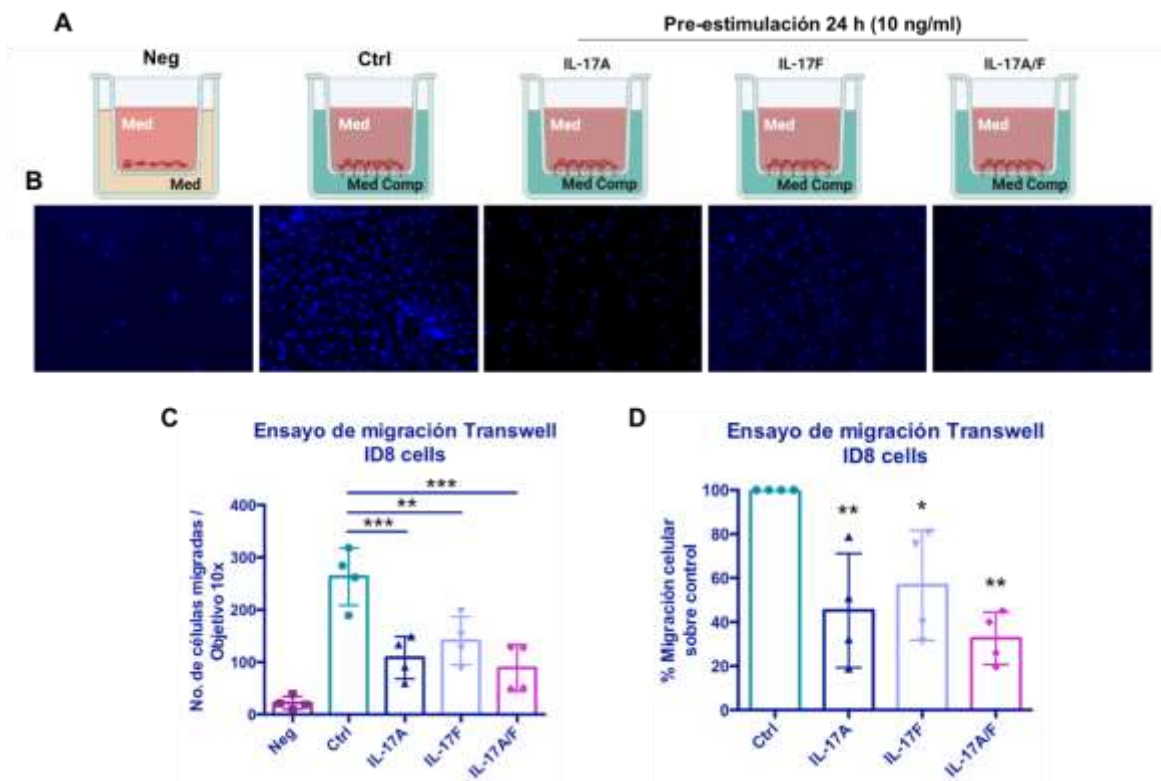


Figura 16. Efecto de las citocinas IL-17A, F y A/F sobre la migración de células ID8.

A) Configuración de cámaras *transwell* del ensayo de migración de células ID8 pre-estimuladas con 10 ng/mL de IL-17A, F o A/F durante 24 h. Medio completo (Med Comp) se usó en la cámara inferior como control positivo de migración y se usó medio solo (Med) como un control negativo. **B)** Imágenes representativas de epifluorescencia de células que migraron durante 14 h a través del *transwell* (tinción con DAPI, objetivo 10x). **C)** Número y **D)** porcentaje de células que migraron observados en las imágenes de epifluorescencia de los filtros *transwell* (promedio del conteo de células de 4 campos por muestra). Los datos representan 4 experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante la prueba one-way ANOVA. *P value*=* <0.05, ** <0.005, *** <0.0005.

El IL-17RA se requiere para el desarrollo tumoral y la producción de ascitis en el modelo murino de células ID8dv-Luc

Los resultados *in vitro* mostraron un efecto antitumoral de la IL-17 en el comportamiento de las células ID8 cuando son tratadas con los ligandos del receptor IL-17RA, contrario a lo que se ha demostrado para otros tipos de cáncer (45,68–72). Para profundizar en el estudio del efecto del eje IL-17/IL-17RA sobre las células ID8, se decidió realizar una modificación genética de *IL17RA* mediante CRISPR-Cas9 en el modelo de células ID8-Defb29 Vegf-Luc (ID8dv-Luc). Estas células generan un tumor más agresivo, creando un ambiente inmunosupresor, de tal forma que la enfermedad se completa a las 6 semanas postinoculación. Este desarrollo del tumor se puede seguir por imagenología detectando la bioluminiscencia de la luciferina por acción de la luciferasa que expresan.

Para la modificación, se realizó el diseño de un RNA guía (sgRNA) dirigido contra el exón 13 del transcrito del IL-17RA (Figura 17A) y su posterior clonación en el plásmido de coexpresión con *SpCas9* [pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0] (Figura 17B), confirmándolo mediante PCR y secuenciación del DNA plasmídico (Figura 17C). El constructo sgRNA-Cas9 se transfectó en células ID8dv-Luc y las células alteradas se seleccionaron por su resistencia a puromicina (cassete de resistencia que contiene el plásmido PX459).

