

**UACM**

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

*Nada humano me es ajeno*

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD  
DE MÉXICO**

**COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**“Estudio de la señalización del IFN-gamma sobre  
los niveles de ISG15/ISGilación y su efecto sobre  
la viabilidad y migración en células de  
meduloblastoma”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENR EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS**

**P R E S E N T A:**

**KAREN HAIDEE MEDINA ABREU**

**DIRECTORA:**

Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz

**CODIRECTORA:**

Dra. Marina Macías Silva

**POSGRADO EN  
CIENCIAS  
GENÓMICAS**

Ciudad de México, 2025.

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

#### DERECHOS RESERVADOS ©

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

## **COMITÉ DE CERTIFICACIÓN:**

Presidente: Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez, UACM  
Secretario: Dra. Lilia López Cánovas, UACM  
Vocal: Dra. Marina Macias Silva, UNAM

Plantel de Adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

### **DIRECTORA:**

Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

### **CO-DIRECTORA:**

Dra. Marina Macías Silva

Universidad Nacional Autónoma de México

### **LECTORES:**

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez, UACM

Dra. Lilia López Cánovas, UACM

Dr. Máximo Berto Martínez Benítez, UACM

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de maestría fue apoyada por los Proyectos de Investigación del Colegio de Ciencia y Tecnología (CCyT) de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México con el número de folio CCYT-2024-CON-07, para la Dra. Ángeles-Tecalco como responsable de este proyecto.

El desarrollo experimental de esta tesis se llevó a cabo en el cubículo A-38 del Posgrado de Ciencias Genómicas del Plantel del Valle UACM y en el laboratorio 224-Norte del Instituto de Fisiología Celular (IFC) UNAM.

Se agradece la beca que CONAHCyT me otorgó para los estudios de Maestría en Ciencias Genómicas de la UACM.

### Agradezco principalmente:

A la Dra. Ángeles C. Tecalco Cruz por su apoyo, paciencia y resiliencia para que yo lograré realizar este proyecto con éxito. Por siempre ayudarme a avanzar y sacar mi mejor versión.

A la Dra. Marina Macias Silva por su invaluable ayuda a lo largo de todo el proyecto.

A la Bióloga Marcela Sosa Garrocho por su apoyo y disposición para realizar experimentos en conjunto.

A la Dra. Gabriela Velasco Loyden por su apoyo y contribución en la IHQ.

A la Maestra en CG Eva Guadalupe Palacios Serrato por su paciencia, apoyo y acompañamiento en el aprendizaje de nuevas técnicas.

A la Dra. Bibiana Ortega Domínguez por su paciencia, amabilidad, consejos y conocimiento que contribuyeron en la mejora de mi proyecto.

A la unidad de Microscopia del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, principalmente al Dr. Nicolas Jiménez Pérez.

A la Dra. Lilia López Cánovas y a la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez por su asesoramiento y revisión activa a lo largo de este proyecto.

A el Dr. Máximo Berto Martínez Benítez por apoyarme para la mejora de mi trabajo escrito.

A el Dr. Valentín Mendoza por su contribución de reactivos para la conclusión de este proyecto.

A el Dr. Jesús Zepeda Cervantes de la Facultad de Veterinaria de la UNAM por su contribución teórica y de insumos que permitieron la culminación satisfactoria de este proyecto.

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres Humberto Medina Maya y Virginia Abreu Montufar, porque sin ellos nada de esto sería posible, gracias por sus consejos que me impulsaron cada día, por su ejemplo que me recordó que todo es posible y por su cariño que me mantuvo en los días más difíciles.

A mis tías Guadalupe Abreu, Natividad Abreu, Isabel Abreu, María Toquilla, Luisa Abreu, Ana María Gaspar y Graciela Gaspar por su invaluable ayuda, por siempre tenerme en sus oraciones. Y a todos los miembros de mi familia que siempre han estado para mí.

A Marco Medina quien siempre creyó en mí y compartió este sueño conmigo, que, aunque hoy no está para verlo realizado, confió en que cuando nos encontremos el estará muy feliz al ver todo lo que he logrado.

A mis amigos Itzel Acosta, Carlos Canales, Alan Anguiano, Alejandro Castillo, Yara Quinto y Venus quienes siempre me han apoyado, querido y procurado, por lo cual estoy muy agradecida, son una luz que ilumina mi camino.

A mis personas especiales, David Olguin e Ian de quienes he aprendido mucho, gracias por contagiarme de la fortaleza que tienen ante la vida.

A mi amiga Eva Serrato, por ser mi compañera en esta aventura, gracias por acompañarme en los días buenos y en los malos, y por enseñarme tanto al recordarme el sentido de la vida. A mis compañeros Enrique Oropeza, Siu y Norma, por su apoyo, paciencia, y buenas palabras que siempre tenían para mí.

A mis compañeros del Laboratorio, Chris y David quienes siempre me sacaban una sonrisa y estuvieron dispuestos a ayudarme. A mis amigos David, Mayris y Karla por su apoyo y motivación que me acompañaron a lo largo de esta travesía.

A todos los que la vida nos hizo familia y que siempre me han querido y apoyado.

Finalmente, solo puedo agradecerle a Dios quien me permitió concluir esta etapa de mi vida.

# ÍNDICE

## TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABLAS .....	8
ABREVIATURAS.....	9
RESUMEN .....	11
ABSTRACT .....	12
INTRODUCCIÓN .....	14
Tumores del SNC.....	16
Tumores pediátricos del SNC.....	23
Meduloblastoma (MB) .....	24
Subgrupos de MB.....	26
Diagnóstico de MB .....	28
Tratamientos para MB.....	29
Interferones (IFN) .....	31
Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).....	31
Vía del IFN- $\gamma$ .....	33
ISG15/ISGilación.....	35
ISG15 Libre .....	37
ISGilación.....	38
ANTECEDENTES .....	42
El efecto pro-tumor o anti-tumor del IFN- $\gamma$ .....	42
IFN- $\gamma$ en glioblastoma .....	45
ISG15/ISGilación en cáncer .....	46
IFN- $\gamma$ , ISG15/ISGilación .....	47
ISG15 en MB.....	48
JUSTIFICACIÓN .....	49
HIPÓTESIS .....	49
OBJETIVOS .....	50
Objetivo General .....	50
Objetivos específicos .....	50
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	51

MATERIALES Y MÉTODOS .....	51
Línea celular .....	52
Cultivo celular y tratamiento con IFN- $\gamma$ .....	52
Microarreglo de tejido e inmunohistoquímica (IHQ) .....	53
Análisis histológico de la IHQ.....	53
Transfección transitoria con plásmido para sobreexpresar a ISG15 .....	54
Obtención de extractos totales y fraccionamiento subcelular.....	54
Electroforesis SDS-PAGE y Western blot .....	55
Ensayo de inmunofluorescencia.....	56
Técnica calceína Yoduro de propidio .....	57
Ensayo de cierre de herida.....	57
Análisis estadístico.....	57
RESULTADOS .....	58
DISCUSIÓN .....	76
CONCLUSIÓN .....	80
PERSPECTIVAS.....	80
REFERENCIAS.....	81

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> El Sistema Nervioso Central:.....	15
<b>Figura 2:</b> El cerebelo coordina vías sensitivas y motoras.....	16
<b>Figura 3:</b> Gráfica de pastel de la incidencia de tumores del SNC y del cerebro en países de América latina y el caribe.....	24
<b>Figura 4:</b> Comparativa de los subgrupos moleculares de MB.....	28
<b>Figura 5:</b> Imagen de resonancia magnética nuclear.....	29
<b>Figura 6:</b> Tipos de IFN y sus vías de transducción de señales.....	32
<b>Figura 7:</b> Vía de señalización del IFN- $\gamma$ .....	34
<b>Figura 8:</b> ISG15 y el sistema de ISGilación.....	36
<b>Figura 10:</b> Proteínas blanco de ISGilación.....	40
<b>Figura 11:</b> Ubiquitinación dependiente de ISGilación.....	41
<b>Figura 12:</b> Dualidad del IFN- $\gamma$ en cáncer.....	42
<b>Figura 13:</b> La expresión de los elementos de la vía del IFN- $\gamma$ .....	45
<b>Figura 14:</b> La expresión de ISG15 esta desregulada en cáncer.....	46
<b>Figura 15:</b> Expresión del gen de ISG15 en diferentes tipos de cáncer del SNC pediátrico.....	59
<b>Figura 16:</b> Gráficas de cajas y bigotes de la expresión de los elementos del sistema de ISGilación.....	60
<b>Figura 17:</b> Gráficas de cajas y bigotes de la expresión de elementos de la vía del IFN- $\gamma$ .....	62
<b>Figura 18:</b> Expresión de ISG15 y de los elementos del sistema de ISGilación en subgrupos de meduloblastoma humano.....	63
<b>Figura 19:</b> Análisis de la expresión de ISG15 con la supervivencia de los pacientes. Kaplan Meier para cada subgrupo de MB.....	64
<b>Figura 20:</b> Abundancia de ISG15 en meduloblastoma respecto a otros tumores pediátricos del SNC.....	65
<b>Figura 21:</b> IHQ de ISG15 en MB.....	67
<b>Figura 22:</b> Análisis de la expresión de ISG15 en líneas celulares de meduloblastoma humano.....	68
<b>Figura 23:</b> El estímulo con IFN- $\gamma$ [100 ng/ml] a las 24 horas incrementa a ISG15/ISGilación en la línea celular de meduloblastoma DAOY.....	69
<b>Figura 24:</b> Inmunofluorescencia de ISG15.....	70
<b>Figura 25:</b> El estímulo con IFN- $\gamma$ [100 ng/ml] a las 24 horas incrementa a ISG15/ISGilación principalmente en la fracción citoplasmática.....	71

<b>Figura 26:</b> Ensayo de cierre de herida.....	72
<b>Figura 27:</b> Ensayo de calceína/yoduro de propidio.....	73
<b>Figura 28:</b> Inmunoblot de la sobreexpresión de ISG15 en la línea celular DAOY.	74
<b>Figura 29:</b> Ensayo calceína-yoduro de propidio de la línea celular DAOY .....	75
<b>Figura 30:</b> Ensayo de cierre de herida, en la línea celular de Meduloblastoma DAOY .....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de la OMS para tumores embrionarios.....	15
Tabla 2: Efecto del IFN- $\gamma$ en cáncer.....	43

## ABREVIATURAS

- 4EHP:** proteína homóloga de eIF4E
- AUC:** Área bajo la curva
- CBTTC:** Del inglés The Childhood Brain Tumor Tissue Consortium
- DGL:** Diseminación leptomeningea
- DMEM:** Medio Eagle modificado Dulbecco
- EFP:** Proteína dedo responsiva al estrógeno
- eIF4E:** el factor de inicio eucarionte 4E
- FBS:** Suero fetal bovino
- G3:** Grupo 3
- G4:** Grupo 4
- GAS:** Secuencias gamma activado
- HERC5:** Enzima Dominio HECT y RLD
- HHARI:** Enzima Homóloga humano de Drosophila Ariadne
- IFN- $\gamma$ :** Interferón-gamma
- IFN:** Interferón
- IFNGR1:** Receptor de interferón gamma 1
- IFNGR2:** Receptor de interferón gamma 2
- IFN- $\alpha$ :** interferón alfa
- IHQ:** inmunohistoquímica
- ISG:** Gen estimulado por interferón
- ISG15:** Gen estimulado por interferón 15
- JAK:** Cinasa de Janus
- MB:** Meduloblastoma
- MKK4:** proteína cinasa 4 activada por mitógenos
- MPT:** Modificación postraducciona
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- p53:** Fosfoproteína 53
- RAC1:** proteínas sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada con Ras
- SHH:** Sonic Hedgehog
- SNC:** Sistema nervioso central

**SNP:** Sistema nervioso periférico

**STAT1:** Proteína transductora de señales 1

**TMA:** Microarreglo de tejido

**UALCAN:** University of Alabama at Birmingham Cancer Data Analysis Portal

**Ub:** Ubiquitina

**UBCH8:** Enzima conjugadoras de ubiquitina E2

**UBE1L:** Enzima activadora 1 del sistema ubiquitina-proteasoma

**USP18:** enzima peptidasa específica de ubiquitina 18

**WB:** Del Inglés Western Blot

**WNT:** Del Inglés Wingless

## RESUMEN

ISG15 (gen estimulado por interferón 15) es una pequeña proteína, similar a la ubiquitina, que puede ser detectada libre como una proteína de 15 kDa o conjugada a sus proteínas diana, mediante una modificación postraduccional llamada ISGilación, la cual requiere de la activación de un complejo enzimático. Actualmente se ha reportado que los niveles de ISG15/ISGilación están incrementados en algunos tipos de cáncer. También se ha reportado que, hay un eje de regulación positiva de ISG15/ISGilación por el IFN-gamma (IFN- $\gamma$ ) en cáncer de mama y en glioblastoma. Sin embargo, la expresión y la modulación de ISG15 en tumores pediátricos del sistema nervioso central (SNC) aún son desconocidos.

El meduloblastoma (MB) es un tipo de tumor maligno que se desarrolla en el cerebelo, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se encuentra en la clasificación de tumores embrionarios, se caracteriza por ser de grado 4 y tiene mayor prevalencia en niños de 0 a 14 años. Sin embargo, se requieren más estudios moleculares para explorar la expresión de ISG15 y su modulación por IFN- $\gamma$  en este tipo de cáncer.

En este trabajo analizamos la expresión de *ISG15* en muestras de pacientes con MB utilizando diferentes bases de datos públicas (Oncopression, UALCAN-CBTTC, R2 Genomics) y examinamos mediante inmunohistoquímica la abundancia de la proteína ISG15 utilizando un microarreglo de tejido que contenía muestras de MB. Además, utilizamos la línea celular DAOY, tratada y sin tratar con IFN- $\gamma$ , para determinar la abundancia de ISG15/ISGilación mediante ensayos de inmunoblots, mientras que la distribución subcelular de la ISG15 libre y conjugada fue evaluada por enriquecimiento subcelular e inmunofluorescencia. Determinamos el efecto del IFN- $\gamma$  y la sobreexpresión de ISG15 mediante ensayos funcionales. En estos ensayos utilizamos la técnica de calceína/yoduro de propidio para evaluar la viabilidad celular, mientras que para evaluar la migración celular empleamos el ensayo de cierre de herida.

Nuestros resultados indican que los niveles de expresión de ISG15 influyen en la supervivencia de los pacientes con MB, dependiendo del subgrupo molecular de

MB, y podría ser útil como marcador pronóstico; además la expresión y la abundancia de ISG15 se encuentra disminuida en muestras tumorales de pacientes con MB en comparación con el tejido sano. La señalización del IFN-gamma aumenta los niveles de ISG15/ISGilación principalmente en el compartimento citoplasmático de las células DAOY de MB, pero no tiene efecto sobre la viabilidad y migración celular, un comportamiento similar al que encontramos al sobreexpresar a ISG15.

## ABSTRACT

ISG15 (interferon 15-stimulated gene) is a small ubiquitin-like protein that can be detected as a free protein of 15 kDa or as a conjugated protein to its target proteins by a post-translational modification called ISGylation, which requires the activation of an enzyme complex. It has been reported that ISG15/ISGylation levels are increased in some types of cancer and there is also evidence of an axis of positive regulation of ISG15/ISGylation by IFN-gamma (IFN- $\gamma$ ) in breast cancer and glioblastoma. However, the expression and modulation of ISG15 in pediatric central nervous system tumors are still poorly studied.

Medulloblastoma (MB) is a malignant tumor that develops in the cerebellum. According to the World Health Organization (WHO), it is classified as embryonal tumors, grade 4, and is most prevalent in children aged 0-14 years. However, more molecular studies are required to explore the expression of ISG15 and its modulation by IFN- $\gamma$  in this type of cancer.

In this study, we analyzed ISG15 expression in MB patient samples using different public databases (Oncoexpression, UALCAN-CBTTC, R2 Genomics). We also examined by immunohistochemistry the abundance of ISG15 using a tissue microarray containing MB samples. In addition, we used the DAOY cell line of MB

with and without IFN- $\gamma$  treatment, to determine the ISG15/ISGylation abundance by immunoblot, while the subcellular ISG15/ISGylation distribution was assessed by subcellular enrichment and immunofluorescence. We determined the effect of IFN- $\gamma$  and ISG15 overexpression by functional assays; we used the Calcein/propidium iodide technique to evaluate cell viability, while we employed the wound closure assay to assess cell migration.

Our results indicate that ISG15 expression levels influence MB patient survival, depending on the molecular subgroup of MB, and they could be useful as a prognostic marker; furthermore, ISG15 expression and abundance was reduced in tumor samples from MB patients compared to normal tissue. IFN-gamma signaling increased ISG15/ISGylation levels mainly in the cytoplasmic compartment of DAOY cells of MB but had no effect on cell viability and migration, similarly as when we overexpressed ISG15.

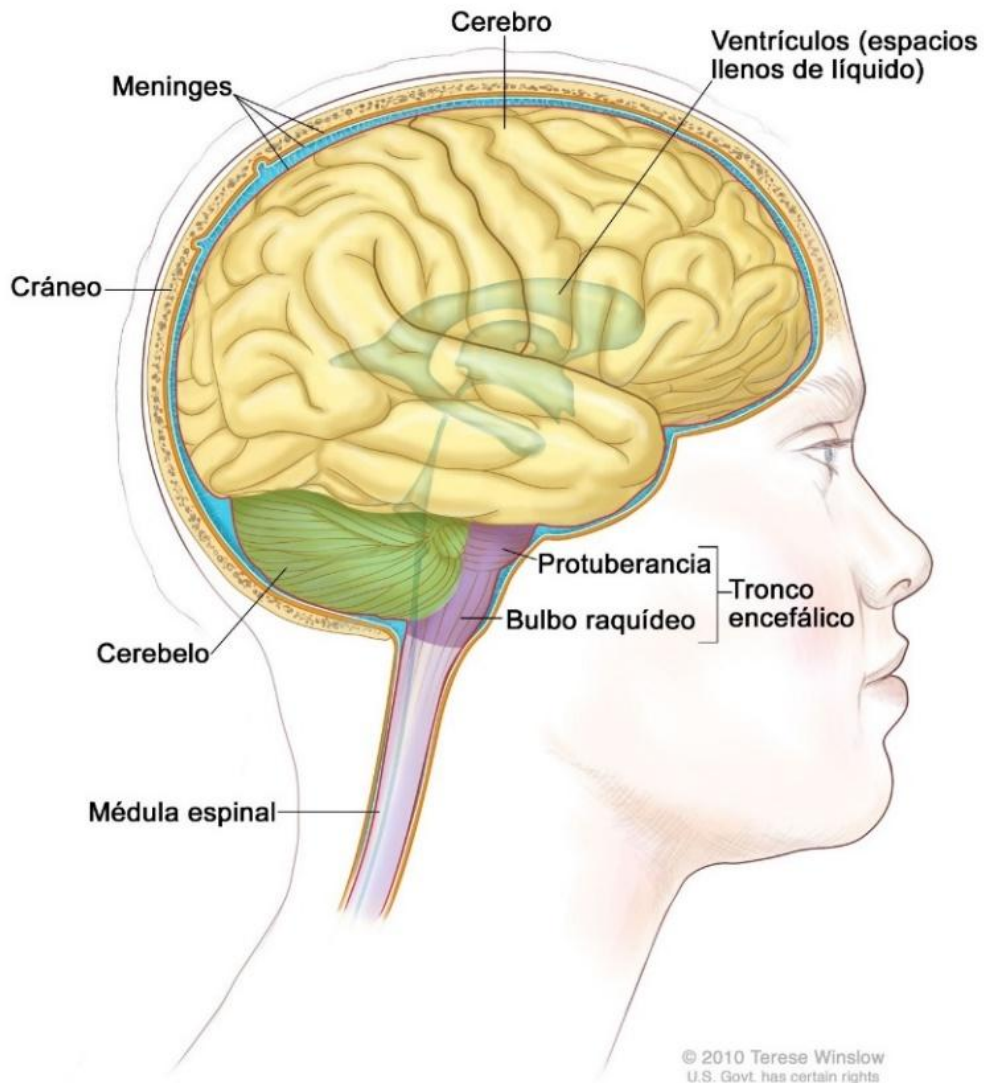
## INTRODUCCIÓN

El sistema nervioso se divide en dos subsistemas: el primero llamado sistema nervioso periférico (SNP) que lo conforman todos los tejidos nerviosos, y el segundo sistema nervioso central (SNC) formado por la médula espinal y el encéfalo (figura 1). El tejido nervioso está formado por neuronas y células de la neuroglia. La médula espinal se encuentra dentro del canal vertebral y se conecta con el encéfalo, el cual está formado por el cerebro, el cerebelo y el tronco encefálico (Arikan, 2018).

Las neuronas nos permiten pensar, razonar y controlar la actividad muscular. El encéfalo humano contiene alrededor de 100, 000 millones de neuronas, las cuales están sostenidas por un grupo de células denominadas neuroglia y las principales son: astrocitos, oligodendrocitos, microglías, células ependimarias, células de Schwann y células satélites (Arikan, 2018; López-Soto et al., 2018).

Un elemento muy importante del SNC es el cerebelo. El cerebelo es una parte del encéfalo que se encuentra en la porción posteroinferior de la cavidad craneal detrás del bulbo raquídeo y de la protuberancia (figura 1), se divide en vermis central y dos hemisferios cerebelosos (figura 2), los cuales a su vez están divididos en los lóbulos anterior y posterior. La función primaria del cerebelo es el control motriz y del equilibrio, es decir controla la contracción temporal de los músculos durante movimientos complejos (García-Porrero, 2014).

Dentro del SNC se pueden desarrollar diversas neuropatologías, entre ellas, la generación de tumores malignos, los cuales pueden tener diferente malignidad y desarrollarse en distintas etapas de la vida. A continuación, se describen las características de los tumores del SNC, con particular interés en el desarrollo tumoral en el cerebelo, conocido como meduloblastoma.



**Figura 1:** El Sistema Nervioso Central: está conformado por médula espinal y encéfalo el cual se divide en cerebelo, cerebro y tronco encefálico (protuberancia y bulbo raquídeo). El cráneo es una estructura ósea importante ya que cubre y protege al encéfalo, al igual que las meninges, las cuales son membranas con tejido conectivo que cubren todo el SNC. Los ventrículos cerebrales son cuatro cavidades que se encuentran en el centro del cerebro y que producen líquido cefalorraquídeo, el cual sale a la médula espinal para ser reabsorbido en el torrente sanguíneo. Imagen tomada de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/snc>



**Figura 2:** El cerebelo coordina vías sensitivas y motoras. Está formado por dos hemisferios cerebelosos en cuyo centro se encuentra una pequeña cavidad llamada vermis. Estructuralmente su cara anterior conecta al bulbo raquídeo con la protuberancia. El pedúnculo cerebeloso superior permite la conexión con el mesencéfalo. Imagen tomada de <http://www.facultad.efn.uncor.edu>

## Tumores del SNC

Los tumores malignos primarios que se desarrollan en el cerebro son la principal causa de muerte por tumores sólidos en niños, y la tercera causa de muerte en adolescentes (Buckner et al., 2007). Uno de los métodos de diagnóstico que se utiliza es la resonancia magnética nuclear que permite definir la extensión anatómica del tumor. Dentro de los principales síntomas que se presentan con esta enfermedad, se encuentran el dolor de cabeza, convulsiones y alteraciones en el compartimiento. El tratamiento depende del diagnóstico histológico y generalmente los tumores malignos son tratados por varias vías, como, por ejemplo: quimioterapia, cirugía y radioterapia. La resección quirúrgica tiene como finalidad reducir el efecto de la masa tumoral mientras se preserva la función neurológica; la radiación es el principal tratamiento para pacientes con tumores cerebrales metastásicos; en la quimioterapia, el agente más comúnmente utilizado es la temozolomida, pues cruza la barrera hematoencefálica y tiene un mejor efecto en el tratamiento (Buckner et al., 2007; Karachi et al., 2018; Ortiz Gómez et al., 2023).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) los tumores del cerebro pueden ser clasificados en diversos tipos, los cuales se indican en la siguiente lista.