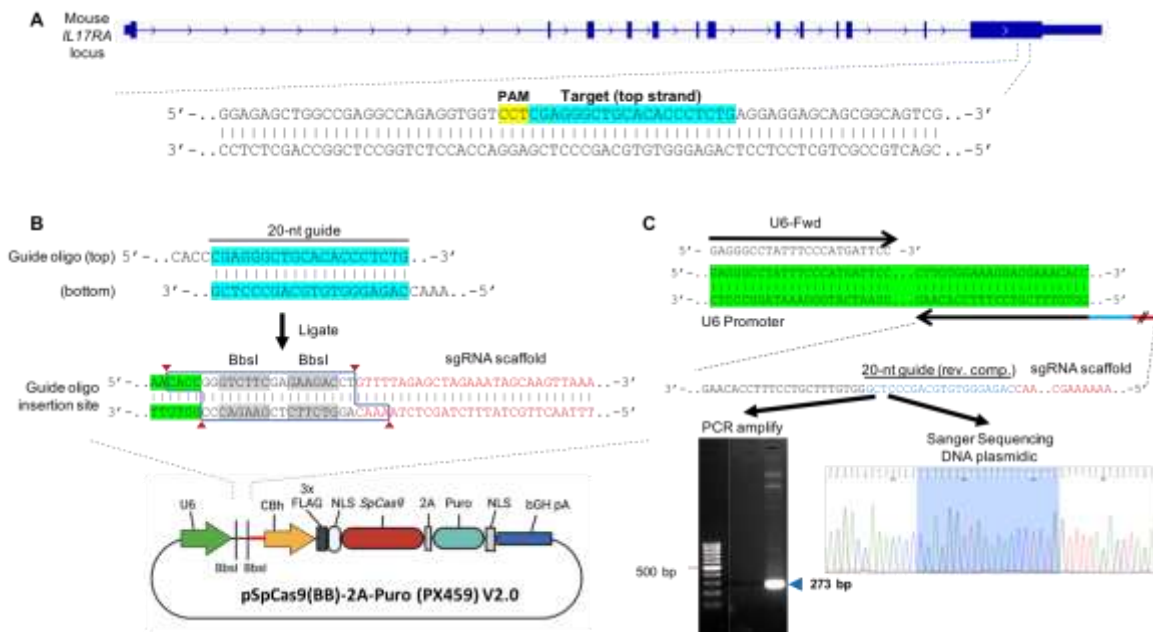


Figura 17. Diseño y clonación de sgRNA contra el gen *IL17RA* de ratón.

A) Para el diseño del sgRNA se utilizó la herramienta <http://crispr.dbcls.jp/> para facilitar la obtención de la secuencia blanco, la cual resultó altamente específica contra el exón 13 del mRNA de *IL17RA* con una secuencia PAM (motivo adyacente protoespaciador) reconocida por Cas9 de *S. pyogenes*. **B)** Diseño de oligonucleótidos *forward* y *reverse* del sgRNA agregando sitios de restricción de BbsI para su clonación en el plásmido pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 de expresión de Cas9 (pSpCas9) y la expresión del sgRNA bajo el promotor U6. **C)** Verificación de la clonación correcta del sgRNA en el plásmido mediante PCR y Secuenciación Sanger, usando el U6-*Forward* y el sgRNA-*Reverse*, amplificando un segmento del DNA plasmídico de 273 pb. El constructo sgRNA-Cas9 se purificó y se obtuvo el DNA plasmídico para transfectar células ID8dv-Luc generando la línea celular ID8dv-Luc-*IL17RA* modificada (Δ IL-17RA).

La presencia de IL-17RA en la línea celular modificada generada ID8dv-Luc-*IL17RA* (Δ IL-17RA) se analizó mediante microscopía de epifluorescencia, encontrando que la modificación mediante CRISPR-Cas9 causó una reducción en su expresión en comparación con las células WT (Figura 18A). Al realizar un conteo de intensidad de píxeles por célula, confirmamos que las células Δ IL-17RA expresan una menor cantidad de moléculas del IL-17RA, cuya diferencia con las células WT resultó estadísticamente significativa (Figura 18B).

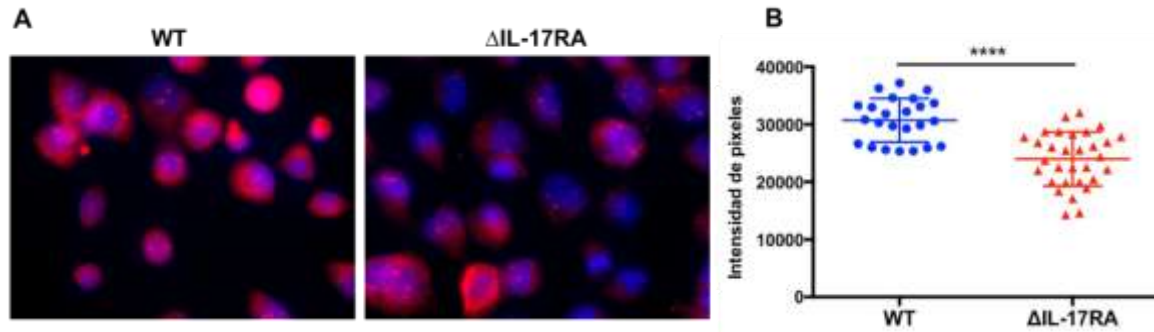


Figura 18. Expresión de IL-17RA en células ID8dv-Luc WT y modificadas en IL-17RA (Δ IL-17RA).

A) Imágenes representativas de epifluorescencia de la expresión de IL-17RA en células ID8dv-Luc WT y células modificadas en el IL-17RA (Δ IL-17RA). Tinción azul: núcleos, Tinción roja: IL-17RA. **B)** Intensidad de pixeles de la expresión de IL-17RA. Cada punto representa la intensidad de pixeles de una célula. WT n=24, Δ IL-17RA n=31. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t-Student no pareada con corrección de Welch. P value=**** <0.0001.

Para determinar la consecuencia de la disminución en la expresión del receptor, se analizó la activación de ERK bajo la estimulación con IL-17A mediante WB como previamente se realizó, usando células WT y células Δ IL-17RA. La fosforilación de ERK1/2 en las células ID8dv-Luc- Δ IL-17RA cambió con respecto a las células ID8dv-Luc-WT bajo la estimulación con la IL-17A recombinante durante 5, 10 y 30 min (Figura 19A). Al realizar el análisis densitométrico de la expresión de p-ERK sobre la expresión de ERK total, se observó que las células Δ IL-17RA presentan una tendencia a la disminución en la fosforilación de ERK a los 5 min post-estimulación en comparación con las células WT, mientras que a los 10 min se muestra un ligero aumento sin ser estadísticamente significativo. A los 30 min post-estimulación las células Δ IL-17RA muestran un retraso en la disminución de la fosforilación con respecto a las células WT, y la diferencia entre ambos tipos celulares resultó estadísticamente significativa. (Figura 19B). Lo anterior indica que la modificación del gen *IL17RA* mediante CRISPR-Cas9 no resultó en una eliminación total del receptor, sino que provocó una disminución en la expresión de moléculas del receptor. Sin embargo, se observó un retraso en la activación de ERK, lo que sugiere una alteración en el receptor.