- Gliomas, tumores glioneuronales y tumores neuronales:

Gliomas difusos de tipo adulto

Astrocitoma, IDH-mutante

Oligodendroglioma, IDH-mutante y 1p/19q-codeleciónado

Glioblastoma, tipo salvaje IDH

- Gliomas difusos de bajo grado de tipo pediátrico:

Astrocitoma difuso, MYB - o MYBL1 - alterado

Glioma angiocéntrico

Tumor neuroepitelial polimorfo de bajo grado del joven

Glioma difuso de bajo grado, alterado en la vía MAPK

- Gliomas difusos de alto grado de tipo pediátrico:

Glioma difuso de línea media, H3 K27-alterado

Glioma hemisférico difuso, H3 G34-mutante

Glioma difuso de alto grado de tipo pediátrico, H3-wildtype e IDH-wildtype

Glioma hemisférico de tipo infantil

- Gliomas astrocíticos circunscritos:

Astrocitoma pilocítico

Astrocitoma de alto grado con características piloides

Xantoastrocitoma pleomórfico

Astrocitoma subependimario de células gigantes

Glioma cordoideo

Astroblastoma, MN1 -alterado

- Tumores glioneuronales y neuronales:

Ganglioglioma

Ganglioglioma infantil desmoplásico / astrocitoma infantil desmoplásico

Tumor neuroepitelial disembrionárico

Tumor glioneuronal difuso con características similares a oligodendroglioma y grupos nucleares

Tumor glioneuronal papilar

Tumor glioneuronal formador de rosetas

Tumor glioneuronal mixoide

Tumor glioneuronal leptomeníngeo difuso

Gangliocitoma

Tumor neuronal multinodular y vacuolizante

Gangliocitoma cerebeloso displásico (enfermedad de Lhermitte-Duclos)

neurocitoma central

neurocitoma extraventricular

Liponeurocitoma cerebeloso

- Tumores ependimarios:

Ependimoma supratentorial

Ependimoma supratentorial, fusión ZFTA positiva

Ependimoma supratentorial, fusión YAP1 positiva

Ependimoma de fosa posterior

Ependimoma de fosa posterior, grupo PFA

Ependimoma de fosa posterior, grupo PFB

ependimoma espinal

Ependimoma espinal, MYCN -amplificado

Ependimoma mixopapilar

subependimoma

- Tumores del plexo coroideo:

Papiloma del plexo coroideo

Papiloma de plexo coroideo atípico

Carcinoma de plexo coroideo

- Tumores embrionarios:

Meduloblastoma

Meduloblastomas, definidos molecularmente

Meduloblastoma, activado por WNT

Meduloblastoma, activado por SHH y TP53 de tipo salvaje

Meduloblastoma, activado por SHH y mutante en TP53

Meduloblastoma, no WNT/no SHH

Meduloblastomas, definidos histológicamente

- Otros tumores embrionarios del SNC:

Tumor teratoideo/rabdoideo atípico

Tumor neuroepitelial cribiforme

Tumor embrionario con rosetas multicapa

Neuroblastoma del SNC, activado por FOXR2

Tumor del SNC con duplicación interna en tándem de BCOR

Tumor embrionario del SNC

- **Tumores pineales:**

Pineocitoma

Tumor del parénquima pineal de diferenciación intermedia

pineoblastoma

Tumor papilar de la región pineal

Tumor mixoide desmoplásico de la región pineal, SMARCB1 - mutante

- **Tumores de los nervios craneales y paraespinales:**

Schwanoma

Neurofibroma

Perineurioma

Tumor híbrido de la vaina nerviosa

Tumor maligno de la vaina del nervio melanótico

Tumor maligno de la vaina del nervio periférico

Paraganglioma

- **Meningiomas:**

Meningioma

- **Tumores mesenquimales, no meningoeliales:**

Tumores de tejidos blandos

Tumores fibroblásticos y miofibroblásticos

Tumor fibroso solitario

Tumores vasculares

Hemangiomas y malformaciones vasculares

hemangioblastoma

Tumores del músculo esquelético

Rabdomiosarcoma

Diferenciación incierta

Tumor mesenquimatoso intracraneal, fusión FET-CREB positiva

CIC -sarcoma reordenado

Sarcoma intracraneal primario, mutante DICER1

sarcoma de Ewing

- Tumores condroóseos:

Tumores condrogénicos

condrosarcoma mesenquimatoso

condrosarcoma

Tumores notocordales

Cordoma (incluyendo cordoma pobremente diferenciado)

- Tumores melanocíticos:

Neoplasias melanocíticas meníngeas difusas

Melanocitosis meníngea y melanomatosis meníngea

Neoplasias melanocíticas meníngeas circunscritas

Melanocitoma meníngeo y melanoma meníngeo

- Tumores hematolinfoides:

Linfomas

Linfomas del SNC

Linfoma primario difuso de células B grandes del SNC

Linfoma del SNC asociado a inmunodeficiencia

Granulomatosis linfomatoide

Linfoma intravascular de células B grandes

Varios linfomas raros en el SNC

Linfoma MALT de la duramadre

Otros linfomas de células B de bajo grado del SNC

Linfoma anaplásico de células grandes ( ALK +/ ALK -)

Linfomas de células T y NK/células T

- **Tumores histiocíticos:**

Enfermedad de Erdheim-Chester

Enfermedad de Rosai-Dorfman

Xantogranuloma juvenil

Histiocitosis de células de Langerhans

Sarcoma histiocítico

- **Tumores de células germinales:**

Teratoma maduro

Teratoma inmaduro

Teratoma con malignidad de tipo somático

germinoma

Carcinoma embrionario

Tumor del saco vitelino

coriocarcinoma

Tumor mixto de células germinales

- Tumores de la región selar:

Craneofaringioma adamantinomatoso

Craneofaringioma papilar

Pituicitoma, tumor de células granulares de la región selar y oncocitoma de células fusiformes

Adenoma hipofisario/PitNET

Blastoma hipofisario

- Metástasis al SNC:

Metástasis en el cerebro y el parénquima de la médula espinal

Metástasis a las meninges

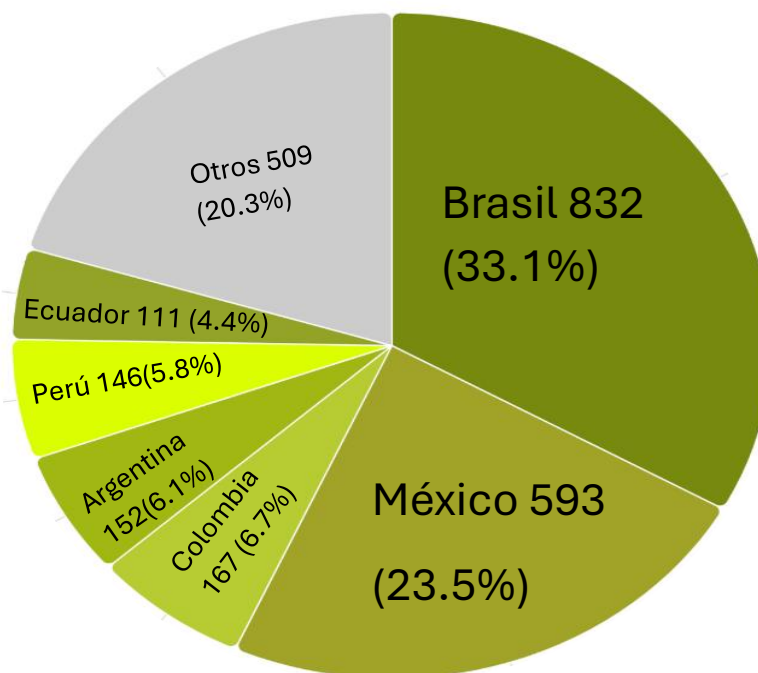
## Tumores pediátricos del SNC

Los tumores embrionarios constituyen el 20% de los tumores primarios del SNC presentados en niños, dentro de los cuales el meduloblastoma (MB) es el que prevalece, pues se ha visto que durante la infancia aproximadamente 1 de cada 200.000 personas es diagnosticada con MB (Miller et al., 2021; Schakelaar et al., 2023; Smoll & Drummond, 2012). De acuerdo con datos consultados en Globocan (Sung et al., 2021) hasta el 2022, para tumores del SNC y del cerebro en edades de 0 a 14 años para ambos sexos, México es el segundo país con mayor incidencia respecto a otros países de Latinoamérica y el Caribe (figura 3).

## Incidencia en ambos sexos, edad [0-14] hasta 2022

Cerebro, Sistema Nervios Central

Latinoamérica y el Caribe



**Figura 3:** Gráfica de pastel de la incidencia de tumores del SNC y del cerebro en países de América latina y el caribe, obtenida de Globocan 22 (versión 1.1) <https://gco.iarc.who.int/today>

### Meduloblastoma (MB)

El MB se encuentra en la categoría de tumores embrionarios de acuerdo con la clasificación de la OMS (tabla 1) y está caracterizado por ser altamente agresivo, es decir, de grado 4. La recurrencia de esta enfermedad casi siempre es fatal y ocurre en el 30% de los pacientes diagnosticados (Hill et al., 2020; Louis et al., 2021).

Tabla 1: Clasificación de la OMS para tumores embrionarios

Tumores embrionarios (Louis et al., 2021)
Meduloblastoma
Meduloblastoma molecularmente definido
Meduloblastoma WNT
Meduloblastoma SHH <i>TP53</i> no mutado
Meduloblastoma SHH <i>TP53</i> mutado
Meduloblastoma no WNT/ no SHH
Meduloblastoma histológicamente definido
Otros tumores embrionarios del SNC
Tumor teratoide rabdoide atípico
Tumor neuroepitelial cribiforme
Tumor embrionario con rosetas de capas múltiples
Neuroblastoma del SNC con activación de <i>FOXR2</i>
Tumor del SNC con duplicación interna en tándem de <i>BCOR</i>
Tumor embrionario del SNC, sin clasificar/sin otra indicación

El MB se desarrolla en el cerebelo y se considera que se origina de células progenitoras durante las primeras etapas de vida. La principal vía de metástasis es por diseminación leptomenígea (DGL), a través del líquido cefalorraquídeo, incrementando la mortalidad en pacientes (van Bree & Wilhelm, 2022). El MB es altamente heterogéneo y de acuerdo con su clasificación molecular está dividido en cuatro subgrupos principales: Wingless (WNT), Sonic Hedgehog (SHH), Grupo 3 (G3) y Grupo 4 (G4) los cuales difieren principalmente en las células que los originan, el pronóstico y las mutaciones presentes (Martínez León, 2011; Millard & De Braganca, 2016; Schakelaar et al., 2023; Taylor et al., 2012) (figura 4). Se han distinguido diferentes morfologías histopatológicas: clásica, desmoplásica/nodular (DN), MB con nodularidad extensa (MBEN), de células grandes y anaplásico (LC/A), dos subtipos WNT ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), cuatro SHH ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), tres subtipos de MB GR3 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) y tres GR4 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (Cavalli et al., 2017).

## Subgrupos de MB

El subgrupo WNT se caracteriza por presentar mutaciones en el gen que codifica para  $\beta$ -catenina, lo cual tiene como consecuencia un incremento en el crecimiento y la proliferación celular; representa aproximadamente 10% de todos los diagnósticos de MB. WNT- $\alpha$  se produce principalmente en niños de 10 años, presenta monosomía en el cromosoma 6 y muestra una supervivencia similar a la de WNT- $\beta$ , que está enriquecido principalmente en pacientes mayores (20 años), que en su mayoría son diploides para el cromosoma 6. Los tumores del subgrupo WNT se producen principalmente en el pedúnculo cerebeloso o en el ángulo pontocerebeloso (Cavalli et al., 2017; Schakelaar et al., 2023).

El MB SHH surge en los hemisferios cerebelosos laterales, representa la mayoría de los MB infantiles ( $\leq 3$  años) y en los adultos ( $\geq 17$  años). Los pacientes de este subgrupo abarcan el mayor rango de edades, comparado con la edad promedio en el resto de los subgrupos de MB. Además, se caracteriza por tener mutaciones en los elementos de la vía SHH, por lo que se subdivide en: SSH $\alpha$ , SSH $\beta$ , SSH $\gamma$  y SSH $\delta$ . Así mismo, presenta mutaciones en *TP53*, lo cual se ha relacionado con una menor supervivencia de los pacientes (Schakelaar et al., 2023; van Bree & Wilhelm, 2022).

El tumor tipo SHH $\alpha$  ocurre principalmente en niños de 3-16 años. En cuanto a sus características, estos tumores muestran amplificación de *MYCN*, *GLI2* y *YAP1*, además de pérdida de los cromosomas 9q, 10q y 17p y están enriquecidos con mutaciones en *TP53*, que se usa como indicador pronóstico en el MB SHH (Cavalli et al., 2017).

Los tumores SHH- $\beta$  afectan principalmente a bebés, con una edad promedio de 1.9 años, son metastásicos y además presentan deleciones en *PTEN*. Los tumores tipo SHH- $\gamma$  también ocurren en bebés y los del tipo SHH- $\delta$  son más frecuentes en adultos, pero tienen un pronóstico más favorable en comparación con los demás subtipos de SHH (Cavalli et al., 2017).

Los tumores MB SHH adultos se correlacionan con una mayor fracción de precursores de células granulares indiferenciadas, es decir presentan una alta expresión de ATOH1, lo cual se ha visto que puede promover la diseminación leptomenígea por la activación de los genes que codifican para las proteínas PDGFB y PDGFRB, implicados en la remodelación de la matriz extracelular y el citoesqueleto, mientras que los precursores de células granulares neuronales de los tumores SHH-MB pediátricos mostraron una alta expresión de *NEUROD* (Ayrault et al., 2010; Kool et al., 2014). Se ha descubierto que SHH impide la degradación de ATOH1 a través de la ligasa E3 de ubiquitina HUWE1, dando lugar a un asa autorreguladora positiva entre SHH y ATOH1 (van Bree & Wilhelm, 2022).

Los subgrupos 3 y 4 de MB se presentan con menor frecuencia, se caracterizan por la sobreexpresión de *MYC* y de *PRDM6* (Schakelaar et al., 2023). El subgrupo 3 se considera como el más agresivo dada la baja tasa de supervivencia de los pacientes. Se cree que los precursores tanto del grupo 3 como del grupo 4 de MB surgen de neuronas cerebelosas excitatorias (eCN) y de precursores de células unipolares en cepillo (UBC). Ambos subgrupos se encuentran generalmente en la línea media del cerebelo (Perreault et al., 2014; van Bree & Wilhelm, 2022).

A excepción de los tumores de MB tipo WNT, la mayoría de los MB muestran una barrera hematoencefálica intacta, lo que sugiere que la infiltración de células inmunes es limitada. Es importante destacar que los pacientes que presentan este subgrupo tienen un pronóstico más favorable, debido a que la barrera hematoencefálica se ha visto que es permeable, siendo más factibles a los tratamientos con agentes quimioterapéuticos (Eisemann & Wechsler-Reya, 2022; Schakelaar et al., 2023). El MB tipo SHH contiene una barrera hematoencefálica intacta, lo que hace que este tumor sea más resistente a la quimioterapia y por lo tanto más agresivo (Phoenix et al., 2016).

Subgrupo	WNT	SHH	Group 3	Group 4
<b>% de Casos</b>	10	30	25	35
<b>Edades en los que se presenta</b>				
<b>Relación (H:F)</b>	1:1	1:1	2:1	3:1
<b>Localización anatómica</b>				
<b>Histología</b>	Clásica	Clásica, Desmoplásica	Clásica	Clásica
<b>Metástasis</b>	5-10	15-20	40-45	35-40
<b>Patrón de recurrencia</b>	Local o metastásico	Local	Metastásico	Metastásico
<b>Pronóstico</b>	Muy bueno	Niños bueno, otros intermedio	Malo	Intermedio

**Figura 4:** Comparativa de los subgrupos moleculares de MB: Wingless (WNT), Sonic Hedgehog (SHH), Grupo 3 (G3) y Grupo 4 (G4). Existe una alta heterogeneidad en MB, por lo que cada uno de los subgrupos presenta características clínicas diferentes. Imagen modificada de (Juraschka & Taylor, 2019).

### Diagnóstico del MB

Para realizar el diagnóstico del MB se requiere del estudio de imágenes por resonancia magnética (figura 5) o tomografía computarizada. También se puede incluir el análisis de líquido cefalorraquídeo; sin embargo, se prefiere la resonancia magnética porque se puede observar mejor si hay diseminación tumoral (NCI, 2014).

Los principales síntomas que se presentan en los niños con MB son dolor de cabeza por incremento de la presión intracraneal, torpeza, náuseas, vómitos matutinos, fatiga y bajo rendimiento escolar.

Se ha observado que al realizar el diagnóstico de MB en niños menores de 3 años se logra un mejor pronóstico para el curso de la enfermedad (Von Bueren et al., 2011). Por lo anterior es que se requieren más estudios moleculares sobre esta enfermedad.



**Figura 5:** Imagen de resonancia magnética nuclear en el plano coronal de un paciente pediátrico con MB. En el círculo rojo se denota el tumor maligno de MB. Imagen tomada de (Quinlan & Rizzolo, 2017).

### Tratamientos para MB

Los tratamientos convencionales para tratar el MB consisten en resección quirúrgica, quimioterapia y radioterapia; sin embargo, el éxito del pronóstico depende de la extensión de la resección del tumor. Además, cabe mencionar que al irradiar todo el eje cráneo-espinal se producen una gran cantidad de efectos adversos como disfunción neuroendocrina, alteraciones y deformidades del crecimiento, discapacidad neurocognitiva, infertilidad y neoplasias malignas secundarias (Maier et al., 2021; Schakelaar et al., 2023). Por lo tanto, estos

tratamientos presentan una alta tasa de morbilidad y riesgos de tener efectos no deseados, como, por ejemplo, después de la cirugía, los pacientes pueden desarrollar problemas en el movimiento, el procesamiento lingüístico, habilidades espaciales y visuales, así como alteraciones de la modulación afectiva.

La radioterapia únicamente se aplica en pacientes mayores de 3 años y en estos se ha observado que disminuye su coeficiente intelectual, su memoria e incrementa la alopecia (Kralik et al., 2015); los niños menores de 4 años generalmente reciben un tratamiento con quimioterapias (De Braganca & Packer, 2013).

Se ha investigado cómo la radioterapia y la quimioterapia afectan a las células T circulantes en pacientes con MB y se descubrió que los pacientes tratados presentaron linfopenia de células T CD4+ (Gururangan et al., 2017), pues el tratamiento no elimina exclusivamente a las células cancerosas, sino que también puede causar un daño colateral a las células inmunes.

Además, el tratamiento del MB comúnmente incluye el uso de corticosteroides para aliviar los síntomas como dolor de cabeza y náuseas causadas por el incremento de la presión intracraneal; sin embargo, un efecto secundario que causan los esteroides es la inmunosupresión, por lo que podría estarse reduciendo la inmunidad antitumoral en estos pacientes (Liu et al., 2009).

Existen tratamientos que tienen como blancos los elementos de la vía SHH; sin embargo, no pueden ser administrados en pacientes pediátricos, por los efectos secundarios que presentan, como por ejemplo anomalías esqueléticas (Florence M G Cavalli et al., 2017; Hsiao et al., 2010).

La progresión rápida del MB y las secuelas que puede dejar conducen a la necesidad de generar investigaciones para establecer las rutas y los mediadores moleculares implicados en su desarrollo. En este trabajo, se abordó el estudio de la participación del IFN- $\gamma$  y de la proteína ISG15 en el contexto del MB.

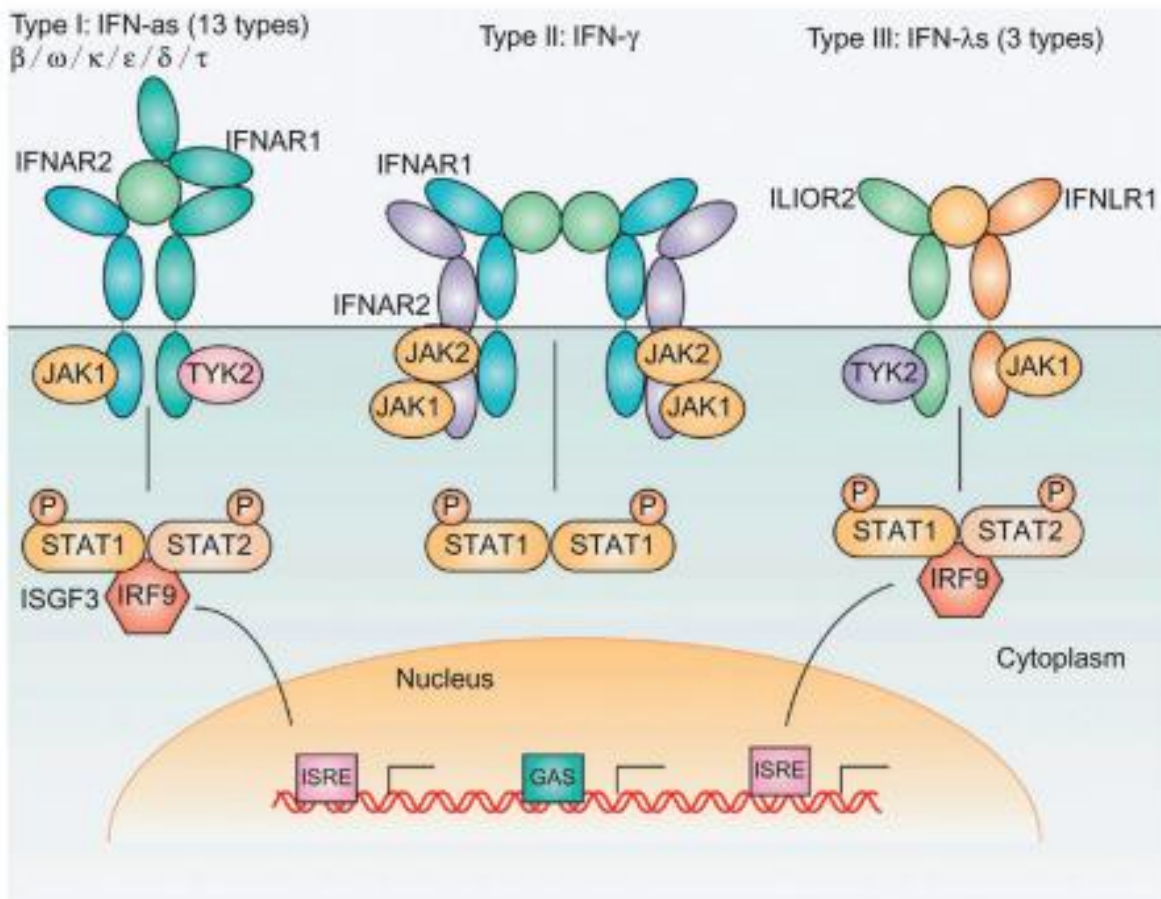
## Interferones (IFN)

El interferón fue descubierto por Isaacs y Lindenmann en 1957 y fue definido como una sustancia antiviral (Isaacs & Lindenmann, 1988; Shujathf, 2011). Actualmente los interferones (IFN) se clasifican dentro de la familia de proteínas pequeñas denominada citocinas  $\alpha$ -helicoidales, que ayudan a regular la respuesta inmune (Renauld, 2003)(figura 6). Los IFNs están clasificados en tres grupos: 1) IFN tipo I que comprende a los interferones alfa/beta (IFN $\alpha/\beta$ ) y 13 miembros más que se expresan de forma ubicua y estructuralmente constan de cinco  $\alpha$ -hélices, requieren de un receptor formado por IFN $\alpha$ R1 e IFN $\alpha$ R2; 2) IFN tipo II que solo tiene un miembro es decir el interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ); y 3) IFN tipo III formado por el interferón lambda, el cual se une a un receptor heterodimérico formado por subunidades IL-10RB e IFNLR1 (Pestka et al., 2004) (Negishi et al., 2018).

## Interferón gamma (IFN- $\gamma$ )

El IFN- $\gamma$  es un homodímero de 17 kDa, formado por la asociación no covalente de dos subunidades polipeptídicas, que durante múltiples N-glicosilaciones consiguen unirse formando su forma madura de 50 kDa (Ealick et al., 1991; Kelker et al., 1984). El IFN- $\gamma$  es una molécula pleiotrópica que tiene funciones protumorales o antitumorales dependiendo del tipo de cáncer y del microambiente tumoral. Su expresión es inducida por mitógenos y citocinas como la IL-12 y el IFN tipo I (Matikainen et al., 2001; K. B. Nguyen et al., 2000; Ye et al., 1995).