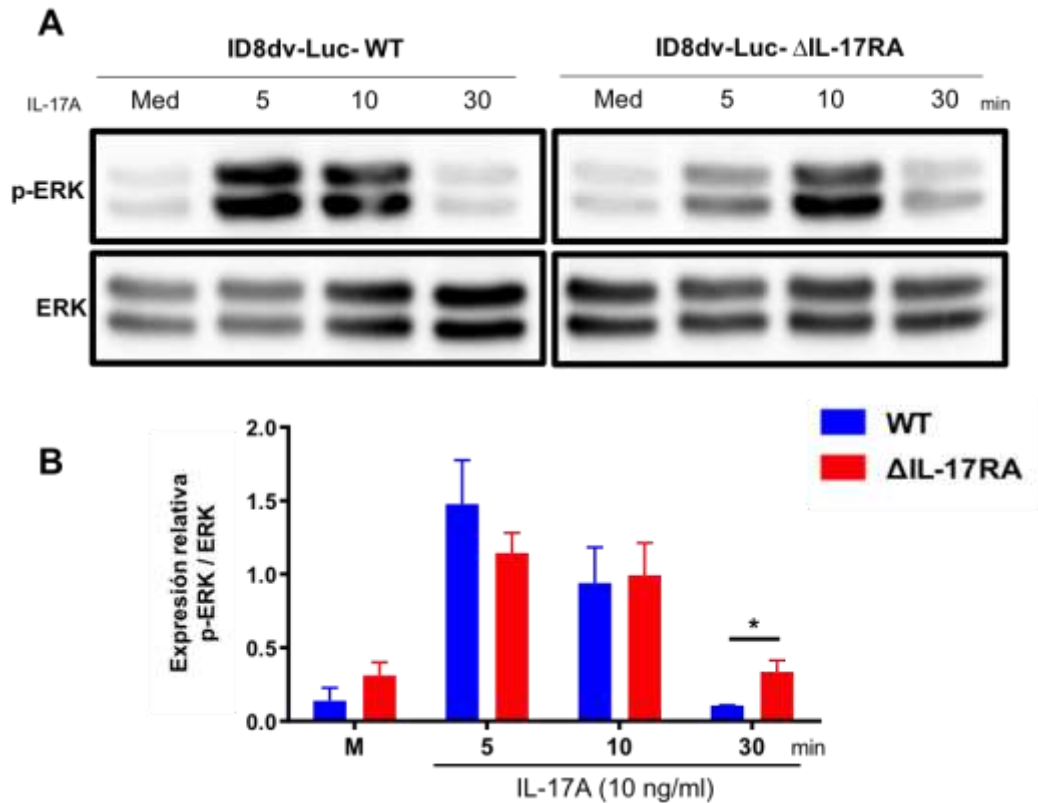


Figura 19. Activación de ERK1/2 en células ID8dv-Luc WT y Δ IL-17RA estimuladas con IL-17A.

A) Expresión de p-ERK y ERK de células ID8 estimuladas con 10 ng/mL de la recombinante IL-17A durante 5, 10 y 30 min. **B)** Análisis densitométrico de p-ERK normalizado con respecto al control ERK total de células WT (barras azules) y células Δ IL-17RA (barras rojas). Los datos representan tres experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante la prueba t-student no pareada con corrección de Welch. P value= $* < 0.05$.

Para evaluar la disminución en la expresión del IL-17RA, en la línea celular modificada (Δ IL-17RA), en el desarrollo tumoral *in vivo*, se analizó el crecimiento tumoral en ratones C57BL/6 inoculados con células ID8dv-Luc-WT o células ID8dv-Luc- Δ IL-17RA, mediante imagenología por bioluminiscencia. Los ratones se inocularon con 5×10^6 células vía i.p. y se realizaron mediciones del peso corporal y diámetro abdominal desde la semana 1 post-inoculación. A la semana uno post-inoculación no hubo diferencias entre ninguno de los parámetros evaluados; sin embargo, se observaron cambios a partir del día 21 post-inoculación. Los ratones inoculados con células Δ IL-17RA mostraron una reducción significativa en la tasa

de crecimiento tumoral y en la acumulación de ascitis en la cavidad abdominal (Figura 20A). El análisis de bioluminiscencia de la emisión total de fotones por segundo detectado por el sistema de imagen confirmó la disminución en el desarrollo tumoral en comparación con los animales inoculados con las células WT, cuya diferencia resultó estadísticamente significativa a partir de los 21 días post-inoculación (Figura 20B).

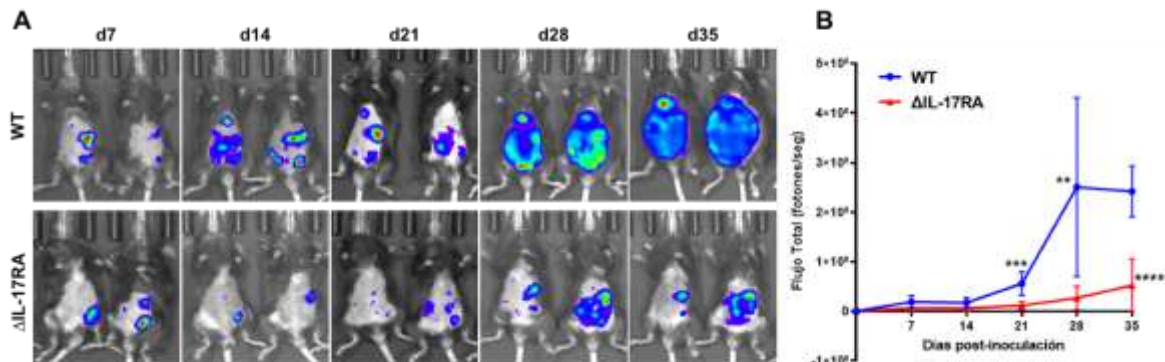


Figura 20. Desarrollo tumoral in vivo de células ID8dv-Luc WT y Δ IL-17RA.