El IFN- $\alpha$ , junto con la señalización del receptor de células T, induce la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células T, un efecto mediado por la activación directa de STAT4 por IFN- $\alpha$  (Wang et al., 2003). La producción excesiva de IFN- $\alpha$  puede causar daño al cerebro en ciertas encefalopatías, meningoencefalitis, gliosis y neurodegeneración (Akwa et al., 1998).



**Figura 6:** Tipos de IFN y sus vías de transducción de señales: IFN tipo I está conformado por 13 tipos diferentes, IFN tipo II tiene solo un miembro y los IFN tipo III lo conforman tres miembros. Cada familia de IFN tiene un receptor distinto, los cuales tienen acopladas cinasas y transductores de señales diferentes. Imagen tomada de (Burrell et al., 2017).

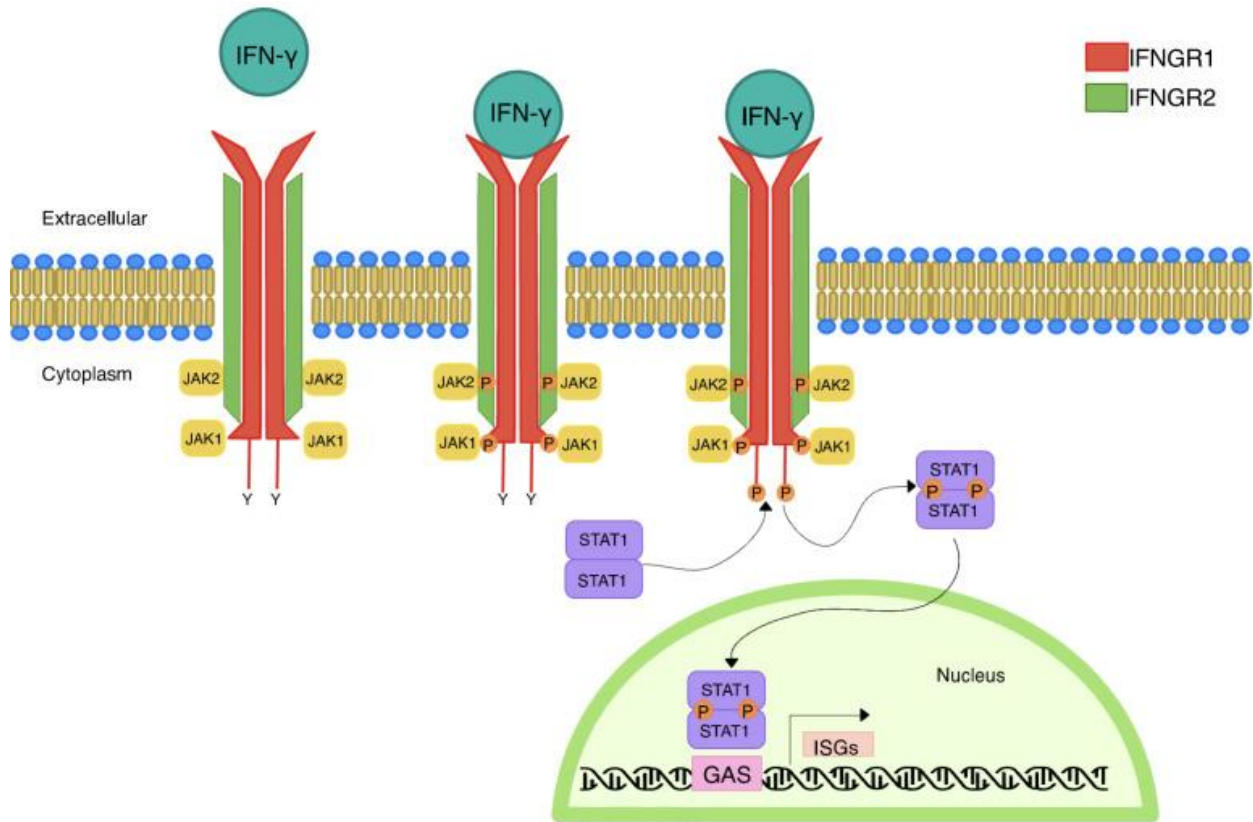
El IFN- $\gamma$  es secretado principalmente por las células NK (natural killer) y por las células T CD4+ y CD8+, así como por las células presentadoras de antígenos como los macrófagos, los monocitos y las células dendríticas (Burke & Young, 2019).

El IFN- $\gamma$ , para poder transducir las señales, requiere de un receptor que está compuesto por un complejo heterotetramérico formado por dos cadenas del receptor 1 de interferón gamma (IFN $\gamma$ R1), asociadas a dos cadenas del receptor 2 de interferón gamma (IFN $\gamma$ R2). Las subunidades de dicho receptor se expresan de manera diferencial, es decir el IFN $\gamma$ R1 se expresa constitutivamente a niveles

moderados en la superficie de las células y es uno de los elementos que inicialmente permiten el reconocimiento del ligando IFN- $\gamma$  (figura 6 y 7), mientras que el IFN $\gamma$ R2 se expresa constitutivamente, pero en niveles bajos; sin embargo, su expresión está fuertemente regulada, según el estado de diferenciación o activación celular (Castro et al., 2018).

### Vía de señalización del IFN- $\gamma$

La vía de señalización del IFN- $\gamma$  comienza con el reconocimiento y unión al receptor IFN $\gamma$ R1, el cual oligomeriza con el receptor IFN $\gamma$ R2 llevando a la activación de los componentes de señalización de la vía, como la cinasa de Janus 1 (JAK1) y la cinasa de Janus 2 (JAK2), que se activan por transfosforilación, resultando en la activación del dominio intracelular del receptor IFN $\gamma$ R1 (por fosforilación de la tirosina 440 en el humano) y creando sitios de unión para proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción 1 (STAT1). A continuación, las JAKs fosforilan a STAT1 en el extremo C-terminal, en el residuo de tirosina 701, lo que da lugar a la formación de homodímeros de pSTAT1, conocidos como factores gamma-activados (GAF), los cuales se translocan al núcleo y por su función como factores de transcripción regulan la expresión génica mediante la unión al DNA, a elementos de los sitios gamma-activados (GAS) en los promotores de los genes estimulados por el interferón (ISG). Luego, los homodímeros de pSTAT1s se separan y salen del núcleo, para volver a fosforilarse e iniciar de nuevo la vía (figura 7) (Ahmed & Johnson, 2023; Castro et al., 2018).



**Figura 7:** Vía de señalización del IFN- $\gamma$ . Después de la unión del Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) a los dominios intracelulares del receptor 2 de interferón gamma (IFN $\gamma$ R2) estos se oligomerizan con el receptor 1 de interferón gamma (IFN $\gamma$ R1) y se activan las cinasas JAK1 y JAK2 creando sitios de acoplamiento para las proteínas transductoras de señales STAT1, las cuales en su forma activa (en forma de homodímeros) se transloca al núcleo en donde tiene la función de factor de transcripción dando como resultado un incremento en la transcripción de genes estimulados por interferón. Imagen tomada de (Tecalco-Cruz et al., 2024).

Los productos de los genes estimulados por interferones (ISG) tienen funciones antivirales, inmunomoduladoras, anti-proliferativas y pro-apoptóticas. En 1979, los IFN  $\alpha/\beta$  fueron los primeros en descubrirse como inductores de una proteína similar a la ubiquitina (Ub) llamada gen estimulado por interferón 15 (ISG15) (Pak et al., 2020). Recientemente, Tecalco-Cruz y col., demostró que el IFN- $\gamma$  también es capaz de inducir la expresión de ISG15, pero de forma dependiente del tipo celular. ISG15 es una proteína involucrada en la respuesta inmune antiviral y antibacteriana (Bogunovic et al., 2012; Freitas et al., 2020; Perng & Lenschow, 2018), en algunos

tipos de células se ha visto que puede ser inducida por diversos estímulos como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF) y por luz UV (Chairatvit et al., 2012).

## ISG15/ISGilación

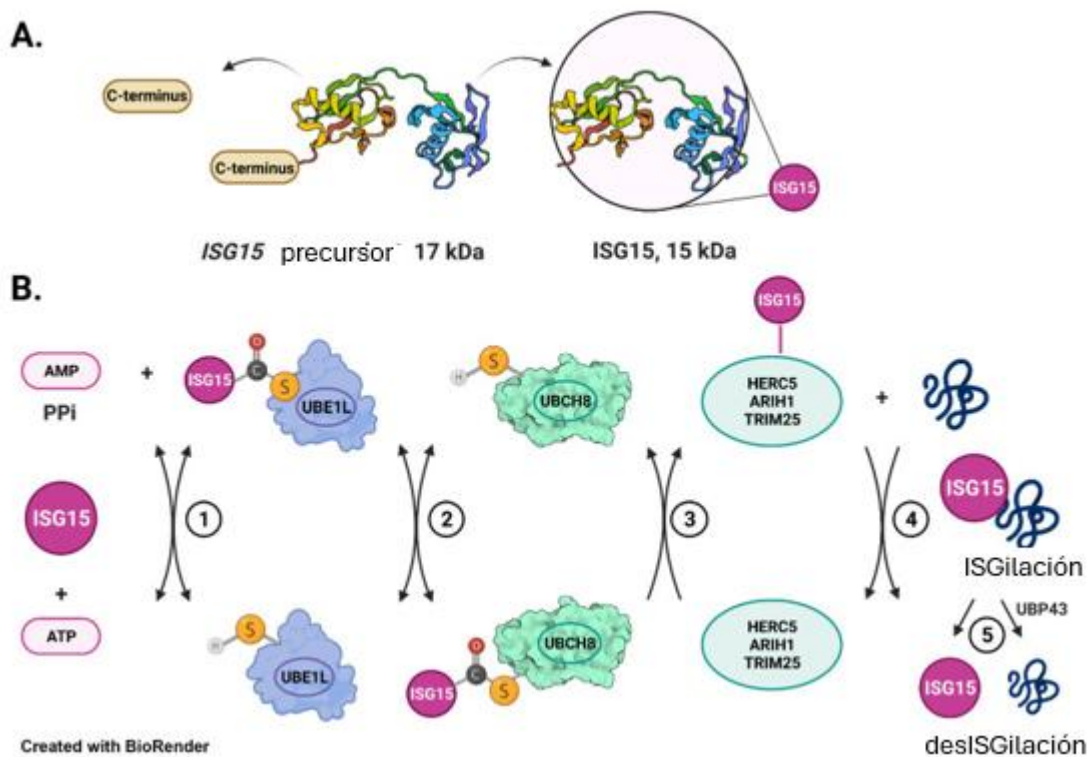
La proteína ISG15 está codificada en un RNA mensajero (RNAm) de 711 bases de longitud, a partir del cual se traduce a una proteína de 165 aminoácidos (aa) de 17 kDa; sin embargo, esta proteína requiere de un procesamiento, el cual consiste en la eliminación de ocho aa lo que da como resultado a la forma madura de ISG15 con un peso de 15 kDa (figura 8A). D'Cunha et al. propusieron que en neutrofilos ISG15 puede ser secretada mediante glicoproteínas multirresistentes usando vías no canónicas (Bogunovic et al., 2013). Estructuralmente, al igual que la Ub, ISG15 está formada por dos dominios conectados por una "bisagra", cuya estructura corresponde a "β-grasp fold" y cada dominio contiene cuatro láminas β y una hélice α (Pak et al., 2020) (figura 8B).

ISG15 contiene una secuencia de aminoácidos Leucina, Arginina, Leucina, Arginina, Glicina, Glicina (LRLRGG) en su extremo C-terminal, que son de suma importancia pues forman su motivo de conjugación, es decir, le permiten interactuar con residuos de lisina de proteínas diana; este motivo de conjugación es el mismo que tiene la Ub para llevar a cabo su función.

ISG15 se puede encontrar de dos formas, una puede ser conjugada a una proteína diana y otra en su forma libre, y cada una de estas formas tiene una función distinta, las cuales se mencionan a continuación.

Una modificación postraducciona (MPT) se refiere a la unión de una molécula pequeña a una proteína diana, lo cual puede afectar su función, estabilidad y localización. La unión covalente de ISG15 a una proteína diana es una MPT que requiere de ATP y de un sistema enzimático (figura 8) para la catálisis, que incluye a la enzima E1 activadora de ubiquitina (UBE1L), la enzima E2 de conjugación mejor conocida como enzima H8 conjugadora de ubiquitina (UBCH8) y la enzima E3 de

ligación, que para esta modificación únicamente se conocen las siguientes tres enzimas E3: la enzima Dominio HECT y RLD (HERC5), otra llamada E3 ligasa Homóloga humano de Drosophila Ariadne (HHARI), y finalmente la proteína dedo responsiva al estrógeno (EFP). Sin embargo, la ISGilación es un proceso reversible a través de la desISGilación, que es mediada por la enzima peptidasa específica de ubiquitina (USP18) (F. Okumura et al., 2007; Wong et al., 2006; Zou & Zhang, 2006).



**Figura 8:** ISG15 y el sistema de ISGilación. A) ISG15 estructuralmente cuenta con dos dominios similares a la Ub, para ser activa debe ser cortada proteolíticamente B) Sistema de ISGilación: para dar inicio a esta modificación postraduccional se requiere de Adenosín trifosfato (ATP) y de la enzima E1 de activación que cataliza la formación de un enlace tioéster en el extremo C-glicina terminal de ISG15 acto seguido mediante transesterificación, ISG15 se transfiere a la enzima E2 de conjugación por último, ISG15 es transferido de la enzima E2 de conjugación a residuos de lisina de proteínas diana a través de la enzima ligasa E3. Imagen tomada de (Mirzalieva et al., 2022).

## ISG15 Libre

La proteína ISG15 libre puede ser secretada por linfocitos y monocitos, y tiene funciones inmunomoduladoras (Caleb D. Swaim, Larissa A. Canadeo, Kristen J. Monte, Swati Khanna, Deborah J. Lenschow, 2020; Swaim et al., 2017). Se ha sugerido que la ISG15 libre actúa de forma similar a las citocinas pro-apoptóticas. Las células asesinas naturales (NK) mediante el receptor tipo integrina denominado antígeno 1 asociado a la función leucocitaria (LFA-1), pueden reconocer extracelularmente a la ISG15 libre, para promover la secreción del IFN- $\gamma$  y activar vías de señalización (D’Cunha et al., 1996) .

En el adenocarcinoma de próstata ductal (APD), en respuesta a tratamientos con IFN- $\beta$ , la ISG15 libre es secretada por macrófagos asociados a tumores (TAM) (Hare et al., 2015; Tecalco-Cruz, 2020), y se ha demostrado que la ISG15 libre intracelular se une de forma no covalente a algunas proteínas intracelulares, como la ligasa de ubiquitina NEDD4, interrumpiendo su actividad de ligasa y dando lugar a una menor ubiquitinación de su sustrato VP40, lo que implica que ISG15 libre tiene actividad antiviral al inhibir la actividad de la ligasa E3 del huésped (NEDD4) (A. Okumura et al., 2008). Además, la ISG15 libre favorece la secreción de la citocina antiinflamatoria IL-10 en monocitos humanos (D’Cunha et al., 1996).

La proteína ISG15 libre y su forma conjugada están implicadas en múltiples procesos celulares clave para la fisiología celular, como la autofagia, la secreción de exosomas, la reparación del DNA, la regulación inmunitaria y la aparición y progresión del cáncer (Yuan et al., 2023). Además, ISG15 puede localizarse tanto en el compartimento extracelular como en el intracelular, participando en procesos de autofagia selectiva (Chen et al., 2019).

## ISGilación

La ISGilación puede modificar la función, localización y estabilidad de sus proteínas diana (figura 9); actualmente, se conocen pocas proteínas que son blanco de esta modificación (figura 10); a continuación, se mencionan algunos ejemplos.

### *Proteínas citoplasmáticas ISGiladas*

En el caso de la autofagia, la ISGilación puede disminuir la estabilidad del mediador de proautofagia Beclin1, dando como resultado la inhibición de su actividad (Bhushan et al., 2020; Chiok et al., 2022).

Un ejemplo de cómo la ISGilación puede modular las interacciones proteína-proteína es el caso de la Filamina B, que al ser ISGilada se afecta su interacción con las proteínas sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionadas con Ras (RAC1), y con la proteína cinasa 4 activada por mitógenos (MKK4) inhibiendo así la señalización de la cinasa c-Jun N-terminal (JNK) y con ello la apoptosis (Jeon et al., 2009). La evidente regulación de las interacciones proteína-proteína por ISGilación, sugiere que esta modificación puede estar implicada en la modulación de muchos procesos biológicos (Tecalco–Cruz, 2020).

### *Proteínas de membrana ISGiladas.*

La ISGilación puede modificar la degradación vía lisosomal en el caso de células de cáncer de mama la proteína Kirsten-Ras es ISGilada y se disminuye su degradación por esta vía (Burks et al., 2014).

### *Supresor de tumores ISGilado*

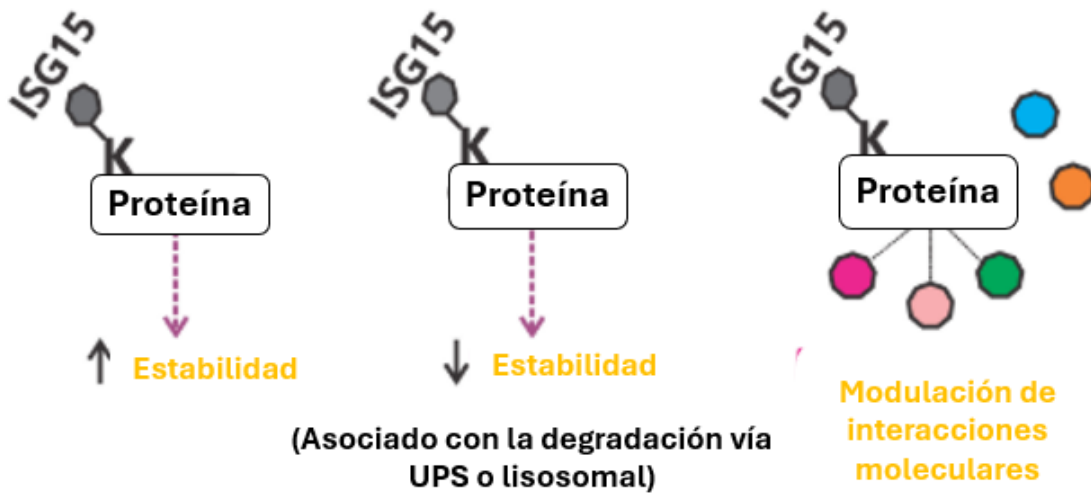
Al estar la proteína p53 mal plegada, ISG15 induce su degradación a través del proteasoma 20S. Sin embargo, la ISGilación de p53 aumenta su actividad transcripcional y es inducida por el daño en el DNA (Huang & Bulavin, 2014; J. H. Park et al., 2016).

### *Factor de transcripción ISGilado*

En condiciones hipóxicas, se estimula la ISGilación del factor transcripcional HIF-1 $\alpha$ , lo que conduce a su ubiquitinación y probablemente a su degradación, aunque los detalles del mecanismo siguen sin estar claros (Y. S. Park et al., 2017).

### *Factor de inicio de la traducción eucarionte ISGilado*

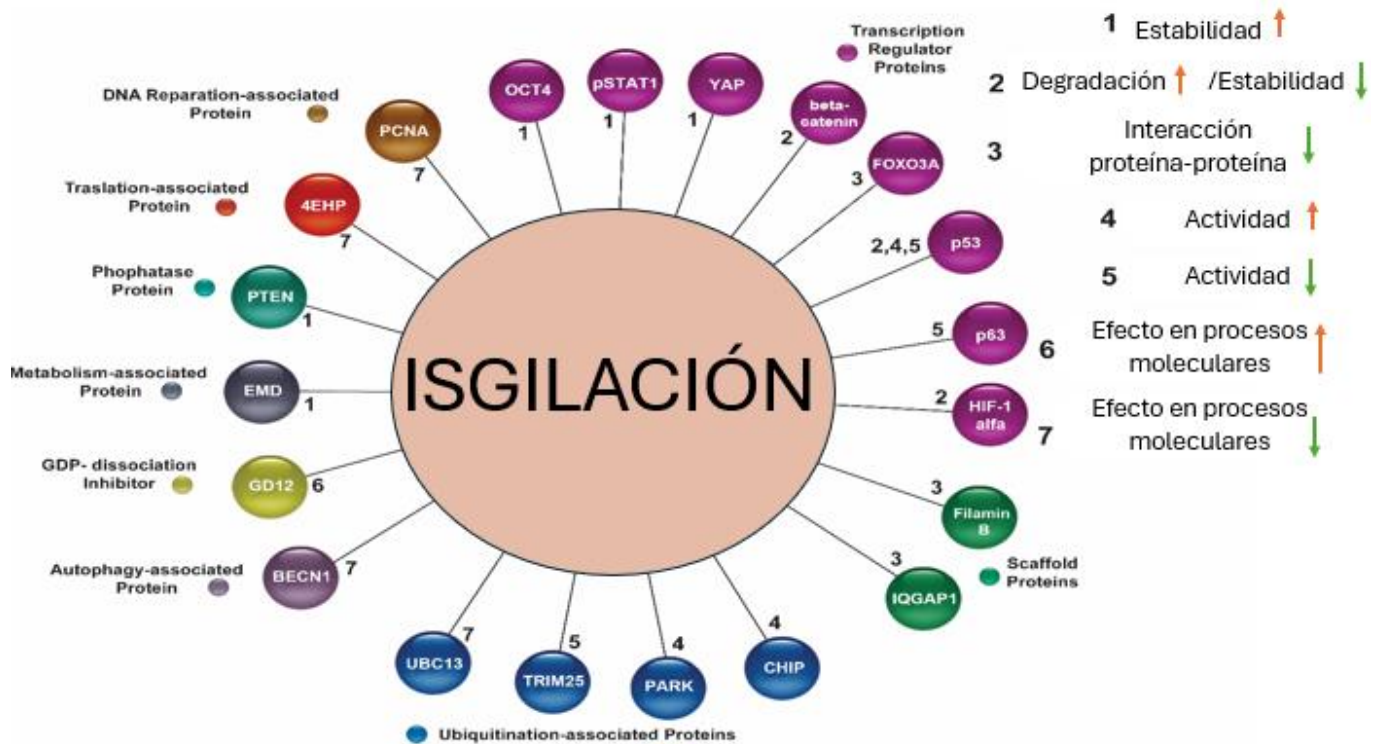
La ISGilación dependiente de HHARI puede inhibir la traducción de proteínas, al generar una competencia entre el factor de inicio eucarionte 4E (eIF4E) (cuya función es facilitar el inicio de la traducción) y la proteína homóloga de eIF4E (4EHP) (F. Okumura et al., 2007). La ISGilación de 4EHP mejora su efecto inhibitor sobre la traducción, probablemente debido a una estabilización de la interacción entre la proteína homóloga de eIF4E y la caperuza 7-metil-guanosín-trifosfato (4EHP-CAP) (Freitas et al., 2020).



**Figura 9:** La ISGilación de proteínas afecta su estabilidad positiva o negativamente además interfiere en las interacciones proteína-proteína. Imagen modificada de (Tecalco-Cruz, 2020).

*ISGilación contribuye en la respuesta inmune innata*

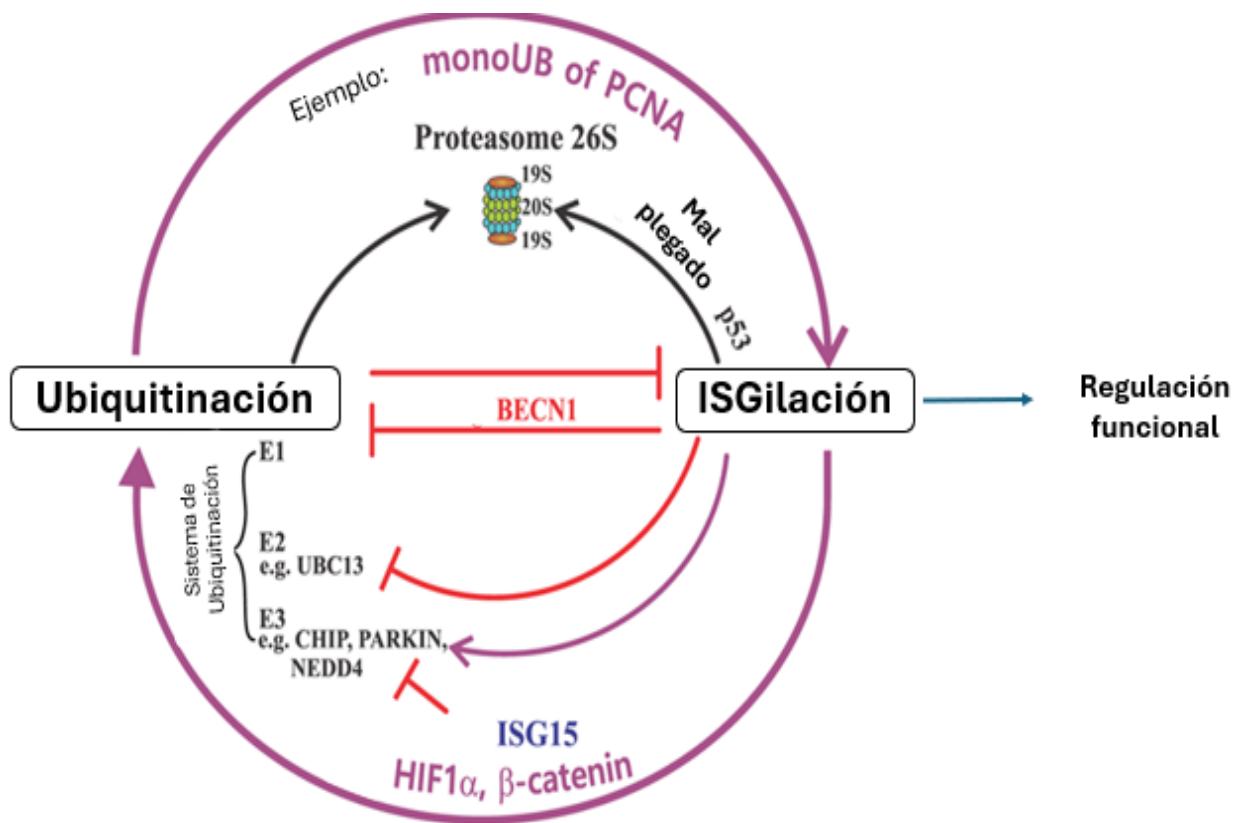
La ISGilación puede servir como un mecanismo para eliminar proteínas mal plegadas recién sintetizadas. Se ha sugerido que la ISGilación puede ocurrir co-traduccionalmente, porque HERC5 está asociado con polisomas y en el componente 60S, que en este caso puede ser relevante para la respuesta inmune innata asociada a infecciones virales (Durfee et al., 2010).



**Figura 10:** Proteínas blanco de ISGilación y el efecto que genera esta modificación postraduccional indicadas por la numeración del 1 al 7. Imagen modificada de (Tecalco-Cruz et al., n.d.).

### Ubiquitinación dependiente de ISGilación

La degradación de la  $\beta$ -catenina se produce a través de su ubiquitinación dependiente de ISGilación (figura 11), lo que conduce a la supresión de la señalización de Wnt en las células de cáncer de colon (S. Y. Park et al., 2016); sin embargo, CYP1B1 puede inhibir la expresión y la modificación covalente de ISG15 en la línea celular HeLa, previniendo la degradación de  $\beta$ -catenina, por su modificación con ISG15, y activando la vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, lo que resulta en una proliferación y diferenciación celular anormal (S. Y. Park et al., 2016).

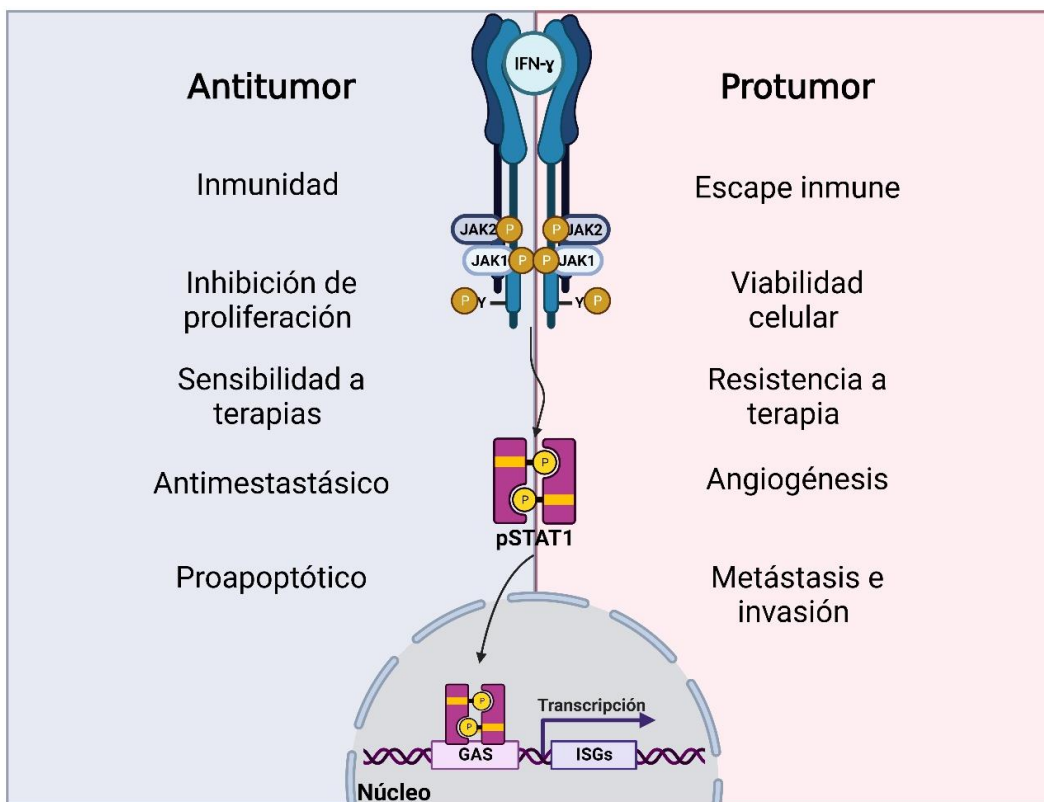


**Figura 11:** Ubiquitinación dependiente de ISGilación. Para que  $\beta$ -catenina sea degradada por el proteasoma debe ser ISGilada previamente. ISG15 libre puede inhibir la función de la E3 ligasa de UB NEDD4. PCNA monoUbiquitinada se ha observado que puede ser ISGilada. BECNI solo puede tener una modificación postraduccional mediada por Ub o ISG15. Imagen tomada de (Tecalco–Cruz, 2020).

## ANTECEDENTES

### Los efectos pro-tumorales y anti-tumorales del IFN- $\gamma$

Dentro de los antecedentes directos de este trabajo se sabe que el IFN- $\gamma$  tiene un efecto dual en el cáncer (figura 12), su función depende del tipo de cáncer y de la dosis. Por ejemplo, en el caso del cáncer de pulmón de células no pequeñas, al estimular con bajas dosis de IFN- $\gamma$  se indujo la troncalidad de las células por la activación de la vía ICAM1-PI3K-Akt-Notch1; sin embargo, al incrementar la dosis del estímulo se afectó la apoptosis, favoreciendo la activación de las caspasas 3 y 7 (Song et al., 2019). Entre los 15 a 30 minutos posteriores al estímulo con IFN- $\gamma$  se ha observado que se da la activación de la vía canónica del interferón-gamma (Bach et al., 1997; van de Vosse & van Dissel, 2017).



**Figura 12:** Dualidad del IFN- $\gamma$  en cáncer. La modulación de la vía puede tener un efecto protumor o antitumoral a través de diferentes mecanismos los cuales dependen del contexto que se presente además de que puede depender de la concentración. Imagen tomada de (Ximena Zamora-Salas et al., 2022).

<b>Tabla 2:</b> Efecto del IFN- $\gamma$ en cáncer	Antitumoral	Protumoral
La vía del IFN- $\gamma$ en glioblastoma	El IFN- $\gamma$ puede tener un efecto antitumoral al inhibir la expresión de genes implicados en la diferenciación y la proliferación, como <i>CDK8, TGFB, EGF3</i> , también puede sobreexpresar genes implicados en la apoptosis y la diferenciación celular ( <i>TP53, CASP10</i> ) (Pérez Barco, 2023).	El IFN- $\gamma$ favorece la sobreexpresión de genes involucrados en la migración y ciclo celular <i>IDO-1, SMAD3, PDL-1</i> (Pérez Barco, 2023).
Deficiencias en el receptor del IFN- $\gamma$		Favorece la activación de inhibidores de la vía, como SOCS1 y SHP2, dando como resultado una insensibilidad al IFN- $\gamma$ , lo que conlleva a la evasión de señales anti-proliferativas y pro-apoptóticas (Du et al., 2022; Gao et al., 2016).
El tratamiento con IFN- $\gamma$ en cáncer de próstata	IFN- $\gamma$ reduce la expresión de la E-caderina, lo que favorece la apoptosis a través de la caspasa 3 (Korentzelos et al., 2022). En un modelo murino de adenocarcinoma se observó que el IFN- $\gamma$ incrementa el efecto antitumoral de la radioterapia (Gerber et al., 2013).	

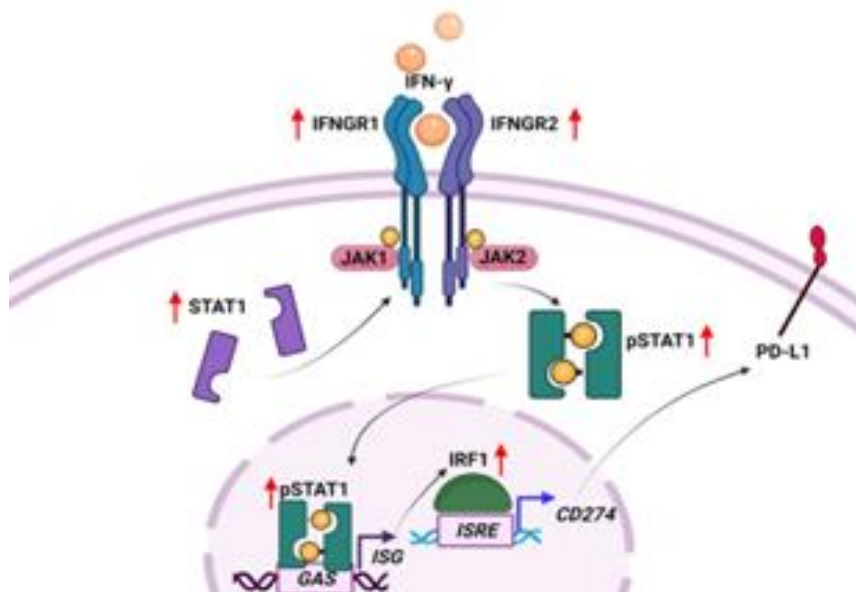
<p>IFN-γ en cáncer de pulmón</p>		<p>El IFN-γ favorece la metástasis en el pulmón y la neovascularización porque intervine en la expresión de IDO-1. El proceso de transición epitelio-mesénquima se ha visto que puede ser inducido por la sobreexpresión de PD-L1 derivada del estímulo con IFN-γ (Mimura et al., 2018).</p>
<p>IFN-γ en cáncer de mama</p>	<p>La sobreexpresión de la IRF1 se asocia con la inducción de señales apoptóticas en respuesta al IFN-γ en cáncer de mama (Rettino &amp; Nicole, 2013). El IFN-γ también induce un efecto anti-proliferativo a través de STAT1 pues se une a secuencias GAS del promotor de p21, el cual es un inhibidor de proteínas reguladoras de la progresión del ciclo celular llamadas CDKs (Chin et al., 1996).</p>	
<p>El IFN-γ en células cancerosas</p>		<p>Se ha reportado que el incremento de CD38 y CD74 en cáncer esta favorecido el IFN-γ afectando en la supervivencia y proliferación de células cancerosas (Kursunel &amp; Esendagli, 2016; Ximena Zamora-Salas et al., 2022).</p>

## IFN- $\gamma$ en glioblastoma

El glioblastoma es un tumor de grado 4 que se presenta principalmente en adultos mayores, se desarrolla en el cerebro; en este contexto, el IFN- $\gamma$  puede inhibir la proliferación al reducir la unión del ácido hialurónico (HA) a la matriz extracelular (Knüpfer et al., 1997). Además, el IFN- $\gamma$  incrementa la expresión de moléculas de MHC de clase I, aumentando su inmunogenicidad (Ji et al., 2021).

En líneas celulares de glioblastoma tratadas con IFN- $\gamma$  ocurre un incremento de la actividad de IDO y PDL-1, mejorando su proliferación y migración, mediante la regulación de proteínas como vimentina, CDK4, CDK6 y MMP-2. Este efecto se corroboró al inhibir a PD-L1, pues se observó una disminución en la proliferación y migración celular (Avril et al., 2010; Jia et al., 2022). Por lo tanto, podemos ver que la señalización del IFN- $\gamma$  tiene un efecto pro-tumorigénico en el glioblastoma.

En un análisis *in silico* de muestras de pacientes con glioblastoma y de tejido de cerebro sano, se pudo identificar que los elementos de la vía de señalización del IFN- $\gamma$  están sobreexpresados en el GBM respecto a una condición normal (figura 13) (Zamora, 2023).

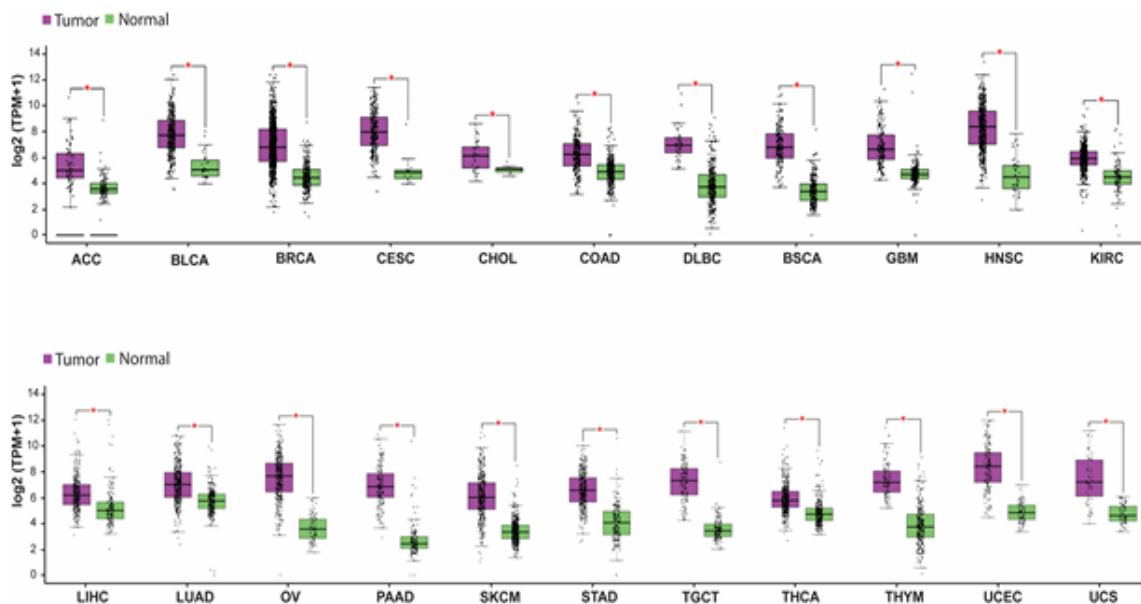


**Figura 13:** La expresión de los elementos de la vía del IFN- $\gamma$  están incrementados (representados con una flecha roja hacia arriba) en glioblastoma respecto una condición normal. Imagen tomada de (Ximena Zamora-Salas et al., 2022).

## ISG15/ISGilación en cáncer

La ISGilación se ha observado que tiene importantes implicaciones en organelos como las mitocondrias y en contextos específicos como pueden ser las células cancerosas o las del cerebro. Dentro de los procesos celulares en los que participa el proceso ISG15/ISGilación, se encuentra la respuesta inmune, así como en otros como la proliferación, la migración, la apoptosis y la autofagia, pero en contextos particulares.

La expresión de ISG15 se ha visto que esta incrementada en la mayoría de los tipos de cáncer en donde se ha estudiado (figura 14) y esto puede sugerir una función protumoral, como en el glioblastoma; sin embargo, hasta ahora se han reportado solo tres contextos, en cáncer de ovario, cáncer de cérvix y cáncer en la sangre, en donde se desempeña como una proteína anti-tumoral.



**Figura 14:** La expresión de ISG15 esta desregulada en cáncer. ACC (carcinoma adrenocortical), BLCA (carcinoma urotelial de vejiga), BRCA (carcinoma invasivo de mama), CESC (carcinoma de células escamosas de cuello uterino y adenocarcinoma endocervical), CHOL (colangiocarcinoma), COAD (adenocarcinoma de colon), DLBC (neoplasia linfoide difusa de células B grandes)

linfoma), ESCA (carcinoma de esófago), GBM (glioblastoma multiforme), HNSC (cabeza y carcinoma de células escamosas de cuello), KIRC (carcinoma de células claras renal de riñón), KIRP (carcinoma de células papilar renal de riñón), LIHC (carcinoma hepatocelular de hígado), LUAD (adenocarcinoma de pulmón), OV (cistadenocarcinoma seroso de ovario), PAAD (adenocarcinoma de páncreas), SKCM (melanoma cutáneo de piel), STAD (adenocarcinoma de estómago), TGCT (tumores de células germinales testiculares), THCA (tumores de tiroides carcinoma), THYM (timoma), UCEC (carcinoma endometrial del cuerpo uterino), UCS (carcinosarcoma uterino). Imagen tomada de (Tecalco-Cruz et al., n.d.) (\*)  $p < 0.01$ .

En el caso del cáncer de ovario seroso de alto grado (HGSOC) se ha visto que un incremento en la expresión de ISG15 suprimió la progresión del cáncer, a través de la ISGilación de ERK, además de favorecer la activación de las células NK y de los linfocitos T CD8+, mientras que en modelos *in vivo* se observó una reducción del tumor en células transfectadas con ISG15 (Yeung et al., 2018).

Por otro lado, la apoptosis se evaluó en células de leucemia y en mieloma mediante la sobreexpresión de ISG15 y se demostró que ISG15 suprimió la transducción de la señal del factor NF- $\kappa$ B e indujo la apoptosis de las células cancerosas (Mao et al., 2016).

En el cáncer de cérvix se ha visto que ISG15/ISGilación tiene una regulación positiva del factor de transcripción p53, pues inhibe a su principal represor  $\Delta$ Np63 $\alpha$  (Zhou et al., 2017). En el cerebro, la regulación positiva de ISG15 es también una característica molecular de varios tumores cerebrales en comparación con el tejido cerebral normal. Además, los niveles de la proteína ISG15 son más altos en el astrocitoma de grado III que en el astrocitoma de grado I/II y en el tejido sano (Robles M. Lucero, 2023; Tecalco-Cruz et al., 2022).

### IFN- $\gamma$ y la regulación del proceso ISG15/ISGilación

En el cáncer de mama, el IFN- $\gamma$  puede generar una señalización autocrina en las células y parece mediar la apoptosis y la detención del ciclo celular. Se ha

demostrado que el IFN- $\gamma$  aumentó los patrones de ISGilación entre el núcleo y el citoplasma en las células MCF-7 y MDA-MB-231, y mejoró los niveles de ISG15 libre intracelular; sin embargo, los genes inducidos por IFN- $\gamma$ , incluida la proteína *ISG15*, también afectan la respuesta a la terapia endocrina con tamoxifeno (Tecalco-Cruz et al., 2020).

La desregulación de ISG15/ISGilación se ha reportado en tumores del SNC, particularmente en glioblastoma. Los glioblastomas son tumores de grado 4, malignos, que se presentan en adultos mayores y se localizan principalmente en el cerebro, específicamente se desarrolla a partir de células astrocíticas (King & Benhabbour, 2021) (Wirsching et al., 2016). Estudios recientes observaron que la expresión de ISG15, de los elementos del sistema de ISGilación y de los elementos de la señalización del IFN- $\gamma$  se encuentran incrementados en glioblastoma, además que la abundancia proteica de ISG15 es significativamente más alta en glioblastoma respecto a un cerebro sano, denotando así su posible utilidad como biomarcador en esta neuropatología. Los análisis realizados del tipo Kaplan Meier mostraron que la expresión de ISG15 podría correlacionarse con una menor supervivencia de los pacientes con glioblastoma. Por ello, se sugiere que la desregulación del proceso ISG15/ISGilación podrían tener implicaciones en la progresión del glioblastoma (Tecalco-Cruz et al., 2022). Además, Tecalco-Cruz y col., sugirieron que un microentorno tumoral enriquecido con interferones, como el IFN- $\gamma$ , puede aumentar la expresión de ISG15 en células de glioblastoma. Por otro lado, mediante estudios *in vitro* se observó que, en células de glioma, ISG15 puede ISGilar a proteínas esenciales como Oct4 y con ello suprimir su ubiquitinación (Dai et al., 2022; H. M. Nguyen et al., 2023) .

## ISG15 en MB

Hasta la fecha no se tienen reportes sobre ISG15 en muestras de pacientes con MB, y limitada en modelos de células humanas de MB. Por ejemplo, Hsiao N, et al sugieren que la sobreexpresión de ISG15 en células TE671 de MB, que son infectadas con el virus de la encefalitis japonesa, presentan un efecto antiviral y la

translocación al núcleo de STAT1 se ve favorecida; sin embargo, al corroborar la línea celular que se utilizó, esta no corresponde a una línea de MB, más bien pertenece a un rhabdomyosarcoma (Hsiao et al., 2010; Stratton et al., 1989)

En este trabajo nos enfocaremos en determinar los niveles de ISG15 en muestras de MB en comparación con los niveles presentes en tejido sano, además de estudiar el efecto del IFN- $\gamma$  sobre los niveles de ISG15 y el efecto de la sobreexpresión de ISG15 en células derivadas de MB.

## JUSTIFICACIÓN

La ISGilación es una modificación postraduccional cuyas funciones y modulación son poco conocidas. Actualmente se conocen un número reducido de proteínas blanco de la ISGilación; sin embargo, se ha observado que está implicada en algunos tipos de cáncer, y particularmente, en el cáncer de cerebro hay muy poca información que implique a dicha modificación postraduccional. Además, actualmente se desconoce el perfil de expresión de ISG15 y su asociación con la viabilidad y migración celular en el contexto del MB, por lo cual se requieren más estudios moleculares sobre esta patología, que permitan determinar si ISG15 podría estar asociado a vías moleculares centrales en la progresión del MB. El poder conocer el perfil de expresión de ISG15 y su modulación por IFN- $\gamma$  en el MB podrían sugerir que ISG15/ISGilación podrían servir como importantes biomarcadores o blancos de terapias.

## HIPÓTESIS

La vía de señalización del IFN- $\gamma$  modula los niveles de ISG15 y el perfil de ISGilación en células de meduloblastoma, lo cual podría afectar la viabilidad y la migración celular.