A) Imágenes representativas de IVIS bioluminiscencia del desarrollo tumoral de ratones C57BL/6 inoculados vía i.p. con 5×10^6 células ID8dv-Luc WT y Δ IL-17RA. **B)** Emisión total de fotones por segundo a través del tiempo (días post-inoculación de las células tumorales) durante el desarrollo tumoral en ratones inoculados con células ID8dv-Luc WT (línea azul) y Δ IL-17RA (línea roja). WT n=6, Δ IL-17RA n=8. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de comparaciones múltiples t-student. *P value*=** <0.005, *** <0.0005, **** <0.0001.

Con respecto a la medición del diámetro abdominal sagital de los ratones, hubo una disminución de este parámetro en los ratones inoculados con células Δ IL-17RA con respecto a los ratones inoculados con las células ID8dv-Luc WT, diferencia estadísticamente significativa a partir de los 35 días post-inoculación (Figura 21A). Como ya se mencionó, la línea celular Δ IL-17RA induce un proceso acelerado en el desarrollo de tumores, por ello se evaluó el desarrollo del tumor y formación de ascitis en ambos grupos, el de los ratones inoculados con ID8dv-Luc WT y el de los inoculados con Δ IL-17RA. Como era de esperarse, los ratones inoculados con células ID8dv-Luc WT iniciaron la producción de ascitis a la semana 4 post-inoculación, la cual fue completamente evidente a la semana 7. Por otro lado,

haciendo las mismas mediciones en los ratones inoculados con células Δ IL-17RA, se observó que en estos ratones hubo un retraso en la formación y acumulación de ascitis. Se observó que el diámetro aumenta hasta alcanzar valores similares al grupo WT hasta los 70 días post-inoculación (Figura 21A).

Debido a que los ratones se dejaron hasta su punto final humanitario, se realizó un análisis de Kaplan-Meier de supervivencia global. Se encontró que los ratones inoculados con células Δ IL-17RA tuvieron una supervivencia de 77%, en comparación con el grupo WT que presentó 39% (Figura 21B). Por lo tanto, estos resultados indican que el receptor IL-17RA ejerce un efecto positivo en el desarrollo del tumor y en la acumulación de ascitis en el modelo murino ID8 de cáncer de ovario, ya que, al estar alterado este receptor, dichos procesos sufren un retraso significativo.

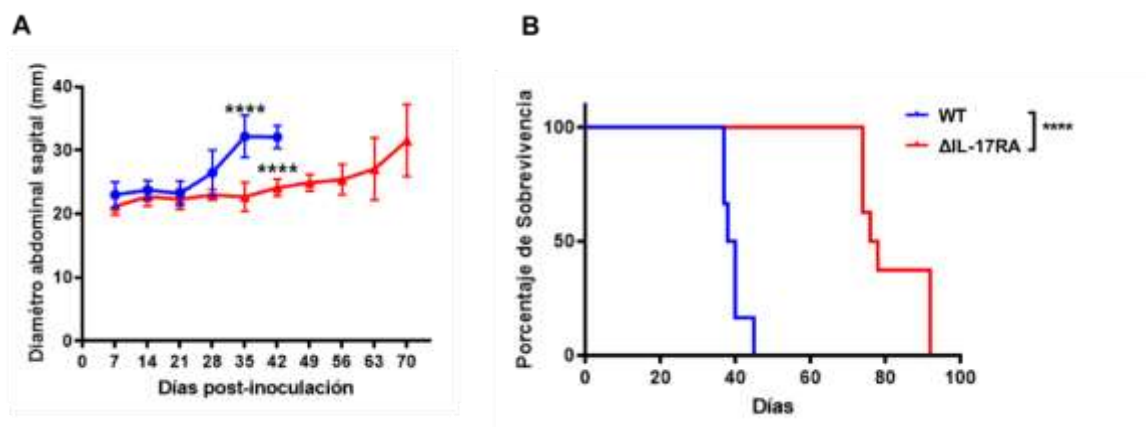


Figura 21. Medición del diámetro abdominal sagital y análisis de supervivencia Kaplan-Meier durante el desarrollo tumoral in vivo de células ID8dv-Luc WT y Δ IL-17RA.

A) Evolución del diámetro abdominal sagital de ratones inoculados con células ID8dv-Luc WT y Δ IL-17RA hasta su punto final de supervivencia. **B)** Análisis de supervivencia Kaplan-Meier de ratones inoculados con células ID8dv-Luc WT y Δ IL-17RA. WT n=6, Δ IL-17RA n=8. ID8dv-Luc WT (línea azul) y Δ IL-17RA (línea roja). La significancia estadística se determinó mediante la prueba de comparaciones múltiples t-Student y la prueba Mantel-Cox, respectivamente. P value= **** <0.0001.

DISCUSIÓN

La IL-17A es una citocina pleiotrópica producida por diversos tipos de células y que se ha asociado con diferentes tipos de cáncer. Esta citocina se ha relacionado con funciones protumorales en cáncer colorrectal (73,74), hepatocelular (75), pulmonar (76), pulmonar de células no pequeñas (77), de próstata (78), de ovario (54) y de mama (45); así como con funciones antitumorales en cáncer de células escamosas de esófago (79,80), cáncer colorrectal (44), cáncer de ovario (52) y cáncer gástrico (81). Varios de los hallazgos hechos sobre el papel de IL-17A en cáncer se han obtenido a partir de modelos murinos deficientes en IL-17A (54,55,68,82), y dado que existen varias células que expresan el receptor IL-17RA y reconocen esta citocina, los efectos atribuidos al papel pro o antitumoral de la citocina podrían ser la suma de efectos directos e indirectos.

En este trabajo, analizamos el efecto directo de la IL-17 sobre las células tumorales murinas ID8 de CaOv *in vitro* y confirmamos su papel en el desarrollo tumoral *in vivo* mediante la modificación del receptor IL-17RA. Demostramos que IL-17A en concentraciones de 10, 50 y 100 ng/mL induce la fosforilación de ERK1/2 a los 5 min después de la estimulación, la cual disminuye gradualmente después de los 30 min, alcanzando la fosforilación basal como se ha demostrado previamente (64,83). Sin embargo, la fosforilación de ERK no es dependiente de la concentración de la citocina IL-17A, tal como se ha demostrado anteriormente en otros tipos de células (84). Esto no descarta la posibilidad de que otras vías de señalización, como NF- κ B y C/EBP, respondan de manera dependiente de la concentración, aunque esto no fue analizado en este estudio.

Para determinar el efecto directo de la estimulación con IL-17 en células ID8, analizamos la proliferación celular, la apoptosis inducida por carboplatino y la migración celular, como se ha demostrado en otros tipos de células (45,48,85). Se encontró que las citocinas recombinantes murinas IL-17A, F y A/F no tienen un efecto en la proliferación celular *in vitro*, como se ha demostrado en estudios previos (48,86), pero esto es consistente con los resultados obtenidos en algunas células de cáncer de mama y cervical en donde no se observa un efecto sobre la proliferación celular (45,87).

Por otro lado, encontramos que la estimulación con IL-17A aumenta la sensibilidad de las células ID8 a carboplatino, induciendo apoptosis debido a un incremento en la proporción de células en apoptosis tardía. Esto contrasta con lo reportado previamente en células de cáncer de mama y cáncer de ovario humano (45,88,89). A nuestro conocimiento no se ha descrito que la IL-17 promueva la sensibilidad a la muerte inducida por carboplatino en células tumorales. Del mismo modo, los resultados de migración *in vitro* indican que la estimulación con IL-17A, F y A/F provoca una reducción en la migración celular, a diferencia de lo reportado previamente en células de cáncer de lengua, mama y nasofaríngeo (45,48,90). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las citocinas IL-17A, F y A/F, en la condición *in vitro*, tienen un efecto antitumoral debido a una mayor sensibilidad a la muerte por carboplatino y una disminución en la migración celular. A diferencia de otros tipos de células de cáncer de ovario, las células ID8 provienen de la superficie ovárica de ratones C57BL/6, por lo que, en sentido estricto, no son comparables con células de origen humano como las líneas celulares SKOV-3, OVCAR3, A2780, en donde se ha demostrado el papel protumorigénico de IL-17 (55,66). Además, recientemente se ha demostrado que IL-17F tiene la capacidad de señalar a través de un complejo homodimérico de receptor IL-17RC, lo que sugiere la posibilidad de una vía de señalización independiente del receptor IL-17RA (91). Es posible que la formación de complejos homodiméricos también ocurra en las células ID8, pero se necesitarían estudios adicionales para confirmar esta hipótesis.

Para abordar específicamente el efecto directo de la IL-17 sobre el receptor IL-17RA expresado en las células tumorales ID8 durante el desarrollo tumoral, se generaron células modificadas en el gen *IL17RA* mediante CRISPR-Cas9 a partir de células ID8-Defb29 Vegf-Luc. Se encontró que la modificación del IL-17RA genera un retraso en el crecimiento tumoral, acompañado de una reducción en la producción de ascitis. Esto resultó en un aumento en la supervivencia global de los ratones inoculados con células ID8dv-Luc- Δ IL-17RA. Estos resultados son consistentes con la función protumoral de los modelos murinos deficientes en IL-17A en CaOv (54,89). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que la reducción en el

crecimiento tumoral se debe a un efecto directo en las células tumorales y no a efectos indirectos causado por otros tipos de células inmunológicas.

A nuestro conocimiento, ésta, es la primera evidencia disponible que resalta que el receptor IL-17RA desempeña un papel protumoral directamente en las células tumorales ID8. La reducción en el crecimiento tumoral puede deberse a defectos en la proliferación; mientras que la reducción en la producción de ascitis podría deberse a una disminución de citocinas producidas por las células ID8 en respuesta a la IL-17, como la IL-6 y la IL-8, las cuales contribuyen al reclutamiento de células mieloides e inflamación peritoneal, aunque esta hipótesis no se abordó en este trabajo.

La discrepancia de los resultados obtenidos *in vivo* (efecto protumoral) versus *in vitro* (efecto antitumoral) podría deberse al microambiente tumoral presente en el peritoneo en el modelo murino; específicamente, la presencia de TNF- α que tiene un efecto sinérgico con IL-17 *in vitro* (92), lo que podría indicar que el efecto de IL-17 por sí solo no es suficiente para inducir efectos protumorales en las células ID8. Por lo tanto, nuestro trabajo sugiere que el IL-17RA promueve la tumorigénesis en un modelo murino de cáncer de ovario y muestra un papel crucial del receptor en el desarrollo del CaOv, lo que sugiere que podría ser un objetivo terapéutico prometedor en el campo de la inmunoterapia. Además, ahora se abre la posibilidad de utilizar terapias dirigidas contra el receptor IL-17RA en el contexto del cáncer de ovario mediante el uso de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra la citocina ligando IL-17A (Ixekezumab (93), secukinumab (94)) y contra el receptor IL-17RA (Brodalumab (95)), los cuales ya se consideran en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Estos hallazgos podrían tener un impacto significativo en el diseño de estrategias terapéuticas más efectivas para combatir esta enfermedad.

CONCLUSIÓN

En conclusión, este estudio respalda la hipótesis de que el eje IL-17A/IL-17RA promueve el desarrollo tumoral en un modelo murino de cáncer de ovario mediante un efecto directo en las células tumorales. La modificación del receptor IL-17RA retrasó el crecimiento tumoral y redujo la producción de ascitis, lo que resultó en una mayor supervivencia de los ratones. Estos hallazgos resaltan la importancia de considerar el receptor IL-17RA como un objetivo terapéutico en la inmunoterapia del cáncer de ovario. Esto podría tener implicaciones significativas en el diseño de estrategias terapéuticas más efectivas para combatir esta enfermedad.