## OBJETIVOS

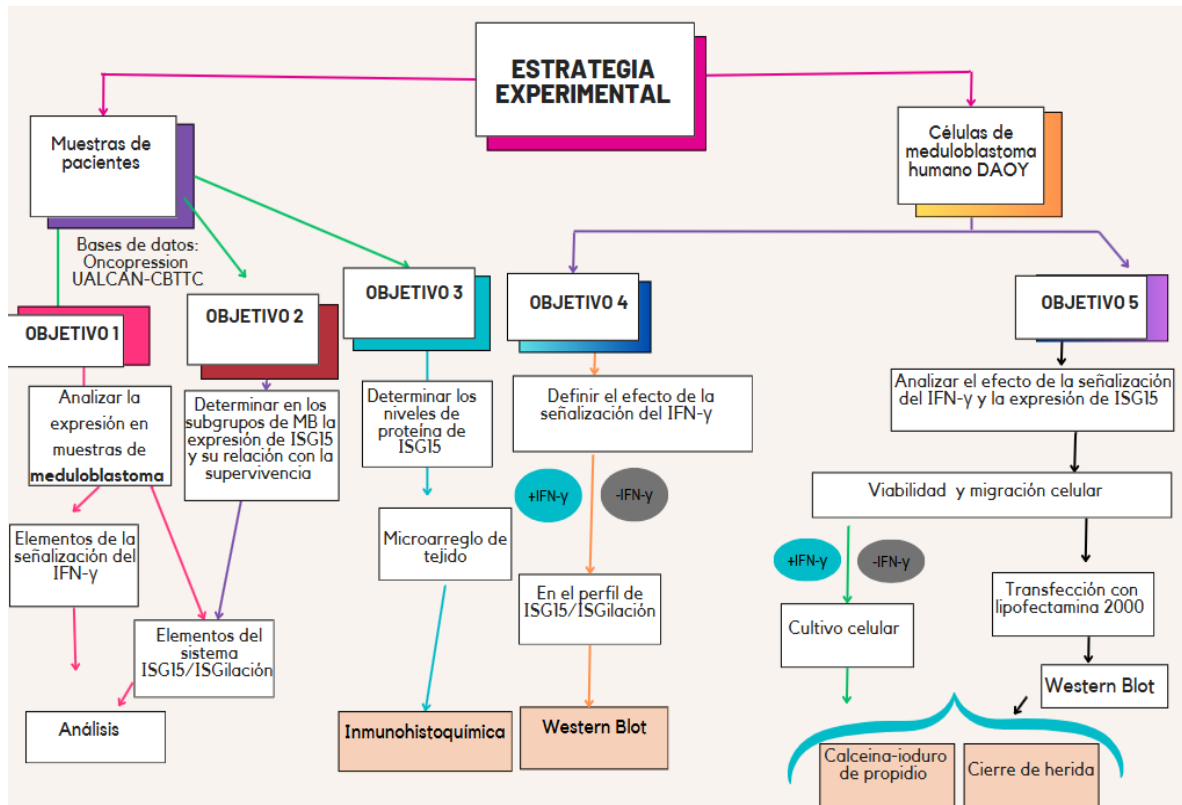
### Objetivo General

Analizar los niveles de ISG15 en muestras de pacientes con meduloblastoma y determinar el efecto de la vía de señalización del IFN- $\gamma$  sobre el perfil de ISG15/ISGilación y su impacto sobre la viabilidad y migración de las células de meduloblastoma.

### Objetivos específicos

1. Analizar *in silico* la expresión de los elementos del sistema ISG15/ISGilación y de la vía del IFN- $\gamma$  en muestras de meduloblastoma en comparación con el tejido normal.
2. Determinar los niveles de expresión de ISG15 y su implicación en la supervivencia en los subgrupos de meduloblastoma humano.
3. Determinar los niveles de la proteína ISG15 en muestras de meduloblastoma humano en comparación con el tejido normal.
4. Definir el efecto de la vía de señalización del IFN- $\gamma$  sobre los niveles de ISG15 y el perfil de ISGilación en células de meduloblastoma.
5. Establecer el efecto de la vía de señalización del IFN- $\gamma$  y de la sobreexpresión de ISG15 sobre la viabilidad y migración de células de meduloblastoma.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Análisis *in silico* de la expresión de ISG15 y su sistema de ISGIlación y de los elementos de la vía del IFN- $\gamma$**

Primero se realizó una búsqueda de los elementos de la vía de señalización del IFN- $\gamma$  (IFNGR1, IFNGR2, JAK1, JAK2, STAT1) y del sistema de ISG15/ISGIlación en bases de datos públicas específicas para cáncer, como lo es UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/analysis-cbtcc.html>) y Oncopression (<http://www.oncopression.com/>). Dado que en estas plataformas se almacena información sobre distintos tipos de cáncer y la expresión de genes determinada mediante la técnica RNA-seq (Chandrashekar et al., 2017, 2022). Mediante este estudio, se analizó la expresión relativa de los genes de interés en muestras tumorales de MB en comparación con tejido normal, además de analizar la relación

con las características clínico-patológicas disponibles. La plataforma R2 Genomics Analysis and Visualization Platform [https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi?open\\_page=login#loginsection](https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi?open_page=login#loginsection) se utilizó para comparar la expresión de ISG15 en diferentes subgrupos y líneas celulares de MB y para los análisis de Kaplan Meier (Koster et al., 2019).

## Línea celular

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó la línea celular de MB DAOY (HTB-186), la cual fue obtenida post-mortem de la fosa posterior del cerebelo de un niño caucásico de 4 años en 1985, por el doctor P.F Jacobsen en el hospital Royal Perth en Australia (Jacobsen et al., 1985).

Las principales características de esta línea es que tienen una morfología desmoplásica poligonal, pertenece al grupo SHH, con TP53 mutada (Ayrault et al., 2010; Ramaswamy et al., 2016).

## Cultivo celular y tratamiento con IFN- $\gamma$ :

Las células DAOY (<https://www.atcc.org/products/htb-186>) se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con bajo contenido de glucosa, suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) y 1 % de antibióticos (Penicilina /Estreptomicina), en una atmósfera de aire al 95%; con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) al 5% y a una Temperatura de 37°C.

Al tener las células DAOY un crecimiento aproximado del 85% se analizaron en dos condiciones: primero con un estímulo de 100 ng/ mL de IFN- $\gamma$  por 24 h para propiciar la activación de la vía del IFN- $\gamma$  (Tecalco-Cruz et al., 2022; Ximena Zamora-Salas et al., 2022; Zamora-Salas et al., 2024), y en la segunda condición sin estímulo, que correspondió al control, es decir, solo con medio de ayuno, el cual está compuesto por DMEM, 1% de antibióticos (Penicilina/Estreptomicina) y 0.02% de FBS; posteriormente, las proteínas se analizaron mediante Western blot e

inmunofluorescencia, mientras que el comportamiento celular se evaluó mediante ensayos de migración y viabilidad celular. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

### Microarreglo de tejido e inmunohistoquímica (IHQ)

Se utilizó un microarreglo comercial de tejido o TMA (tissue microarray) que contiene 20 casos de MB por triplicado y 3 muestras de tejido pertenecientes a cerebelo (GL631, U.S Biomax). Posteriormente, se realizó la técnica de inmunohistoquímica (IHQ), para la detección específica de la proteína de ISG15 con el anticuerpo (SC-166755 de Santa Cruz Biotech.), el cual es un anticuerpo primario monoclonal específico para la proteína de interés. El procedimiento para la IHQ implica que el tejido previamente fijado se incuba en una solución de bloqueo, que satura los posibles sitios de unión inespecífica, debido a una alta concentración de proteína como la albúmina de suero bovino. Después de cada paso de unión de anticuerpos o del complejo avidina-biotina-peroxidasa, se procede a lavar los cortes con un buffer de fosfatos, en la que también van disueltos los anticuerpos. La reacción de la peroxidasa convierte a la diaminobencidina (DAB) y el peróxido de hidrógeno, en un producto insoluble color marrón (Megías, 2021); por lo tanto, si se encuentra ISG15 en la muestra se observará de una tonalidad marrón. Las imágenes fueron obtenidas usando la cámara AxioScan.Z1 y AxioCam MRc5 (Zeiss, Germany).

### Análisis histológico de la IHQ

Para este punto se establecieron los parámetros para cada categoría, en donde se separó en muestras de cerebelo y MB, se obtuvo un mapa de calor y se realizó una prueba estadística (t-Student) comparando la intensidad de los pixeles (De Matos et al., 2006).

## Transfección transitoria con un plásmido para sobreexpresar a ISG15

Para realizar la sobreexpresión de ISG15 se utilizó Lipofectamina 2000, una técnica que se fundamenta en la lipofección que se usa comúnmente para transferir DNA a las células eucariotas y utiliza liposomas catiónicos que forman complejos con el DNA conocidos como lipocomplejos, los cuales penetran a las células porque se fusionan con la membrana o por endocitosis y vacían su contenido en el citoplasma. El plásmido usado fue pCAGGS5HA-mISG15 (gen de ratón que contiene 4790 pb, gen de resistencia a ampicilina, Tag corresponde a 5xHA en el extremo amino terminal) obtenidos de Addgene depositados por Dong-Er Zhang. El tiempo de transfección fue de 48 h, se utilizó el plásmido y la lipofectoamina.

Una vez comprobada la sobreexpresión de ISG15, mediante ensayos de Western Blot, se analizó su efecto sobre la viabilidad celular mediante el ensayo de calceína-yoduro de propidio y para evaluar la migración celular se utilizó la técnica de cierre de herida.

## Obtención de extractos totales y fraccionamiento subcelular

Una vez que las células de ambas condiciones (control y estimuladas) estuvieron en una alta confluencia (90%), se procedió a lavarlas con PBS 1x frío; posteriormente, se realizó la lisis celular mediante el uso de una mezcla del buffer TNTE al 0.5% (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% Triton-X-100) con inhibidores de fosfatasa (NaF [25mM] NaPPi [1mM], NaVO<sub>4</sub> [1Mm] e inhibidores de proteasas [0.1mg/ml], se rasparon las placas depositando su contenido en microtúbulos, los cuales se incubaron durante 30 min a 4°C, seguido de un proceso de centrifugación por 5 min a 13200 rpm a 4°C y se recuperó el sobrenadante pues contenía los extractos proteicos de interés.

Para obtener el fraccionamiento subcelular se utilizaron dos placas p100 por condición. Para realizar la lisis celular se usó el buffer de homogenización que contiene 250mM e imidazol 3 mM por ml con inhibidores de fosfatasa y proteasas utilicé las mismas concentraciones mencionadas anteriormente en extractos totales, una vez obtenido el raspado se pasó 15 veces por una jeringa de 22G, se centrifugo

por 15 min a 4°C a 3400 rpm, y se separó el sobrenadante del precipitado. Al sobrenadante se le adicionó el buffer RIPA 5X y al precipitado RIPA 1X (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% deoxycholic acid, 1% NP-40, and 0.1% SDS); posteriormente, se dejó incubando 1 h en agitación a 4°C. Cumplido el tiempo del paso anterior, se centrifugo 5 min a 13200 rpm, y se recuperó el sobrenadante que es la fracción de interés.

Tanto los extractos totales como el fraccionamiento subcelular se centrifugaron para posteriormente ser cuantificados mediante la técnica de Bradford, la cual consiste en la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 a la proteína, lo que provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm. Este ensayo es muy reproducible y rápido, y el proceso de unión del colorante prácticamente se completa en aproximadamente 2 min, con una buena estabilidad del color durante 1 h, la forma azul más aniónica del colorante que se une a la proteína tiene un máximo de absorbancia a 590 nm. Por lo tanto, la cantidad de proteína se puede estimar determinando la cantidad de colorante en la forma iónica azul (Bradford, 1976; Kruger, 1994). Se realizaron los ajustes para que todos los extractos obtenidos estuvieran dentro de la misma concentración y se adicionaron 3 µL de Buffer Laemmli 6X (Karlsson et al., 1994).

Posteriormente, los extractos totales y el fraccionamiento subcelular fueron cargados en un gel de acrilamida/ bisacrilamida al 15% y 10% para ser separados mediante electroforesis con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) a 100V durante aproximadamente 2 h.

### Electroforesis SDS-PAGE y Western blot

La electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida es una técnica que se utiliza para separar por peso molecular a proteínas cargadas, a través de una matriz de gel mediante una corriente eléctrica. La tasa de migración de las proteínas durante la SDS-PAGE está determinada por el tamaño de poro de la matriz del gel y la carga, así como por el tamaño y la forma de la proteína (Manns, 2011).

Una vez terminado el tiempo de la electroforesis se procedió con la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF a 100 V durante 90 min. Posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos de la membrana utilizando leche descremada en polvo al 5% con TBST-T (200 mM Tris base, 1.37 M NaCl, 38 mM HCl [1N] pH=7.6), incubando durante 1 h en agitación constante. Finalmente, las membranas fueron lavadas con TBS-T e incubadas con un anticuerpo monoclonal primario, específico para la proteína de interés (ISG15, o con anticuerpos anti-tubulina y anti-lámina A, como controles de carga), toda la noche en agitación a 4°C. Al siguiente día se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (115-035-003, Jackson), para posteriormente llevar a cabo la detección de la proteína mediante una reacción de quimioluminiscencia con el reactivo SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific) y con placas de autorradiografía.

### Ensayo de inmunofluorescencia

Las células DAOY fueron cultivadas en una placa de 6 pocillos, la cual contenía un cubreobjetos con poly-L-lisina, al siguiente día fueron estimulados 3 pozos con IFN- $\gamma$  por 24 h, después de la incubación se procedió con la eliminación del medio y la fijación de las células DAOY con paraformaldehído al 4% durante 15 min, se permeabilizaron con Triton-X-100 al 0.1% durante 8 min, seguido del bloqueo de los sitios no específicos con albumina al 1% durante 1 h. Luego se incubaron con el anticuerpo primario anti-ISG15 (SC-166755, Santa Cruz Biotechnology) toda la noche, para posteriormente lavar con PBS y proceder a incubar con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 647 anti-ratón IgG (ab150107, Abcam) durante 1 h en la oscuridad. Por último, se procedió a montar la muestra en un cubreobjetos y se selló con barniz, finalmente se capturaron las imágenes en un microscopio confocal.

### Técnica calceína-Yoduro de propidio

Con la finalidad de evaluar la viabilidad celular se utilizó el ensayo de calceína-yoduro de propidio, para ello, las células con y sin estímulo de IFN- $\gamma$  se incubaron con calceína-AM [1  $\mu$ M] y yoduro de propidio [5 mM] a 37 °C durante 30 min; una vez transcurrido el tiempo fueron analizadas con microscopía de fluorescencia, considerando que, el metabolismo activo de las células viables permite a las esterasas intracelulares transformar la calceína-AM (un compuesto no fluorescente) en calceína, y en el caso de las células no viables, el yoduro de propidio al interactuar con el DNA permitirá una detección de fluorescencia roja. Como control de muerte se usó el antibiótico gentamicina (Tecalco-Cruz et al., 2019).

### Ensayo de cierre de herida

Las células con y sin estímulo con IFN- $\gamma$  y con un crecimiento de aproximadamente el 99%, fueron utilizadas para este estudio. Se realizó una herida en la monocapa celular, con una punta estéril de micropipeta 1mm; posteriormente, las células se incubaron por 24 h y para monitorear los resultados se tomaron fotografías a intervalos de tiempo de 0, 24 y 48 h posteriores a la herida. Los resultados se representaron en porcentaje de cierre de herida (Tecalco-Cruz et al., 2012).

### Análisis estadístico

Para el análisis de los datos de UALCAN-CBTTC se utilizó la prueba t de Student. Para los resultados de Oncopression se utilizaron la prueba t de Student y el área bajo la curva de la curva operativa del receptor (AUC). Para los resultados de la plataforma R2 se utilizaron Chi y ANOVA. Los resultados fueron estadísticamente significativos cuando \*\*: valor  $p < 0,01$ , \*\*\*: valor  $p < 0,001$ , \*\*\*\*: valor  $p < 0,0001$ .

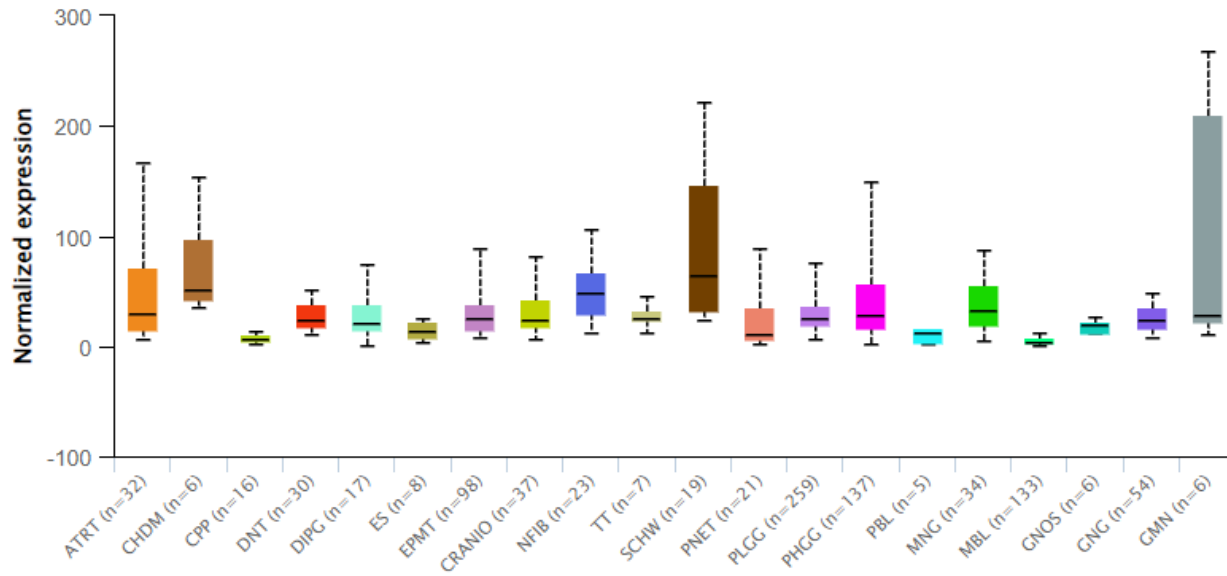
## RESULTADOS

**Análisis *in silico* de la expresión de los elementos de la vía de señalización del IFN- $\gamma$  y del sistema de ISG15/ISGilación en muestras de MB en comparación con el tejido normal.**

### **Expresión de ISG15 y las enzimas de ISGilación en MB**

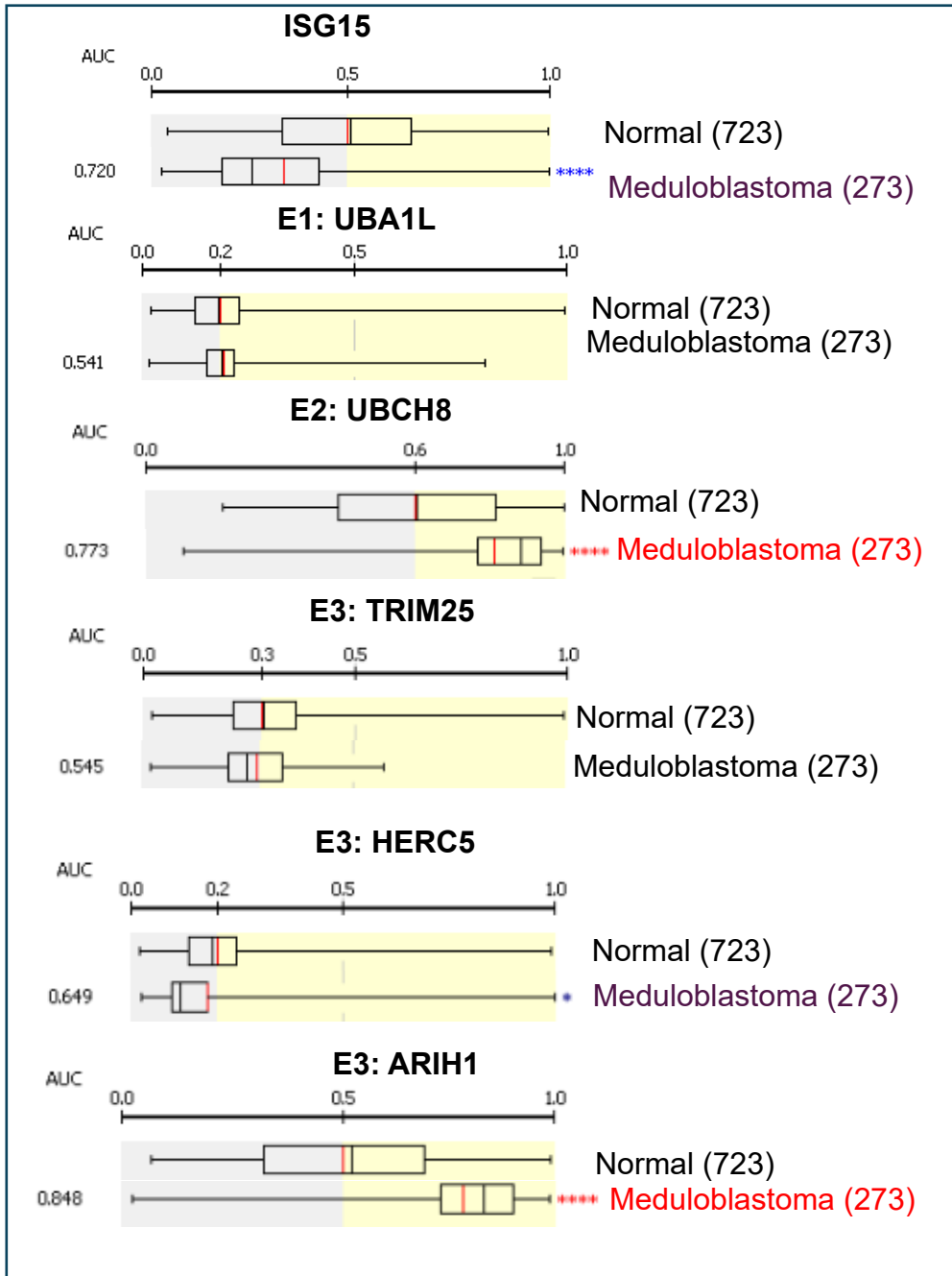
Para analizar el perfil de expresión de *ISG15* se utilizó la base de datos UALCAN-CBTTC, la cual permite la comparación de MB con otros tipos de cáncer pediátrico del sistema nervioso central. Como resultado se observó que los tumores de MB presentan una menor expresión del gen *ISG15* en comparación con los otros tipos de cáncer pediátrico de cerebro (Figura 15).

Considerando estos resultados, posteriormente se procedió al análisis de la expresión de *ISG15* y de los elementos del sistema de ISGilación en muestras de MB en comparación con tejido saludable, para ello se utilizó la base de datos de Oncoexpression. Los resultados obtenidos indican que los niveles de expresión de *ISG15* están disminuidos en MB respecto al tejido normal sería interesante hacer un análisis de datos atípicos sin embargo, los datos de dichos gráficos ya están establecidos por la base de datos Oncoexpression. La enzima E1 de activación *UBA1L* no presentó cambios significativos en MB, mientras que altos niveles de la enzima E2 de conjugación *UBCH8* se detectaron en MB. Las enzimas E3 ligasas muestran un patrón particular de expresión, ya que, si bien *TRIM25* no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de tejido normal y MB, en contraste, las enzimas *HERC5* y *ARIH1* si presentaron una expresión diferencial. De manera interesante, *HERC5* está subexpresada y *ARIH1* se encuentra sobreexpresada (Figura 16).



Comparación	Significancia Estadística
PNET-vs-MBL	2.4E-02
TT-vs-MBL	4.6E-02
ATRT-vs-MBL	4.3E-02
CHDM-vs-MBL	2.0E-02
DIPG-vs-MBL	1.6E-02
CRANIO-vs-MBL	1.3E-04
SCHW-vs-MBL	1.3-04
DNT-vs-MBL	8.4E-05
NFIB-vs-MBL	3.1E-05
EPMT-vs-MBL	7.7E-06
PHGG-vs-MBL	5.7E-10
PLGG-vs-MBL	2.6E-11

**Figura 15.** Expresión del gen de ISG15 en diferentes tipos de cáncer del SNC pediátrico, reportados en UALCAN-CBTTC. **MBL: Meduloblastoma**, ATRT:Tumor rabdoide teratoide atípico, CHDM:Cordoma, CPP: Papiloma del plexo coroideo, CRANIO: Craneofaringioma, DIPG: Glioma pontino intrínseco difuso, DNT: Tumor neuroepitelial disembrionárico, EPMT: Ependimoma, ES: Sarcoma de Ewings, GMN: Germinoma, GNG:Ganglioglioma, GNOS: Tumor glial-neuronal no especificado, MNG: Meningioma, NFIB: Neurofibroma/Plexiforme, PBL: Pineoblastoma, PHGG: Glioma/astrocitoma de alto grado, PLGG Glioma/astrocitoma de bajo grado, PNET: Neuroectodérmico primitivo supratentorial o medular, TT: Teratoma, SCHW: Schwannoma.

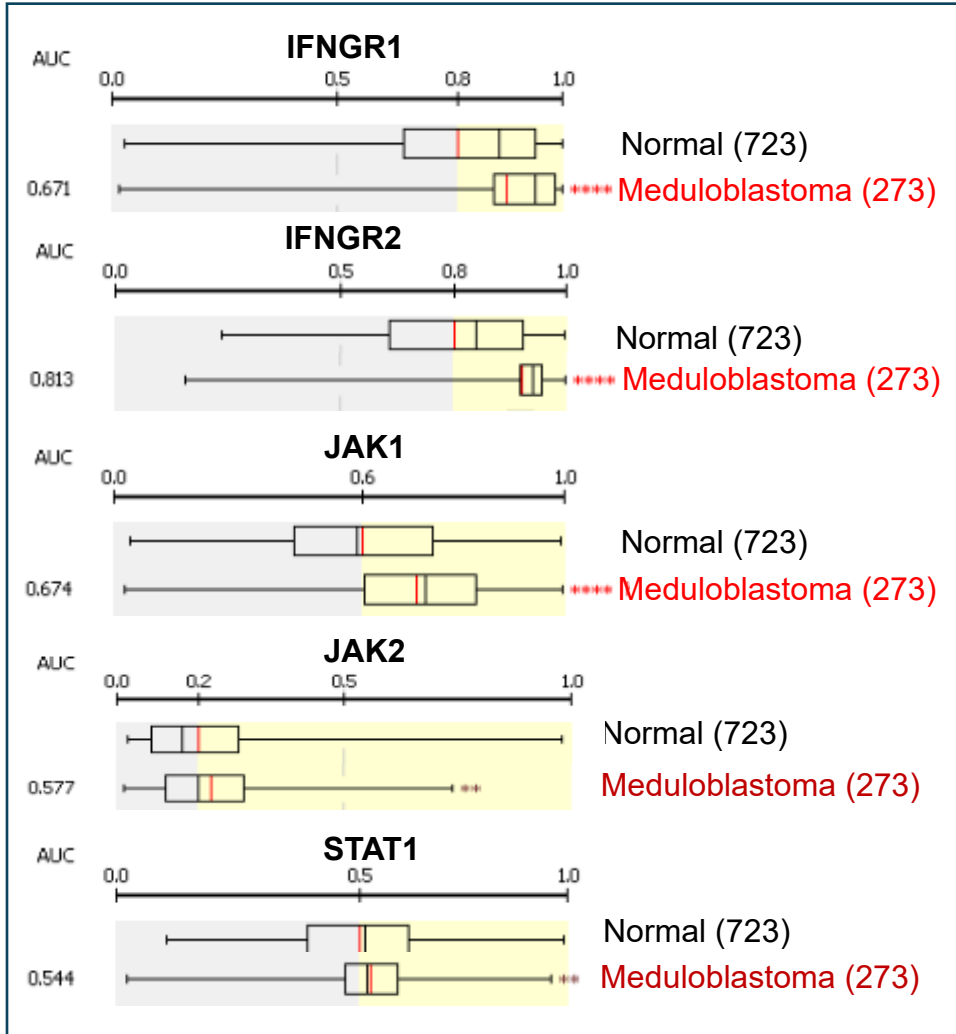


**Figura 16:** Gráficas de cajas y bigotes de la expresión de los elementos del sistema de ISGilación (ISG15, UBA1L, UBCH8, TRIM25, HERC5, ARIH1) en MB (n=273) respecto a una condición normal (n=723).

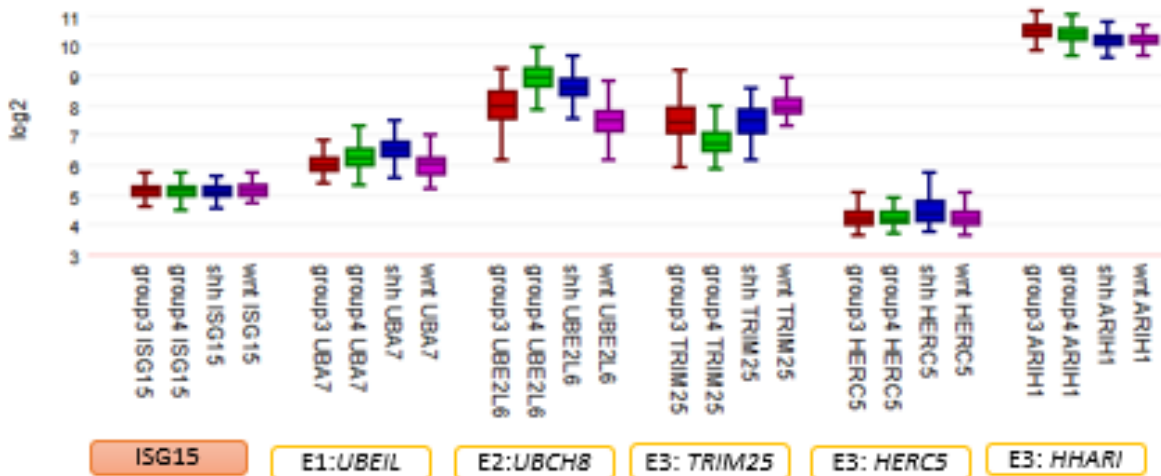
### **Expresión de IFN- $\gamma$ y de los componentes de su vía canónica en MB**

El IFN- $\gamma$  es un inductor de la expresión de ISG15 en contextos como glioblastoma, y su señalización es a través del sistema JAK/STAT1. La disponibilidad de estos mediadores puede influir en esta vía de señalización. El análisis *in silico* nos indicó que todos los elementos de la vía del IFN- $\gamma$ : *IFNGR1*, *IFNGR2*, *JAK1*, *JAK2*, *STAT1* están sobreexpresados de manera estadísticamente significativa en una condición de MB respecto a una condición normal, lo cual podemos observar en las gráficas de cajas y bigotes (Figura 17).

Una vez observado que los niveles de expresión de *ISG15* estaban disminuidos en MB respecto al tejido normal y que la expresión de los elementos del sistema de ISGilación estaban desregulados en MB, procedimos a determinar los niveles de expresión de *ISG15* y su implicación en la supervivencia de los subgrupos de MB humano, mediante el uso de la plataforma R2 Genomics Analysis and Visualization Platform. Observamos que la expresión de *ISG15* no cambia en cada uno de los subgrupos de MB (SHH, WNT, G3 y G4) (Figura 18), además de que tampoco se ve una diferencia estadísticamente significativa en las enzimas del sistema de ISGilación.

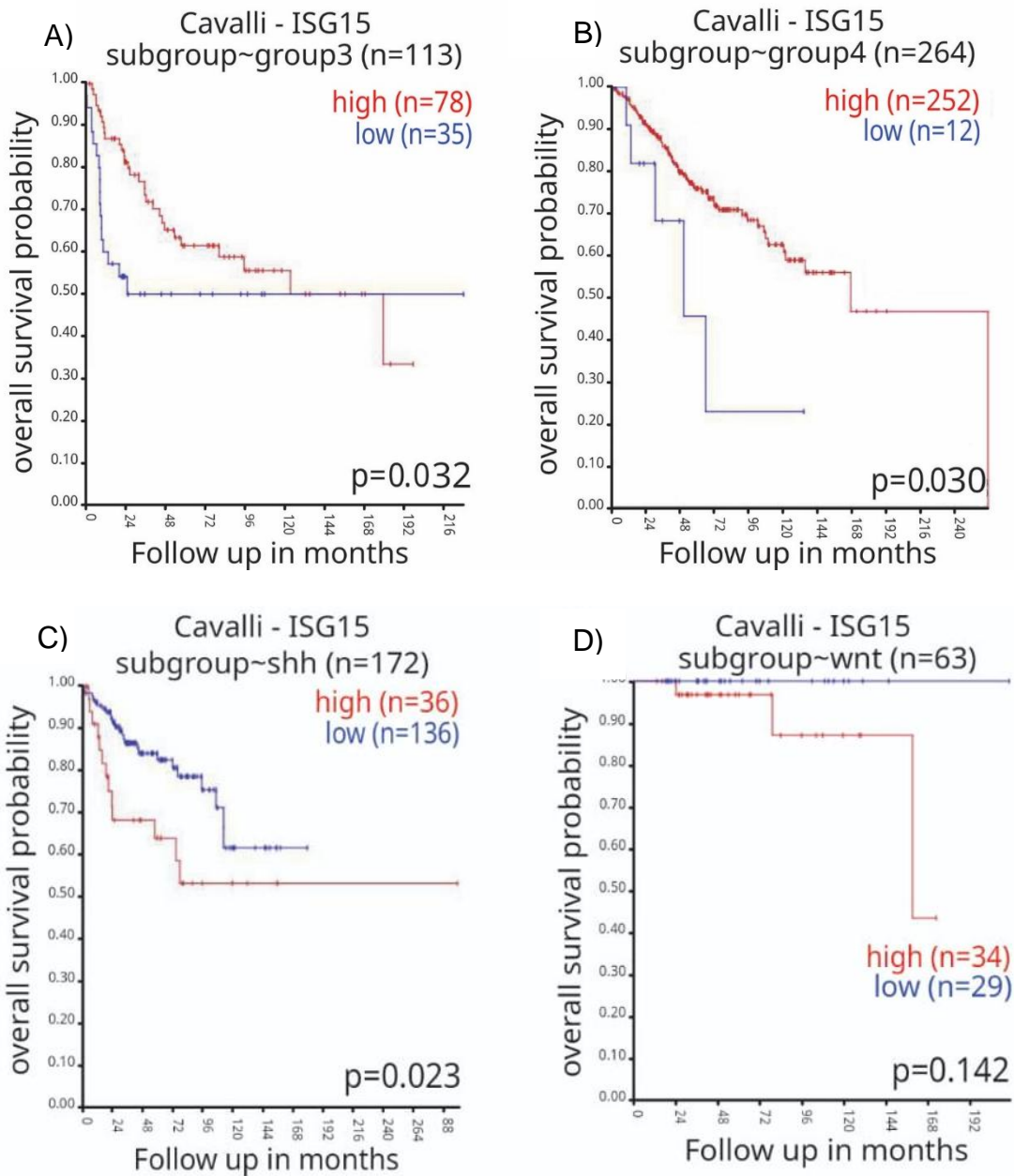


**Figura 17:** Gráficas de cajas y bigotes de la expresión de elementos de la vía del IFN- $\gamma$  en condiciones normales (n=723) vs MB (n=273).



**Figura 18:** Expresión de ISG15 y de los elementos del sistema de ISGilación en subgrupos de meduloblastoma humano. R2 Genomics Cavalli-763.

Con la información presentada en la base de datos R2 procedimos a analizar qué relación existe entre la expresión de ISG15 y la supervivencia de los pacientes, notamos que hay un efecto diferencial entre los subgrupos de MB, siendo los subgrupos 3 y 4 (Figura 19a, b) en donde una mayor expresión de ISG15 se correlaciona con una mayor supervivencia, y viceversa con los subgrupos SHH y WNT (Figura 19c, d), es decir, cuando hay una mayor expresión de ISG15 disminuye la supervivencia de los pacientes, pero ello solo es estadísticamente significativo en el subgrupo SHH se utilizó una regresión de Cox y chi-cuadrada como pruebas estadísticas; el cual corresponde con nuestro modelo de estudio.

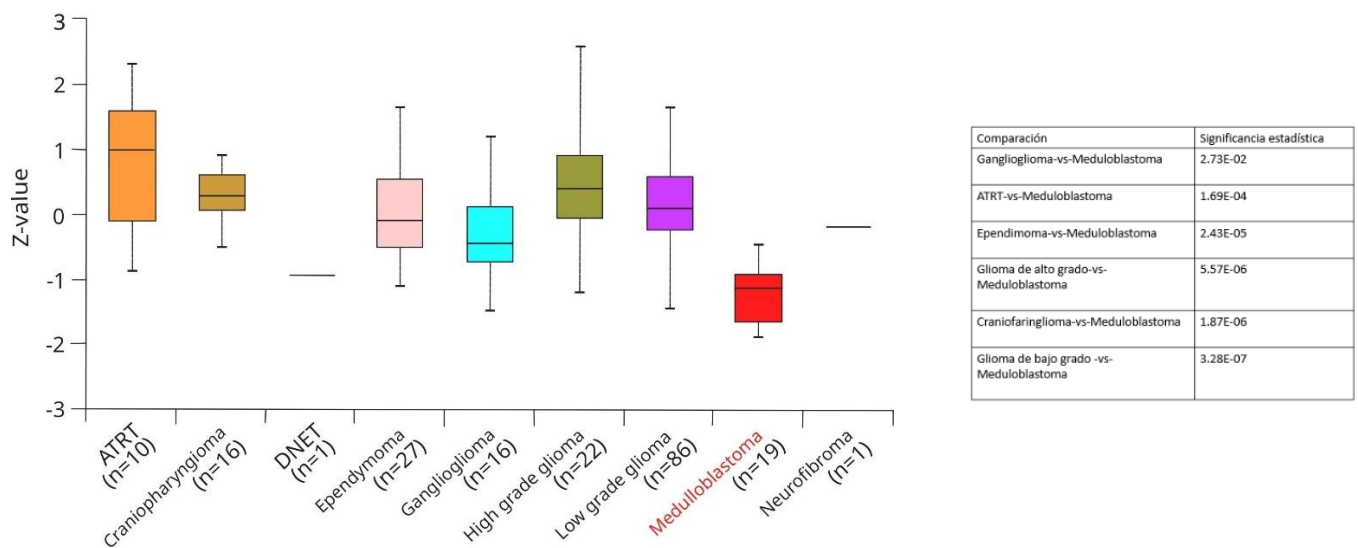


**Figura 19:** Análisis de la expresión de ISG15 con la supervivencia de los pacientes. Kaplan Meier para cada subgrupo de MB a) Grupo 3 b) Grupo 4 c) SHH d) WNT. High se refiere a los pacientes con MB que presentan un incremento en la expresión de ISG15, y low representa a los pacientes con MB con una disminución en la expresión de ISG15.

Al presentarse niveles de expresión disminuida de *ISG15* en muestras de MB, el siguiente objetivo consistió en analizar el perfil de abundancia de *ISG15* en muestras de pacientes con MB.

## Inmunohistoquímica contra *ISG15* en meduloblastoma y tejido normal

En la base de datos UALCAN-CBTTC esta reportado que la abundancia de *ISG15* esta disminuida respecto a otros tumores pediátricos (Figura 20); sin embargo, no hay datos reportados sobre la abundancia de *ISG15* en MB respecto a un tejido de cerebelo normal, por ello hicimos uso de un microarreglo de tejido de MB humano y mediante la técnica de IHQ se analizaron los niveles de la proteína *ISG15*.

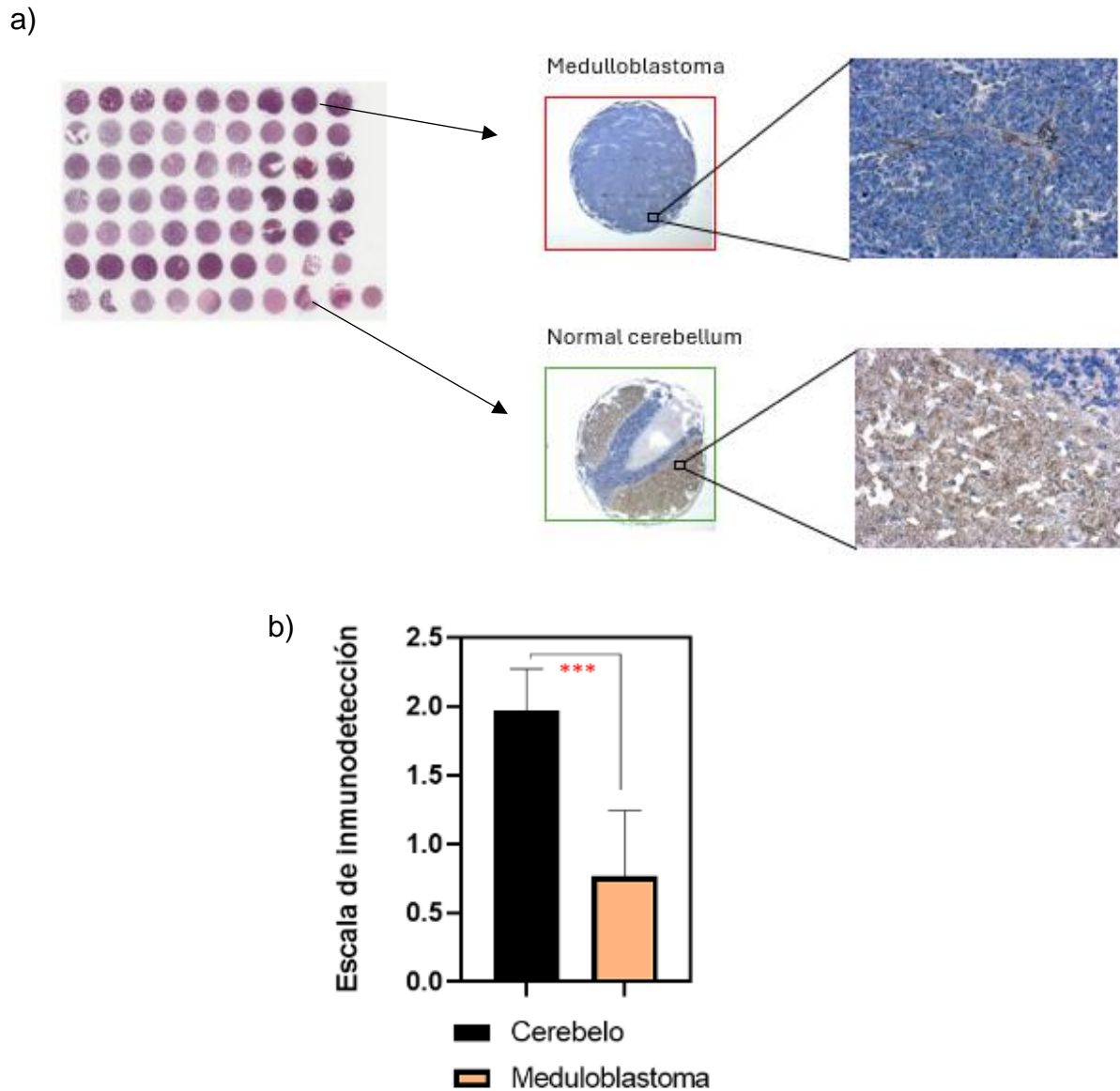


**Figura 20:** Abundancia de *ISG15* en meduloblastoma respecto a otros tumores pediátricos del SNC.

El microarreglo de tejido humano comercial (GL631, TissueArray) que utilizamos contenía 20 muestras de tejidos de MB por triplicado y 3 muestras de cerebelo normal. De estos casos, 8 provienen de pacientes femeninas y 12 de pacientes masculinos; además el rango de edades de los pacientes de donde provenían los tejidos oscila entre los 4 y 49 años, los tejidos control provienen de dos pacientes femeninas de 39 y 54 años y de un paciente masculino de 47 años.

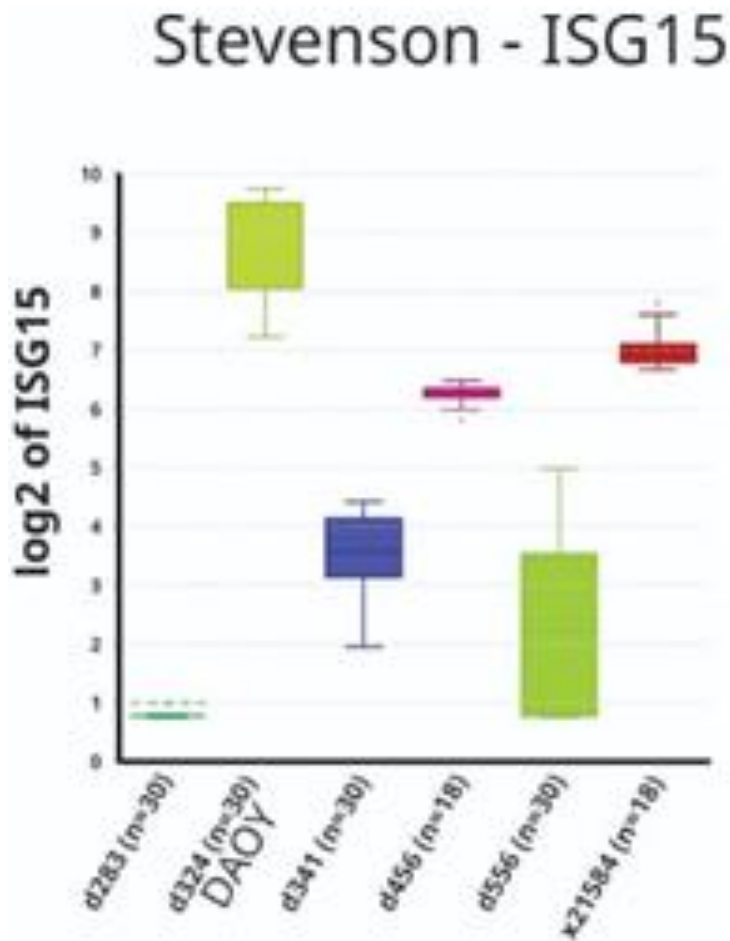
Para interpretar estos resultados es importante recordar que en la IHQ hay una reacción de inmunoperoxidasa, la cual utiliza a la enzima peroxidasa alcalina y un colorante como la DAB quien al conjugarse produce una coloración marrón, indicando que se unió al anticuerpo primario, que ha reconocido a la proteína de interés.

Los niveles de expresión de ISG15 en el contexto de MB de acuerdo a lo reportado en las bases de datos se encuentran disminuidos, ahora bien a nivel de proteína con el microarreglo comercial podemos observar que la abundancia de ISG15 es mayor en la muestra de tejido de cerebelo normal (Figura 21), porque presenta una mayor inmunopositividad, que visualmente se observa más precipitado insoluble de color marrón, producto de la reacción enzimática, a diferencia de lo que se observa en MB en el panel superior a un aumento de 40x, en donde predomina la coloración azul. El análisis semicuantitativo de densidad de pixeles permitió observar que la abundancia de ISG15 esta disminuida en los pacientes que tienen MB y fue estadísticamente significativo (t-student) (Figura 21b).



**Figura 21:** IHQ de ISG15 en MB. Bajos niveles de abundancia de ISG15 en tejido de medulloblastoma respecto a una condición normal, evidenciado por la reacción de peroxidasa que genera un precipitado marrón insoluble en presencia del anti-IgG de ratón. b) Escala de inmunodetección de ISG15 en MB vs cerebelo saludable \*\*\*: p 0.004 ((F-9): sc-166755 Santa Cruz) Los resultados se calificaron en función de la proporción de células positivas, utilizando los siguientes valores: 0 indica ausencia; 1 representa 0-10%; 2 corresponde a 11-50%; y 3 significa más del 50%. Los resultados se calibraron utilizando la fórmula  $x = (y - b)/m$ , y la expresión se categorizó como tinción débil, moderada o intensa (De Matos et al.,2006).

Los niveles de ISG15 se encuentran disminuidos tanto a nivel de expresión génica como de abundancia proteica en muestras de pacientes; sin embargo, en el modelo de estudio, mediante la plataforma R2, logramos comparar la expresión de algunas líneas celulares de MB humano, observando que la perteneciente al subgrupo SHH presenta la mayor expresión de ISG15 (Figura 22) respecto a líneas representativas del Grupo 3 y Grupo 4.