PERSPECTIVAS

- Analizar el estado de activación de las moléculas efectoras de las vías de señalización descritas para IL-17A en la línea ID8dv-Luc- Δ IL-17RA que pudieran estar alteradas.
- Analizar el efecto sinérgico que tienen otras moléculas presentes en el microambiente tumoral (TNF) junto con IL-17A en el desarrollo tumoral *in vitro* e *in vivo*.
- Determinar el posible papel de IL-17A y el LA en el metabolismo de lípidos en el desarrollo tumoral.
- Evaluar el efecto de anticuerpos monoclonales dirigidos contra IL-17RA en el desarrollo tumoral en el modelo murino de células ID8 de CaOv.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stewart C, Ralyea C, Lockwood S. Ovarian cancer: an integrated review. In Elsevier; 2019. p. 151–6.
2. Gallardo-Rincón D. COI: Cáncer de ovario epitelial (primera ed.). 1ra ed. PyDESA; 2016. 220 p.
3. La Vecchia C. Ovarian cancer. *European journal of cancer prevention*. 2017;26(1):55–62.
4. Roett MA, Evans P. Ovarian cancer: an overview. *American family physician*. 2009;80(6):609–16.
5. Worzfeld T, Pogge von Strandmann E, Huber M, Adhikary T, Wagner U, Reinartz S, et al. The unique molecular and cellular microenvironment of ovarian cancer. *Frontiers in oncology*. 2017;7:24.
6. Kipps E, Tan DS, Kaye SB. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nature Reviews Cancer*. 2013;13(4):273–82.
7. Lopez R, Paul J, Atkinson R, Soukop M, Kitchener H, Fullerton W, et al. Prognostic factor analysis, for patients with no evidence of disease after initial chemotherapy for advanced epithelial ovarian carcinoma. *International Journal of Gynecological Cancer*. 1996;6(1):8–14.
8. Pereira JF, Jordan P, Matos P. A Signaling View into the Inflammatory Tumor Microenvironment. *Immuno*. 2021;1(2):91–118.
9. Ignacio RMC, Lee ES, Wilson AJ, Beeghly-Fadiel A, Whalen MM, Son DS. Obesity-induced peritoneal dissemination of ovarian cancer and dominant recruitment of macrophages in ascites. *Immune Network*. 2018;18(6).
10. Matte I, Lane D, Laplante C, Rancourt C, Piché A. Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *American journal of cancer research*. 2012;2(5):566.
11. So KA, Min KJ, Hong JH, Lee JK. Interleukin-6 expression by interactions between gynecologic cancer cells and human mesenchymal stem cells promotes epithelial-mesenchymal transition. *International journal of oncology*. 2015;47(4):1451–9.
12. Kitagawa K, Murata A, Matsuura N, Tohya K, Takaichi S, Monden M, et al. Epithelial-mesenchymal transformation of a newly established cell line from ovarian adenocarcinoma by transforming growth factor- β 1. *International journal of cancer*. 1996;66(1):91–7.
13. Yang Y, Yang Y, Yang J, Zhao X, Wei X. Tumor microenvironment in ovarian cancer: function and therapeutic strategy. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2020;8:758.
14. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *nature*. 2008;454(7203):436–44.

15. Kisielewski R, Mazurek A, Laudański P, Tolwińska A. Inflammation and ovarian cancer—current views. *Ginekologia polska*. 2013;84(4).
16. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging microbes & infections*. 2013;2(1):1–5.
17. Kramer JM, Gaffen SL. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *Journal of periodontology*. 2007;78(6):1083–93.
18. Zhao J, Chen X, Herjan T, Li X. The role of interleukin-17 in tumor development and progression. *Journal of Experimental Medicine*. 2019;217(1):e20190297.
19. Savant SS, Sriramkumar S, O’Hagan HM. The role of inflammation and inflammatory mediators in the development, progression, metastasis, and chemoresistance of epithelial ovarian cancer. *Cancers*. 2018;10(8):251.
20. Rouvier E, Luciani M, Mattei M, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *Journal of Immunology (Baltimore, Md: 1950)*. 1993;150(12):5445–56.
21. Song X, Zhu S, Shi P, Liu Y, Shi Y, Levin SD, et al. IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nature immunology*. 2011;12(12):1151–8.
22. Starnes T, Broxmeyer HE, Robertson MJ, Hromas R. Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis. *The Journal of Immunology*. 2002;169(2):642–6.
23. Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*. 2010;129(3):311–21.
24. Ge Y, Huang M, Yao Y ming. Biology of interleukin-17 and its pathophysiological significance in sepsis. *Frontiers in immunology*. 2020;11:1558.
25. Kostareva O, Gabdulkhakov A, Kolyadenko I, Garber M, Tishchenko S. Interleukin-17: functional and structural features, application as a therapeutic target. *Biochemistry (Moscow)*. 2019;84:193–205.
26. Song X, Wei C, Li X. The potential role and status of IL-17 family cytokines in breast cancer. *International Immunopharmacology*. 2021;95:107544.
27. Wu L, Chen X, Zhao J, Martin B, Zepp JA, Ko JS, et al. A novel IL-17 signaling pathway controlling keratinocyte proliferation and tumorigenesis via the TRAF4–ERK5 axis. *Journal of Experimental Medicine*. 2015;212(10):1571–87.
28. Ahmed M, Gaffen SL. IL-17 inhibits adipogenesis in part via C/EBP α , PPAR γ and Krüppel-like factors. *Cytokine*. 2013;61(3):898–905.
29. Sønder SU, Saret S, Tang W, Sturdevant DE, Porcella SF, Siebenlist U. IL-17-induced NF- κ B activation via CIKS/Act1: physiologic significance and signaling mechanisms. *Journal of biological chemistry*. 2011;286(15):12881–90.
30. Li J, Casanova JL, Puel A. Mucocutaneous IL-17 immunity in mice and humans: host defense vs. excessive inflammation. *Mucosal immunology*. 2018;11(3):581–9.