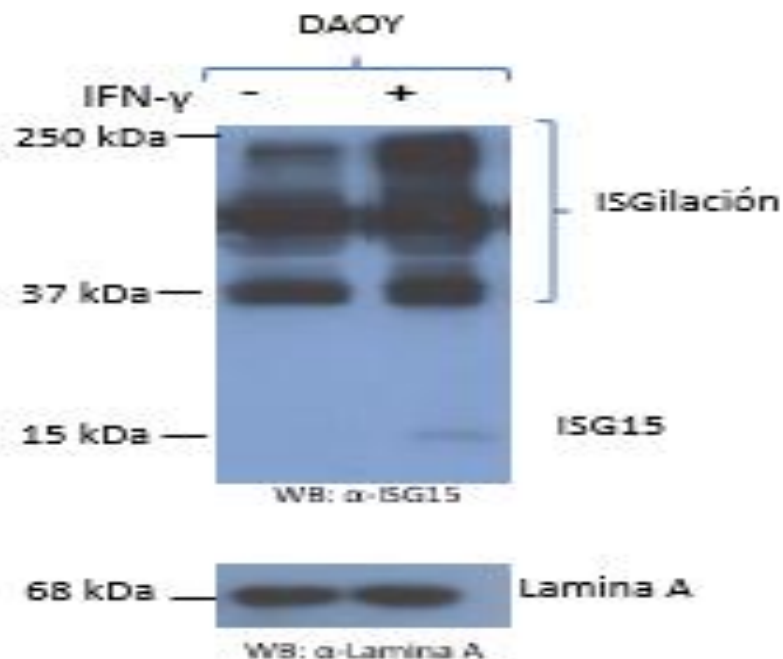


**Figura 22:** Análisis de la expresión de ISG15 en líneas celulares de meduloblastoma humano. d283 Grupo 3/4, d324 SHH, d341 Grupo 3, d456 Glioblastoma, d556 Grupo 3 x21584 Glioma de alto grado \*  $p = 3.42 \times 10^{-83}$  (anova). Stevenson-156.

Como previamente se mencionó, se ha reportado que el IFN- $\gamma$  puede inducir la expresión de ISG15 en otros contextos de cáncer como lo es el cáncer de mama y en el glioblastoma, por lo que decidimos analizar si el IFN- $\gamma$  podría estar induciendo la expresión de ISG15 en el contexto de MB y definir el efecto de la vía de señalización del IFN- $\gamma$  sobre los niveles de ISG15 y el perfil de ISGilación en células DAOY.

### El estímulo con IFN- $\gamma$ incrementa la expresión y abundancia de ISG15

El estímulo de células DAOY con 100 ng/mL de IFN- $\gamma$  durante 24 h, incrementó la abundancia de ISG15 respecto a una condición control, en extractos totales de proteína (Figura 23). Se puede observar que en una condición control, la fracción de ISG15 libre no se detecta y el perfil de ISGilación es menos evidente que cuando tenemos el estímulo con IFN- $\gamma$ , en donde se ve una banda de 15 kDa que correspondería a ISG15 libre y en la parte superior del WB se ve el perfil de ISGilación con marcas más fuertes, como control de carga se usó a lamina A.



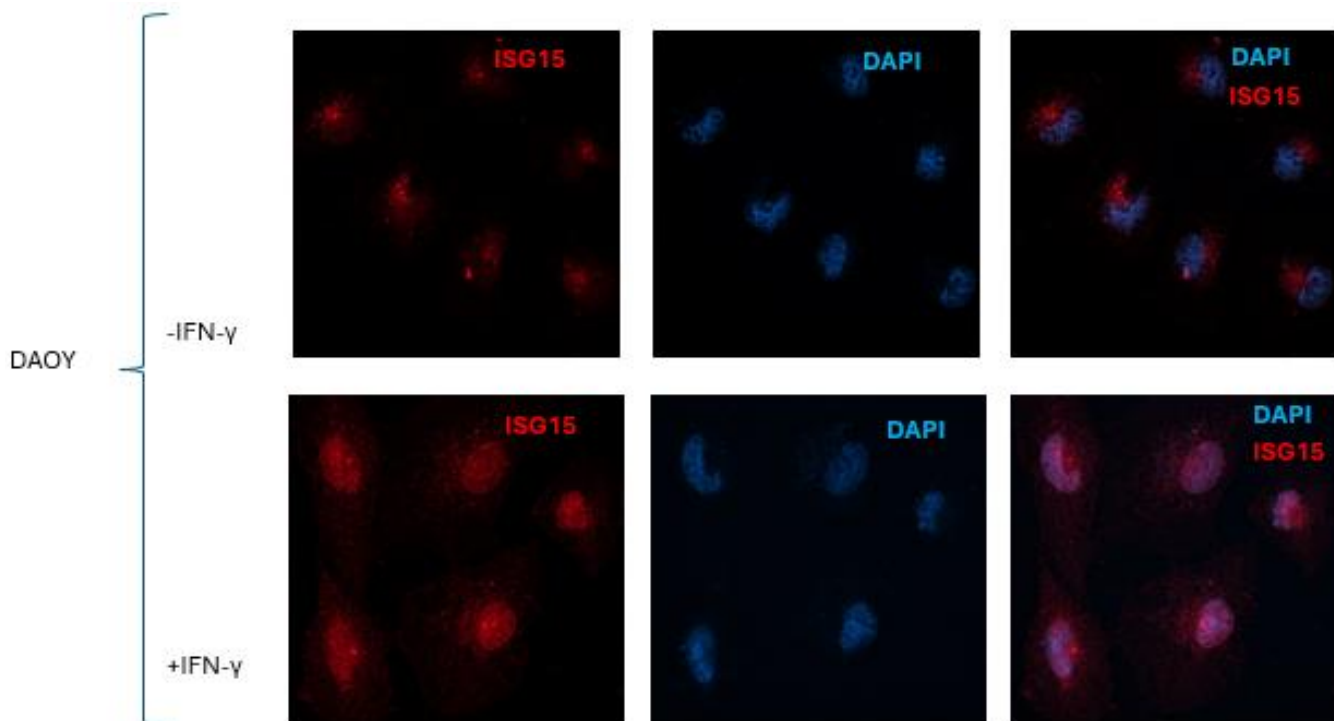
**Figura 23:** El estímulo con IFN- $\gamma$  [100 ng/ml] a las 24 horas incrementa a ISG15/ ISGilación en la línea celular de meduloblastoma DAOY. Extractos totales de la línea celular DAOY, (-) se refiere a la muestra control que no fue estimulada con IFN- $\gamma$ , (+) indica las muestras

que fueron estimuladas con IFN- $\gamma$ . En 15 kDa podemos observar a ISG15 en el carril 2 que corresponde a células estimuladas y el perfil de ISGilación parece tener marcas más intensas.

### Localización subcelular de ISG15 tras el estímulo con IFN- $\gamma$

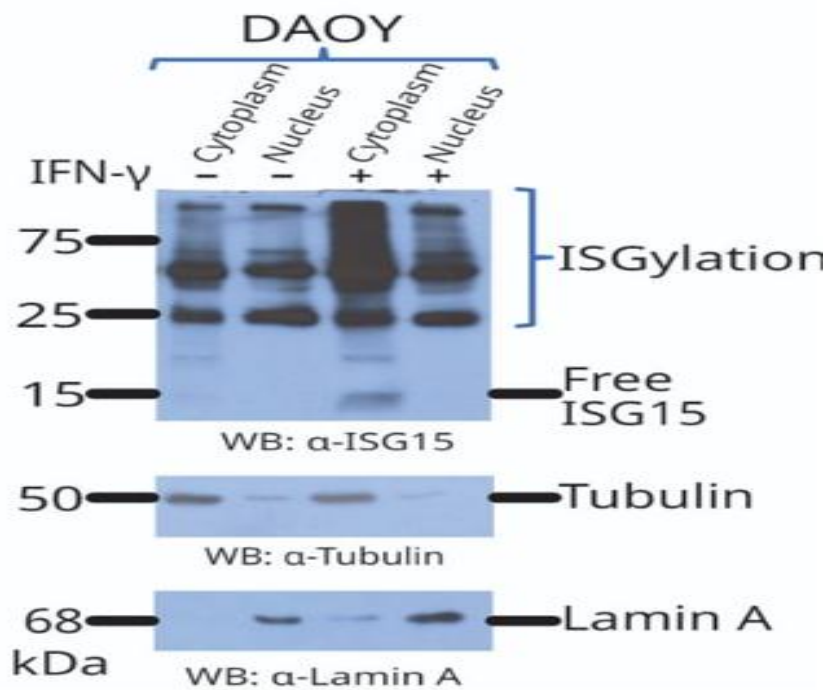
Mediante un ensayo de inmunofluorescencia de las células DAOY se confirma que el estímulo con 100 ng/mL de IFN- $\gamma$  induce un incremento de ISG15/ISGilación. En la figura 24, se observan unas marcas rojas que corresponden a ISG15, mayoritariamente distribuidas en el citoplasma; sin embargo, era importante saber si el incremento correspondía principalmente a la ISGilación o a ISG15 libre, por lo que se separaron la fracción citoplasmática y la nuclear.

En el fraccionamiento subcelular se encontró que ISG15/ISGilación se ve incrementada en el citoplasma con el estímulo de IFN- $\gamma$ , corroborando lo que se veía en la inmunofluorescencia, es decir que se localiza principalmente en este compartimento (figura 25).



**Figura 24:** Inmunofluorescencia de ISG15 ((F-9): sc-166755) en células DAOY utilizando como anticuerpo primario anti-ISG15 y anticuerpo secundario Alexa Flúor 647-conjugado. Hoechst se usó para teñir el núcleo. Imágenes obtenidas por un microscopio

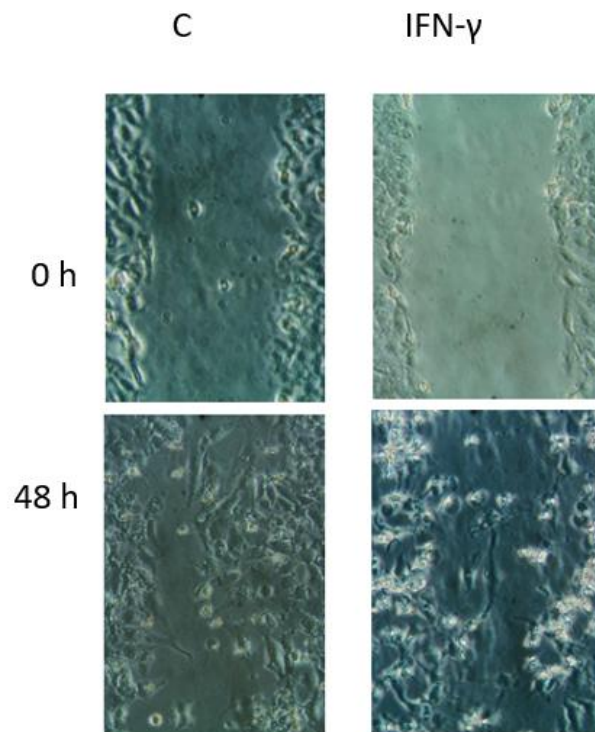
confocal. La fila superior corresponde a las muestras control, sin tratamiento de IFN- $\gamma$ , en el primer panel podemos observar la inmunofluorescencia de ISG15 marcada de color rojo, en el siguiente panel vemos la tinción de los núcleos de color azul y en el último panel el empalme de ambas fluorescencias. De igual manera observamos en la fila que corresponde a las células con estímulo de IFN- $\gamma$  inferior en el primer panel observamos un incremento de ISG15 representado por mayores marcas de fluorescencia roja, en el siguiente panel observamos la tinción de los núcleos.



**Figura 25:** El estímulo con IFN- $\gamma$  [100 ng/ml] a las 24 horas incrementa a ISG15/ISGilación principalmente en la fracción citoplasmática.

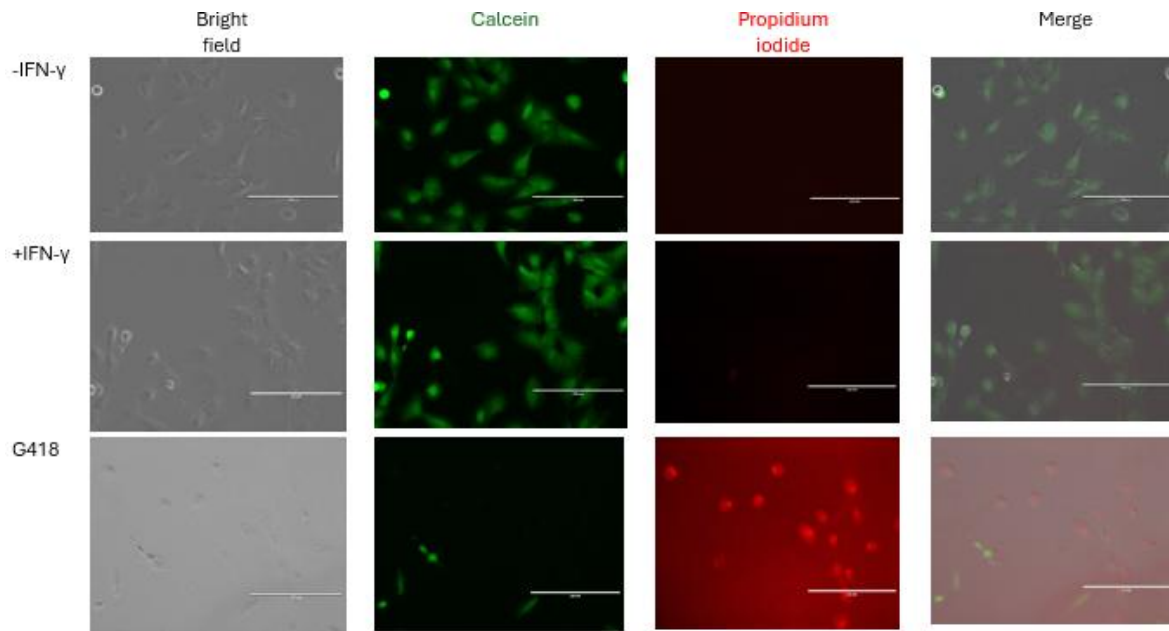
### El estímulo con IFN- $\gamma$ no afecta la viabilidad y la migración de células DAOY

Debido a que el estímulo con IFN- $\gamma$  incrementa la expresión y abundancia de ISG15, nos interesó conocer si se afectan la viabilidad y migración de estas células tratadas respecto a una condición sin estímulo o control. El análisis de migración se realizó mediante el ensayo de cierre de herida, que se hizo con una punta de micropipeta de 1mm; se tomaron las primeras fotos correspondientes a las 0 h, posteriormente se incubó con el IFN- $\gamma$  y se tomaron fotos a las 48 h (figura 26). Los resultados muestran que las células DAOY de MB estimuladas con el IFN- $\gamma$  no cambiaron su migración respecto del control.



**Figura 26:** Ensayo de cierre de herida para evaluar migración celular en células DAOY sin y con IFN- $\gamma$  (100 ng/mL). Registro fotográfico tomado a las 0 y 48h posterior al estímulo con IFN- $\gamma$ .

Partiendo de dos condiciones, un control y otra con estímulo de IFN- $\gamma$  (100ng/ml), se realizó el ensayo de calceína/yoduro de propidio en las células DAOY, para analizar si el IFN- $\gamma$  tiene algún efecto sobre la viabilidad celular (Figura 27). Los resultados muestran que el estímulo no tuvo efecto sobre la viabilidad celular, pues la cantidad de células teñidas de color rojo no fue estadísticamente significativa, comparando las células tratadas con las no estimuladas.



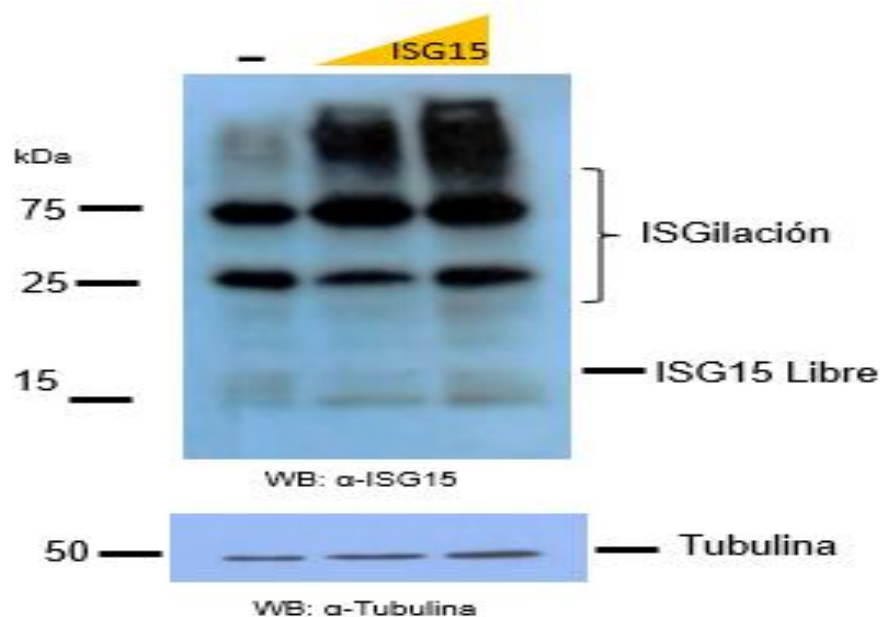
**Figura 27:** Ensayo de calceína/yoduro de propidio para analizar la viabilidad celular en la línea celular DAOY. G418 corresponde a un antibiótico utilizado como estímulo de muerte celular. Al comparar el panel superior (con IFN- $\gamma$ ) con el panel inferior (100 ng/mL de IFN- $\gamma$ ) se pudo determinar que el IFN- $\gamma$  no impacta sobre la viabilidad en células DAOY.

Hasta este punto se ha visto que en la línea celular de MB DAOY, los niveles de ISG15 están disminuidos, pero su expresión puede ser inducida tras el estímulo con IFN- $\gamma$ , lo que no afecta la viabilidad ni la migración celular. Lo siguiente fue sobreexpresar a ISG15 para determinar mediante ensayos funcionales que efecto tienen los cambios en sus niveles en el MB.

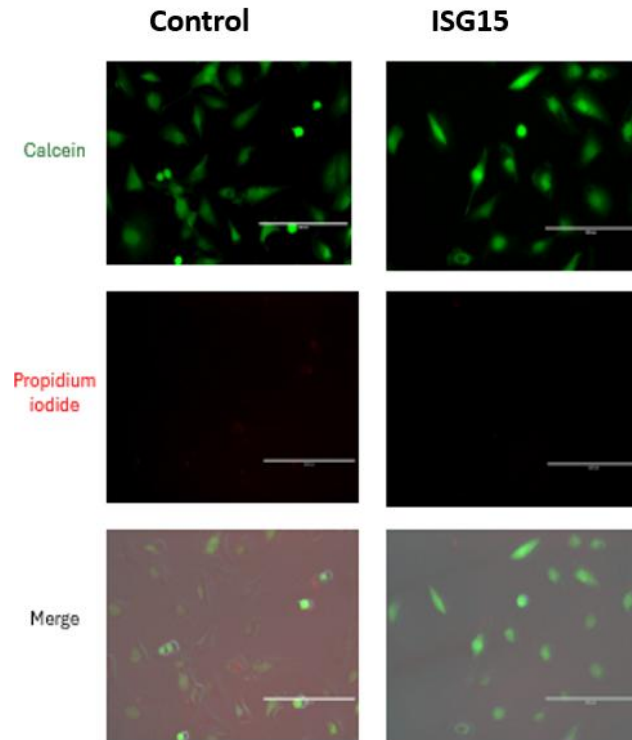
*Sobreexpresión de ISG15 en la línea celular DAOY*

Mediante el uso de un plásmido se logró la sobreexpresión de ISG15, para ellos se transfectaron células DAOY de MB y los niveles de ISG15 se analizaron en extractos proteicos totales mediante electroforesis SDS-PAGE y por WB (figura 28). Los resultados muestran que tras la sobreexpresión de ISG15, hay un incremento del perfil de ISGilación en las células DAOY, que es directamente proporcional al incremento de la concentración de plásmido transfectado.

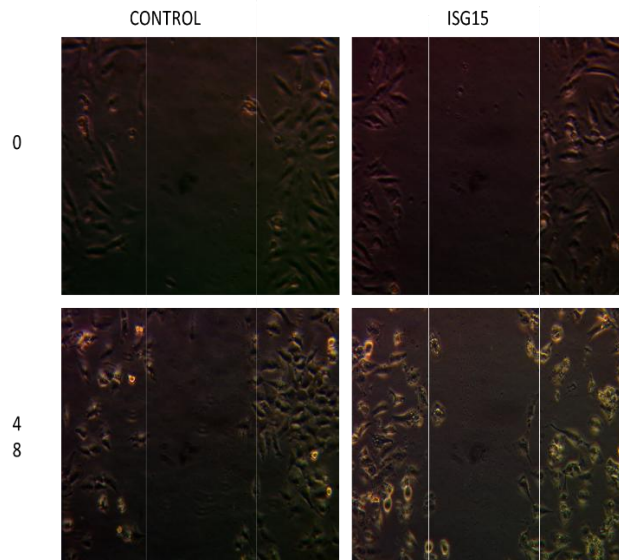
Una vez corroborado que las células DAOY sobreexpresaban a ISG15 se procedió a realizar ensayos funcionales, para la viabilidad se utilizó nuevamente la técnica de calceína-yoduro de propidio (figura 29), y para evaluar la migración celular se utilizó la técnica de cierre de herida (figura 30), obteniendo como resultado que la sobreexpresión de ISG15 no afecta la viabilidad ni la migración celular, bajo las condiciones analizadas.



**Figura 28:** Inmunoblot de la sobreexpresión de ISG15 en la línea celular DAOY, a concentraciones crecientes del plásmido de ISG15 podemos ver un incremento de la ISGilación de proteínas.



**Figura 29:** Ensayo calceína-yoduro de propidio de la línea celular DAOY en una condición control y con la sobreexpresión de ISG15.



**Figura 30:** Ensayo de cierre de herida, en la línea celular de Meduloblastoma DAOY en dos condiciones el primer panel corresponde a una condición normal y el

segundo con sobreexpresión de ISG15 y podemos observar no afectó la migración celular.

## DISCUSIÓN

El MB es un tumor pediátrico altamente agresivo que hasta la fecha ha sido poco estudiado a nivel molecular en comparación con otros tumores. Una de las vías que no ha sido estudiada en este tipo de tumores es la vía de señalización del IFN- $\gamma$  y el proceso de ISGilación. Estas vías si han sido evaluadas previamente en tumores de cerebro grado 4 que se presentan en adultos mayores, del tipo glioblastoma. En este escenario, los niveles de expresión de los elementos de la vía del IFN- $\gamma$  (*IFNGR1*, *IFNGR2*, *JAK1*, *JAK2*, *STAT1*) están incrementados, las enzimas del sistema de ISGilación (*UBA1L*, *UBCH8*, *TRIM25*, *HERC5*, *HHARI*) también se encuentran incrementadas respecto a una condición normal, altos niveles de *ISG15* se han visto relacionados con una menor supervivencia en los pacientes con GBM, lo que sugiere que *ISG15* tiene una función pro-tumoral en el GBM. Tanto la vía del IFN- $\gamma$  como de *ISG15* parecen tener una función dual dependiente del tipo de cáncer, y en el contexto del MB aún no se habían explorado. De acuerdo con los análisis en el presente trabajo, la expresión de los elementos que permiten la transducción de señales de la vía del IFN- $\gamma$  se encuentran incrementados en MB de igual forma con lo reportado en GBM (Zamora-Salas et al., 2024). En MB hay una expresión diferencial de *ISG15* y de las enzimas del sistema de ISGilación, es decir, *ISG15* se encuentra disminuido respecto a una condición normal, no obstante, la enzima E3 HHARI se encuentra incrementada y la enzima E3 HERC5 se encuentra disminuida, los demás elementos no presentaron diferencia estadísticamente significativa, esto es diferente con lo reportado en GBM, en donde todos los elementos de *ISG15*/ISGilación están incrementados. Estos resultados indican que la vía de señalización del IFN- $\gamma$  podría ser similar en ambos tipos de tumores del SNC, pero las acciones moleculares de *ISG15*, podrían tener un comportamiento diferente en el caso de MB. Dado que los niveles de *ISG15* se encuentran disminuidos en estos tumores sus funciones podrían estar asociadas con una

actividad antitumoral en este tipo de tumor pediátrico, de manera interesante la expresión de ISG15 fue menor en MB en comparación con otros tumores pediátricos. Además, la E3 ligasa HHARI podría ser la principal enzima responsable de la ISGilación en MB y tener implicaciones en la respuesta a diversos quimioterapéuticos entre ellos cisplatino (Dong et al., 2009), pero más estudios son requeridos; en contraste con lo reportado en otros tumores que son dependientes de HERC5. La enzima E3 ligasa es de suma importancia, ya que esta determina la especificidad de la proteína diana, lo cual resulta interesante ya que actualmente solo se conoce un blanco de la E3 ligasa incrementada en MB (F. Okumura et al., 2007), pero más estudios moleculares son necesarios.