31. Brembilla NC, Senra L, Boehncke WH. The IL-17 family of cytokines in psoriasis: IL-17A and beyond. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1682.
32. Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *Journal of leukocyte biology*. 2002;71(1):1–8.
33. Shen F, Li N, Gade P, Kalvakolanu DV, Weibley T, Doble B, et al. IL-17 receptor signaling inhibits C/EBP β by sequential phosphorylation of the regulatory 2 domain. *Science signaling*. 2009;2(59):ra8–ra8.
34. Maitra A, Shen F, Hanel W, Mossman K, Tocker J, Swart D, et al. Distinct functional motifs within the IL-17 receptor regulate signal transduction and target gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(18):7506–11.
35. Kramer JM, Hanel W, Shen F, Isik N, Malone JP, Maitra A, et al. Cutting edge: identification of a pre-ligand assembly domain (PLAD) and ligand binding site in the IL-17 receptor. *The Journal of Immunology*. 2007;179(10):6379–83.
36. Novatchkova M, Leibbrandt A, Werzowa J, Neubüser A, Eisenhaber F. The STIR-domain superfamily in signal transduction, development and immunity. *Trends in biochemical sciences*. 2003;28(5):226–9.
37. Onishi RM, Park SJ, Hanel W, Ho AW, Maitra A, Gaffen SL. SEF/IL-17R (SEFIR) is not enough: an extended SEFIR domain is required for il-17RA-mediated signal transduction. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(43):32751–9.
38. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(8):556–67.
39. Mojsilović S, Trivanović D, Krstić J, Santibanez JF. Interleukin-17 Receptor A [Internet]. Choi S, editor. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 2702–7. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_101716
40. Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Current opinion in immunology*. 2011;23(5):613–9.
41. Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *The Journal of Immunology*. 2009;183(7):4169–75.
42. Qian X, Chen H, Wu X, Hu L, Huang Q, Jin Y. Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis. *Cytokine*. 2017;89:34–44.
43. Wu Z, He D, Zhao S, Wang H. IL-17A/IL-17RA promotes invasion and activates MMP-2 and MMP-9 expression via p38 MAPK signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2019;455:195–206.
44. Lin Y, Xu J, Su H, Zhong W, Yuan Y, Yu Z, et al. Interleukin-17 is a favorable prognostic marker for colorectal cancer. *Clinical and Translational Oncology*. 2015;17:50–6.
45. Cochaud S, Giustiniani J, Thomas C, Laprevotte E, Garbar C, Savoye AM, et al. IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and

- proliferation through ERK1/2. *Scientific reports*. 2013;3(1):1–10.
46. Li J, Lau GKK, Chen L, Dong S sui, Lan HY, Huang XR, et al. Interleukin 17A promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF-kB induced matrix metalloproteinases 2 and 9 expression. *PloS one*. 2011;6(7):e21816.
 47. Liu S, Zhang Q, Chen C, Ge D, Qu Y, Chen R, et al. Hyperinsulinemia enhances interleukin-17-induced inflammation to promote prostate cancer development in obese mice through inhibiting glycogen synthase kinase 3-mediated phosphorylation and degradation of interleukin-17 receptor. *Oncotarget*. 2016;7(12):13651.
 48. Wei T, Cong X, Wang XT, Xu XJ, Min SN, Ye P, et al. Interleukin-17A promotes tongue squamous cell carcinoma metastasis through activating miR-23b/versican pathway. *Oncotarget*. 2017;8(4):6663.
 49. Llosa NJ, Geis AL, Thiele Orberg E, Housseau F. Interleukin-17 and type 17 helper T cells in cancer management and research. *ImmunoTargets and therapy*. 2014;39–54.
 50. Kato T, Furumoto H, Ogura T, Onishi Y, Irahara M, Yamano S, et al. Expression of IL-17 mRNA in ovarian cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;282(3):735–8.
 51. Tang Y, Dou H, Zhang Q, Liu J, Yang X. Expression of inflammatory cytokines in ovarian epithelial cancer and their correlation. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 2017;31(2):413–8.
 52. Lan C, Huang X, Lin S, Huang H, Cai Q, Lu J, et al. High density of IL-17-producing cells is associated with improved prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. *Cell and tissue research*. 2013;352:351–9.
 53. Xiang T, Long H, He L, Han X, Lin K, Liang Z, et al. Interleukin-17 produced by tumor microenvironment promotes self-renewal of CD133+ cancer stem-like cells in ovarian cancer. *Oncogene*. 2015;34(2):165–76.
 54. Rei M, Gonçalves-Sousa N, Lança T, Thompson RG, Mensurado S, Balkwill FR, et al. Murine CD27 (-) V γ 6 (+) $\gamma\delta$ T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(34):E3562–70.
 55. Yu C, Niu X, Du Y, Chen Y, Liu X, Xu L, et al. IL-17A promotes fatty acid uptake through the IL-17A/IL-17RA/p-STAT3/FABP4 axis to fuel ovarian cancer growth in an adipocyte-rich microenvironment. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2020;69:115–26.
 56. Roby KF, Taylor CC, Sweetwood JP, Cheng Y, Pace JL, Tawfik O, et al. Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. *Carcinogenesis*. 2000;21(4):585–91.
 57. Cho S, Sun Y, Soisson AP, Dodson MK, Peterson CM, Jarboe EA, et al. Characterization and evaluation of pre-clinical suitability of a syngeneic orthotopic mouse ovarian cancer model. *Anticancer research*. 2013;33(4):1317–

- 24.
58. Conejo-Garcia JR, Benencia F, Courreges MC, Kang E, Mohamed-Hadley A, Buckanovich RJ, et al. Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a β -defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A. *Nature medicine*. 2004;10(9):950–8.
 59. Chambers LM, Esakov E, Braley C, AlHilli M, Michener C, Reizes O. Use of Transabdominal Ultrasound for the detection of intra-peritoneal tumor engraftment and growth in mouse xenografts of epithelial ovarian cancer. *PLoS One*. 2020;15(4):e0228511.
 60. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*. 2013;8(11):2281–308.
 61. Cai Q, Fan Q, Buechlein A, Miller D, Nephew KP, Liu S, et al. Changes in mRNA/protein expression and signaling pathways in in vivo passaged mouse ovarian cancer cells. *PLoS One*. 2018;13(6):e0197404.
 62. Kramer JM, Yi L, Shen F, Maitra A, Jiao X, Jin T, et al. Cutting edge: evidence for ligand-independent multimerization of the IL-17 receptor. *The Journal of Immunology*. 2006;176(2):711–5.
 63. Chu TY, Chu SC, Khine AA, Chen PC, Lee MH, Huang HS. Effect of ovulation IGF and HGF signaling on the oncogenesis of murine epithelial ovarian cancer cell ID8. *Experimental Cell Research*. 2022;419(2):113323.
 64. Xing X, Yang J, Yang X, Wei Y, Zhu L, Gao D, et al. IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via the ERK signaling pathway. *PloS one*. 2013;8(12):e85032.
 65. Tsai YF, Huang CC, Lin YS, Hsu CY, Huang CP, Liu CY, et al. Interleukin 17A promotes cell migration, enhances anoikis resistance, and creates a microenvironment suitable for triple negative breast cancer tumor metastasis. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2021;70:2339–51.
 66. Guo N, Shen G, Zhang Y, Moustafa AA, Ge D, You Z. Interleukin-17 promotes migration and invasion of human cancer cells through upregulation of MTA1 expression. *Frontiers in oncology*. 2019;9:546.
 67. Liu W, Xin M, Li Q, Sun L, Han X, Wang J. IL-17A Promotes the Migration, Invasion and the EMT Process of Lung Cancer Accompanied by NLRP3 Activation. *BioMed Research International*. 2022;2022.
 68. Ma S, Cheng Q, Cai Y, Gong H, Wu Y, Yu X, et al. IL-17A Produced by $\gamma\delta$ T Cells Promotes Tumor Growth in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer research*. 2014;74(7):1969–82.
 69. Li Y, Cao ZY, Sun B, Wang GY, Fu Z, Liu YM, et al. Effects of IL-17A on the occurrence of lung adenocarcinoma. *Cancer biology & therapy*. 2011;12(7):610–6.
 70. Lv Q, Wu K, Liu F, Wu W, Chen Y, Zhang W. Interleukin-17A and heparanase

- promote angiogenesis and cell proliferation and invasion in cervical cancer. *International Journal of Oncology*. 2018;53(4):1809–17.
71. Feng M, Wang Y, Chen K, Bian Z, Wu J, Gao Q. IL-17A promotes the migration and invasiveness of cervical cancer cells by coordinately activating MMPs expression via the p38/NF- κ B signal pathway. *PLoS One*. 2014;9(9):e108502.
 72. Ren H, Wang Z, Zhang S, Ma H, Wang Y, Jia L, et al. IL-17A promotes the migration and invasiveness of colorectal cancer cells through NF- κ B-mediated MMP expression. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*. 2016;23(5):249–56.
 73. Housseau F, Wu S, Wick EC, Fan H, Wu X, Llosa NJ, et al. Redundant innate and adaptive sources of IL17 production drive colon TumorigenesisIL17 and microbial-induced colon cancer. *Cancer research*. 2016;76(8):2115–24.
 74. Liu J, Duan Y, Cheng X, Chen X, Xie W, Long H, et al. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;407(2):348–54.
 75. Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of hepatology*. 2009;50(5):980–9.
 76. Bao Z, Lu G, Cui D, Yao Y, Yang G, Zhou J. IL-17A-producing T cells are associated with the progression of lung adenocarcinoma. *Oncology Reports*. 2016;36(2):641–50.
 77. Pan B, Shen J, Cao J, Zhou Y, Shang L, Jin S, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Scientific reports*. 2015;5(1):16053.
 78. Zhang Q, Liu S, Parajuli KR, Zhang W, Zhang K, Mo Z, et al. Interleukin-17 promotes prostate cancer via MMP7-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2017;36(5):687–99.
 79. Lv L, Pan K, Li X dong, She K lin, Zhao J jing, Wang W, et al. The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma. *PloS one*. 2011;6(3):e18219.
 80. Wang B, Li L, Liao Y, Li J, Yu X, Zhang Y, et al. Mast cells expressing interleukin 17 in the muscularis propria predict a favorable prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2013;62:1575–85.
 81. Chen J gao, Xia J chuan, Liang X ting, Pan K, Wang W, Lv L, et al. Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients. *International journal of biological sciences*. 2011;7(1):53.
 82. Hyun YS, Han DS, Lee AR, Eun CS, Youn J, Kim HY. Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis*. 2012;33(4):931–6.

83. Zijlstra GJ, Ten Hacken NHT, Hoffmann RF, Van Oosterhout AJM, Heijink IH. Interleukin-17A induces glucocorticoid insensitivity in human bronchial epithelial cells. *European Respiratory Journal*. 2012;39(2):439–45.
84. Iyoda M, Shibata T, Kawaguchi M, Hizawa N, Yamaoka T, Kokubu F, et al. IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF- α and IL-1 β . *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2010;298(3):F779–87.
85. Liu D, Zhang R, Wu J, Pu Y, Yin X, Cheng Y, et al. Interleukin-17A promotes esophageal adenocarcinoma cell invasiveness through ROS-dependent, NF- κ B-mediated MMP-2/9 activation. *Oncology Reports*. 2017;37(3):1779–85.
86. Chang Y, Al-Alwan L, Risse PA, Halayko AJ, Martin JG, Baglole CJ, et al. Th17-associated cytokines promote human airway smooth muscle cell proliferation. *The FASEB Journal*. 2012;26(12):5152–60.
87. Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, et al. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer research*. 1999;59(15):3698–704.
88. Wang L, Zhang X, Wang B, Zhang J, Li Y. IL-17A/IL-17RA reduces cisplatin sensitivity of ovarian cancer SKOV3 cells by regulating autophagy. *Nan Fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*. 2020;40(11):1550–6.
89. Niu X, Liu W, Wang Y, Liu X, Zhang H, Li Z, et al. IL-17A exacerbates cisplatin-based resistance of OVCA via upregulating the expression of ABCG2 and MDR1 through Gli1-mediated Hh signaling. *Oncotarget*. 2016;5.
90. Wang L, Ma R, Kang Z, Zhang Y, Ding H, Guo W, et al. Effect of IL-17A on the migration and invasion of NPC cells and related mechanisms. *PLoS one*. 2014;9(9):e108060.
91. Goepfert A, Lehmann S, Blank J, Kolbinger F, Rondeau JM. Structural analysis reveals that the cytokine IL-17F forms a homodimeric complex with receptor IL-17RC to drive IL-17RA-independent signaling. *Immunity*. 2020;52(3):499-512. e5.
92. Noack M, Beringer A, Miossec P. Additive or synergistic interactions between IL-17A or IL-17F and TNF or IL-1 β depend on the cell type. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:1726.
93. Toussirot E. Ixekizumab: an anti-IL-17A monoclonal antibody for the treatment of psoriatic arthritis. *Expert opinion on biological therapy*. 2018;18(1):101–7.
94. Patel DD, Lee DM, Kolbinger F, Antoni C. Effect of IL-17A blockade with secukinumab in autoimmune diseases. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72(suppl 2):iii116–23.
95. Bauer E, Lucier J, Furst DE. Brodalumab-an IL-17RA monoclonal antibody for psoriasis and psoriatic arthritis. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2015;15(6):883–93.