El MB es altamente heterogéneo de tal manera que se tienen diferentes subgrupos (SHH, WNT, G3 y G4) con distintas características moleculares. En este trabajo se exploró si la expresión de ISG15 y los elementos del sistema de ISGilación podrían variar dependiendo del subgrupo de MB y se encontró que la expresión de ISG15 es similar en los diferentes subgrupos moleculares, al igual que el de las enzimas del sistema de ISGilación, y es importante notar que el comportamiento de la E3 ligasa HHAR1 también se encuentra incrementada en todos los subgrupos. No obstante, la expresión de ISG15 parece estar asociada con la supervivencia en los pacientes en cada subgrupo de MB. Se encontró que los pacientes del subgrupo G3, los cuales presentan una mayor expresión de MYC, y los del subgrupo G4, los cuales tienen incrementados los niveles de expresión de N-MYC, cuando presentan una mayor expresión de *ISG15* ocurre que el tiempo de sobrevida también es incremento, es decir, ISG15 podría tener una función antitumoral en estos subgrupos de MB. Sin embargo, para el subgrupo SHH, que presenta un incremento en la transcripción de genes asociados a gliomas por la desregulación de la vía SHH, se observó que cuando los pacientes tienen un incremento en la expresión de ISG15 el pronóstico es desfavorable, sugiriendo una función protumoral de ISG15. El subgrupo WNT no resultó tener una correlación entre ISG15 y la supervivencia de los pacientes que fuera estadísticamente significativa. Estos datos nos indican que ISG15 podría ser un marcador pronóstico en el MB-SHH, dado que un

incremento en los valores de su expresión puede definir una progresión de este tipo de cáncer. Este comportamiento que se observó podría deberse a la comunicación cruzada con las vías moleculares afectadas en cada subgrupo (vía SHH,WNT), pues la comunicación celular es distinta entre ellos. Estos datos requieren una mayor investigación de ISG15 y su posible función en estas vías moleculares desreguladas en cada uno de los subgrupos MB.

El análisis de IHQ evidenció que las muestras de pacientes con MB tienen bajos niveles de la proteína ISG15 en comparación con el tejido de cerebelo sano. Es importante notar que, aunque se tuvieron 20 casos por triplicado y 3 muestras de cerebelo sano, la información sobre el subgrupo molecular se desconoce por lo que queda pendiente evidenciar si los niveles de abundancia de ISG15 cambian dependiendo del subgrupo de MB. A pesar de que se presentó una diversidad de edades no eran suficientes las muestras para obtener una correlación entre la abundancia de ISG15 y la edad de los pacientes. Los niveles de abundancia de ISG15 fueron más bajos en MB respecto a otros tumores pediátricos, mismo comportamiento observado para la expresión. Un mayor número de muestras de MB y una correlación con más datos clínicos y con la expresión de ISG15 podría ayudar a entender mejor el comportamiento de ISG15 en los diferentes subgrupos de MB.

Actualmente sabemos que uno de los principales inductores de ISG15 es el IFN- $\gamma$ . La inducción de ISG15 por IFN- $\gamma$  se ha demostrado en el contexto de glioblastoma y en cáncer de mama (Tecalco-Cruz et al., 2022; Tecalco-Cruz & Cruz-Ramos, 2018), pero no había sido probado en el contexto del MB. La línea celular DAOY corresponde a un modelo ampliamente utilizado para el estudio de MB y del tipo MB-SHH, por lo que en este estudio fue utilizada para determinar la señalización del IFN- $\gamma$  sobre los niveles de ISG15/ISGilación y su localización subcelular. Los resultados evidenciaron que el IFN- $\gamma$  también incrementa los niveles de abundancia proteica de ISG15 y las marcas de ISGilación en células derivadas de MB y de

manera interesante se observó la localización subcelular de ISG15 enriquecida en el compartimento citoplasmático. A diferencia de lo reportado en células de cáncer de mama, en las células de MB se observaron niveles más altos de marcas de ISG15 que de ISG15 libre a las 24 h postratamiento con IFN- $\gamma$  y la localización de ISG15 fue principalmente citoplasmática. Por lo tanto, ISG15 podría cumplir funciones principalmente de un modificador de proteínas, a través de la ISG15, modulando la actividad de proteínas citoplasmáticas, que sería importante identificar. A la fecha, hay un número reducido de proteínas que se han identificado como blancos de ISG15 en otros contextos celulares, por lo que es un campo abierto de investigación. Sería interesante ver si el perfil de ISG15/ISG15 varía en cada subgrupo de MB, pues cada uno de ellos presenta afectaciones en distintas vías moleculares, dentro de las cuales ISG15 podría desempeñar un rol importante.

A pesar de que el presente estudio demostró que el IFN- $\gamma$  incrementa los niveles de ISG15/ISG15 en células de MB, las condiciones que se utilizaron de estimulación de IFN- $\gamma$  [100ng/mL] a las 24 h no condujeron a algún cambio o efecto sobre la viabilidad y migración de estas células, con las estrategias experimentales utilizadas para analizar la viabilidad celular por la técnica calceína/yoduro de propidio y la migración celular por la técnica de cierre de herida. En cuanto a la sobreexpresión de ISG15 tampoco se observó un cambio significativo en la viabilidad y la migración celular. Sin embargo, si se observó un cambio en la morfología de las células, en donde las células con una sobreexpresión de ISG15 eran menos alargadas y más ensanchadas a diferencia de una condición control.

El análisis de tiempos más prolongados de tratamiento o concentraciones diferentes de IFN- $\gamma$  podrían ser probadas para definir el efecto del IFN- $\gamma$  sobre los niveles de ISG15 y la viabilidad y capacidad de migración de estas células de MB e incluso ver si dentro de los subgrupos de MB hay un cambio funcional. De manera interesante, se obtuvo un dato preliminar que sugiere que el incremento de ISG15 mediado por IFN- $\gamma$  podría afectar los niveles de proteínas implicadas en la apoptosis como BAK, la cual corresponde a una proteína pro-apoptótica que se localiza en la membrana mitocondrial. Esto quiere decir que la sobreexpresión de ISG15 podría estar

inhibiendo los procesos de muerte celular mediados por apoptosis; este dato también sugiere que son necesarios más estudios sobre ISG15/ISGilación y su relación con las rutas apoptóticas.

## CONCLUSIÓN

La vía de señalización del IFN- $\gamma$  modula los niveles de abundancia proteica de ISG15 y el perfil de ISGilación en células DAOY de MB. Sin embargo, la viabilidad y la migración celular no fueron afectadas por la vía del IFN- $\gamma$ /ISG15 bajo las condiciones empleadas en este estudio.

En muestras de pacientes con MB, la expresión y abundancia de *ISG15* se encuentran disminuidas en comparación con el tejido normal. Dentro de las muestras de MB, un incremento en los niveles de *ISG15* en los tumores de MB-SHH se relaciona con una menor supervivencia de los pacientes, en comparación con los otros tipos de tumores de MB. Estos datos sugieren que ISG15 podría ser un marcador pronóstico de la progresión de los tumores de MB del subgrupo SHH.

## PERSPECTIVAS

Analizar los niveles de abundancia proteica de ISG15 en los diferentes subgrupos de MB y ver si hay una correlación con las vías moleculares que están afectadas y si hay una relación con los datos clínicos. Determinar si el perfil de ISGilación cambia dependiendo del subgrupo de MB y si hay una implicación en las vías apoptóticas. Identificar blancos de ISGilación en el contexto de MB.

Corroborar si en MB la abundancia de la E3 ligasa HHARI prevalece respecto a las otras ligasas E3 y determinar si el blanco de ISGilación conocido para esta E3 ligasa desempeña un rol importante en MB. Determinar si existe un eje de regulación entre el IFN- $\gamma$  y la E3 ligasa HHARI o con la enzima desISGilasa USP18. Además, sería importante analizar otros inductores de ISGilación en el contexto de MB y ver su relación con la resistencia a agentes usados en la quimioterapia.

## REFERENCIAS

- Ahmed, C. M. I., & Johnson, H. M. (2023). *IFN- $\gamma$  and Its Receptor Subunit IFNGR1 Are Recruited to the IFN-Activated Sequence Element at the Promoter Site of IFN-Activated Genes: Evidence of Transactivational Activity in IFNGR1*. *The Journal of Immunology*. <http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/177/1/315/1221684/zim01306000315.pdf>
- Akwa, Y., Hassett, D. E., Eloranta, M.-L., Sandberg, K., Masliah, E., Powell, H., Whitton, J. L., Bloom, F. E., & Campbell, I. L. (1998). Transgenic Expression of IFN- $\alpha$  in the Central Nervous System of Mice Protects Against Lethal Neurotropic Viral Infection but Induces Inflammation and Neurodegeneration. *The Journal of Immunology*, *161*(9), 5016–5026. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.161.9.5016>
- Arikan, F. (2018). Anatomía y fisiología del sistema nervioso central. *Unidad de Investigación de Neurotraumatología y Neurocirugía*, Vol. 1, 1–6. <https://doi.org/https://www.neurotrauma.net/pic2012/uploads/Documentacion/Enfermeria/Arikan.pdf>
- Avril, T., Saikali, S., Vauleon, E., Jary, A., Hamlat, A., De Tayrac, M., Mosser, J., & Quillien, V. (2010). Distinct effects of human glioblastoma immunoregulatory molecules programmed cell death ligand-1 (PDL-1) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) on tumour-specific T cell functions. *Journal of Neuroimmunology*, *225*(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.04.003>
- Ayrault, O., Zhao, H., Zindy, F., Qu, C., Sherr, C. J., & Roussel, M. F. (2010). Atoh1 inhibits neuronal differentiation and collaborates with Gli1 to generate medulloblastoma-initiating cells. *Cancer Research*, *70*(13). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3740>
- Bach, E. A., Aguet, M., & Schreiber, R. D. (1997). THE IFN $\gamma$  RECEPTOR: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. In *Annu. Rev. Immunol* (Vol. 15). [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
- Bhushan, J., Radke, J. B., Perng, Y. C., McAllaster, M., Lenschow, D. J., Virgin, H. W., & Sibley, L. D. (2020). Isg15 connects autophagy and ifn-dependent control of toxoplasma gondii infection in human cells. *MBio*, *11*(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.00852-20>
- Bogunovic, D., Boisson-Dupuis, S., & Casanova, J. L. (2013). ISG15: Leading a double life as a secreted molecule. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 45, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/emm.2013.36>
- Bogunovic, D., Byun, M., Durfee, L. A., Abhyankar, A., Sanal, O., Mansouri, D., Salem, S., Radovanovic, I., Grant, A. V., Adimi, P., Mansouri, N., Okada, S., Bryant, V. L., Kong, X. F., Kreins, A., Velez, M. M., Boisson, B., Khalilzadeh, S., Ozcelik, U., ... Casanova, J. L. (2012). Mycobacterial disease and impaired

- IFN- $\gamma$  immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science*, 337(6102). <https://doi.org/10.1126/science.1224026>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buckner, J. C., Brown, P. D., O'Neill, B. P., Meyer, F. B., Wetmore, C. J., & Uhm, J. H. (2007). Central nervous system tumors. *Mayo Clinic Proceedings*, 82(10), 1271–1286. <https://doi.org/10.4065/82.10.1271>
- Burke, J. D., & Young, H. A. (2019). IFN- $\Gamma$ : A cytokine at the right time, is in the right place. In *Seminars in Immunology* (Vol. 43). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.05.002>
- Burks, J., Reed, R. E., & Desai, S. D. (2014). ISGylation governs the oncogenic function of Ki-Ras in breast cancer. *Oncogene*, 33(6). <https://doi.org/10.1038/onc.2012.633>
- Burrell, C. J., Howard, C. R., Murphy, F. A., Burrell, C. J., Howard, C. R., & Murphy, F. A. (2017). Chapter 5 – Innate Immunity. *Fenner and White's Medical Virology*, 1.
- Caleb D. Swaim, Larissa A. Canadeo, Kristen J. Monte, Swati Khanna, Deborah J. Lenschow, J. M. H. (2020). Modulation of Extracellular ISG15 Signaling by Pathogens and Viral Effector Proteins. *Cellpress*, 7(jun), 19–21.
- Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018). Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>
- Cavalli, F. M. G., Remke, M., Rampasek, L., Peacock, J., Shih, D. J. H., Luu, B., Garzia, L., Torchia, J., Nor, C., Morrissy, A. S., Agnihotri, S., Thompson, Y. Y., Kuzan-Fischer, C. M., Farooq, H., Isaev, K., Daniels, C., Cho, B. K., Kim, S. K., Wang, K. C., ... Taylor, M. D. (2017). Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell*, 31(6). <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.05.005>
- Chairatvit, K., Wongnoppavich, A., & Choonate, S. (2012). Up-regulation of interferon-stimulated gene15 and its conjugates by tumor necrosis factor- $\alpha$  via type i interferon-dependent and -independent pathways. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 368(1–2). <https://doi.org/10.1007/s11010-012-1360-5>
- Chandrashekar, D. S., Bashel, B., Balasubramanya, S. A. H., Creighton, C. J., Ponce-Rodriguez, I., Chakravarthi, B. V. S. K., & Varambally, S. (2017). UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and

Survival Analyses. *Neoplasia (United States)*, 19(8), 649–658.  
<https://doi.org/10.1016/j.neo.2017.05.002>

- Chandrashekar, D. S., Karthikeyan, S. K., Korla, P. K., Patel, H., Shovon, A. R., Athar, M., Netto, G. J., Qin, Z. S., Kumar, S., Manne, U., Crieghton, C. J., & Varambally, S. (2022). UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia (United States)*, 25, 18–27.  
<https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.01.001>
- Chen, Y. L., Wu, W. L., Jang, C. W., Yen, Y. C., Wang, S. H., Tsai, F. Y., Shen, Y. Y., & Chen, Y. W. (2019). Interferon-stimulated gene 15 modulates cell migration by interacting with Rac1 and contributes to lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma cells. *Oncogene*, 38(23).  
<https://doi.org/10.1038/s41388-019-0731-8>
- Chiok, K., Pokharel, S. M., Mohanty, I., Miller, L. G., Gao, S. J., Haas, A. L., Tran, K. C., Teng, M. N., & Bose, S. (2022). Human Respiratory Syncytial Virus NS2 Protein Induces Autophagy by Modulating Beclin1 Protein Stabilization and ISGylation. *MBio*, 13(1). <https://doi.org/10.1128/MBIO.03528-21>
- Dai, Y., Yu, T., Yu, C., Lu, T., Zhou, L., Cheng, C., & Ni, H. (2022). ISG15 enhances glioma cell stemness by promoting Oct4 protein stability. *Environmental Toxicology*, 37(9). <https://doi.org/10.1002/tox.23556>
- D’Cunha, J., Ramanujam, S., Wagner, R. J., Witt, P. L., Knight, E., & Borden, E. C. (1996). In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFN-induced immunomodulatory cytokine. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 157(9).
- De Braganca, K. C., & Packer, R. J. (2013). Treatment options for medulloblastoma and CNS primitive neuroectodermal tumor (PNET). *Current Treatment Options in Neurology*, 15(5). <https://doi.org/10.1007/s11940-013-0255-4>
- De Matos, L. L., Stabenow, E., Tavares, M. R., Ferraz, A. R., Capelozzi, V. L., & Pinhal, M. A. D. S. (2006). Immunohistochemistry quantification by a digital computer-assisted method compared to semiquantitative analysis. *Clinics*, 61(5). <https://doi.org/10.1590/s1807-59322006000500008>
- Dong, K., Wang, R., Wang, X., Lin, F., Shen, J. J., Gao, P., & Zhang, H. Z. (2009). Tumor-specific RNAi targeting eIF4E suppresses tumor growth, induces apoptosis and enhances cisplatin cytotoxicity in human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, 113(3).  
<https://doi.org/10.1007/s10549-008-9956-x>
- Durfee, L. A., Lyon, N., Seo, K., & Huibregtse, J. M. (2010). The ISG15 Conjugation System Broadly Targets Newly Synthesized Proteins: Implications

- for the Antiviral Function of ISG15. *Molecular Cell*, 38(5), 722–732.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.002>
- Ealick, S., Cook, W., Vijay-Kumar, S., Carson, M., Nagabhushan, T., Trotta, P., & Bugg, C. (1991). Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. *Science*, 252(5006).  
<https://doi.org/10.1126/science.1902591>
- Eisemann, T., & Wechsler-Reya, R. J. (2022). Coming in from the cold: overcoming the hostile immune microenvironment of medulloblastoma. In *Genes and Development* (Vol. 36, Issues 9–10).  
<https://doi.org/10.1101/GAD.349538.122>
- Florence M G Cavalli, Marc Remke, & Ladislav Rampasek. (2017). Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell*, 31(6).  
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.05.005>
- Freitas, B. T., Scholte, F. E. M., Bergeron, É., & Pegan, S. D. (2020). How ISG15 combats viral infection. *Virus Research*, 286(February), 198036.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198036>
- García-Porrero, J. A. (2014). CAPÍTULO 5: Anatomía macroscópica del cerebelo. In *Neuroanatomía humana* (1st ed., p. 404). Editorial Médica Panamericana.
- Gururangan, S., Reap, E., Schmittling, R., Kocak, M., Reynolds, R., Grant, G., Onar-Thomas, A., Baxter, P., Pollack, I. F., Phillips, P., Boyett, J., Fouladi, M., & Mitchell, D. (2017). Regulatory T cell subsets in patients with medulloblastoma at diagnosis and during standard irradiation and chemotherapy (PBTC N-11). *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 66(12).  
<https://doi.org/10.1007/s00262-017-2051-6>
- Hare, N. J., Chan, B., Chan, E., Kaufman, K. L., Britton, W. J., & Saunders, B. M. (2015). Microparticles released from Mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages contain increased levels of the type I interferon inducible proteins including ISG15. *Proteomics*, 15(17).  
<https://doi.org/10.1002/pmic.201400610>
- Hill, R. M., Richardson, S., Schwalbe, E. C., Hicks, D., Lindsey, J. C., Crosier, S., Rafiee, G., Grabovska, Y., Wharton, S. B., Jacques, T. S., Michalski, A., Joshi, A., Pizer, B., Williamson, D., Bailey, S., & Clifford, S. C. (2020). Time, pattern, and outcome of medulloblastoma relapse and their association with tumour biology at diagnosis and therapy: a multicentre cohort study. *The Lancet Child and Adolescent Health*, 4(12). [https://doi.org/10.1016/S2352-4642\(20\)30246-7](https://doi.org/10.1016/S2352-4642(20)30246-7)
- Hsiao, N. W., Chen, J. W., Yang, T. C., Orloff, G. M., Wu, Y. Y., Lai, C. H., Lan, Y. C., & Lin, C. W. (2010). ISG15 over-expression inhibits replication of the

- Japanese encephalitis virus in human medulloblastoma cells. *Antiviral Research*, 85(3). <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.12.007>
- Huang, Y. F., & Bulavin, D. V. (2014). Oncogene-mediated regulation of p53 ISGylation and functions. *Oncotarget*, 5(14). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2199>
- Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1988). Classics in oncology: Virus interference: I. the interferon. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 38(5).
- Jacobsen, P. F., Jenkyn, D. J., & Papadimitriou, J. M. (1985). Establishment of a human medulloblastoma cell line and its heterotransplantation into nude mice. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 44(5). <https://doi.org/10.1097/00005072-198509000-00003>
- Jeon, Y. J., Choi, J. S., Lee, J. Y., Yu, K. R., Kim, S. M., Ka, S. H., Oh, K. H., Kim, K. II, Zhang, D. E., Bang, O. S., & Chung, C. H. (2009). ISG15 modification of filamin B negatively regulates the type I interferon-induced JNK signalling pathway. *EMBO Reports*, 10(4), 374–380. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.23>
- Ji, H., Ba, Y., Ma, S., Hou, K., Mi, S., Gao, X., Jin, J., Gong, Q., Liu, T., Wang, F., Liu, Z., Li, S., Du, J., & Hu, S. (2021). Construction of Interferon-Gamma-Related Gene Signature to Characterize the Immune-Inflamed Phenotype of Glioblastoma and Predict Prognosis, Efficacy of Immunotherapy and Radiotherapy. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.729359>
- Jia, H., Xie, X., Wang, L., Wang, L., & Che, F. (2022). IFN- $\gamma$  induces PD-L1 through p38/JNK/ERK signaling pathways and counteracts the tumor promoting effect mediated by PD-L1 in Glioblastoma. *Computational Intelligence and Neuroscience*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/5492602>
- Juraschka, K., & Taylor, M. D. (2019). Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 24(4). <https://doi.org/10.3171/2019.5.peds18381>
- Karachi, A., Dastmalchi, F., Mitchell, D. A., & Rahman, M. (2018). Temozolomide for immunomodulation in the treatment of glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 20(12). <https://doi.org/10.1093/neuonc/nyy072>
- Karlsson, J. O., Ostwald, K., Kåbjörn, C., & Andersson, M. (1994). A method for protein assay in laemmli buffer. *Analytical Biochemistry*, 219(1). <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1243>
- Kelker, H. C., Le, J., Rubin, B. Y., Yip, Y. K., Nagler, C., & Vilcek, J. (1984). Three molecular weight forms of natural human interferon- $\gamma$  revealed by

- immunoprecipitation with monoclonal antibody. *Journal of Biological Chemistry*, 259(7). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)43045-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43045-6)
- King, J. L., & Benhabbour, S. R. (2021). Glioblastoma multiforme—a look at the past and a glance at the future. In *Pharmaceutics* (Vol. 13, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13071053>
- Knüpfer, M., Poppenborg, H., Van Gool, S., Domula, M., & Wolff, J. (1997). Interferon-gamma inhibits proliferation and adhesion of T98G human malignant glioma cells in vitro. *Klinische Pädiatrie*, 209(04). <https://doi.org/10.1055/s-2008-1043961>
- Kool, M., Jones, D. T. W., Jäger, N., Northcott, P. A., Pugh, T. J., Hovestadt, V., Piro, R. M., Esparza, L. A., Markant, S. L., Remke, M., Milde, T., Bourdeaut, F., Ryzhova, M., Sturm, D., Pfaff, E., Stark, S., Hutter, S., Sxeker-Cin, H., Johann, P., ... Pfister, S. M. (2014). Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothed inhibition. *Cancer Cell*, 25(3). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.004>
- Korentzelos, D., Wells, A., & Clark, A. M. (2022). Interferon- $\gamma$  increases sensitivity to chemotherapy and provides immunotherapy targets in models of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10724-9>
- Koster, J., Volckmann, R., Zwijnenburg, D., Molenaar, P., & Versteeg, R. (2019). Abstract 2490: R2: Genomics analysis and visualization platform. *Cancer Research*, 79(13\_Supplement). <https://doi.org/10.1158/1538-7445.am2019-2490>
- Kralik, S. F., Ho, C. Y., Finke, W., Buchsbaum, J. C., Haskins, C. P., & Shih, C. S. (2015). Radiation necrosis in pediatric patients with brain tumors treated with proton radiotherapy. *American Journal of Neuroradiology*, 36(8). <https://doi.org/10.3174/ajnr.A4333>
- Kruger, N. J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 32). <https://doi.org/10.1385/0-89603-268-x:9>
- Kursunel, M. A., & Esendagli, G. (2016). The untold story of IFN- $\gamma$  in cancer biology. In *Cytokine and Growth Factor Reviews* (Vol. 31). <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.07.005>
- Liu, A. K., Macy, M. E., & Foreman, N. K. (2009). Bevacizumab as Therapy for Radiation Necrosis in Four Children With Pontine Gliomas. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 75(4). <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.12.032>

- López-Soto, D., Pérez-Atilano, Y., & Huerta-Pioquinto, A. (2018). Sistema nervioso central del Homo sapiens: anatomía y fisiología del encéfalo. *Uno Sapiens Boletín Científico de La Escuela Preparatoria No. 1*, 1(1).
- Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., Von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro-Oncology*, 23(8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>
- Maier, H., Dalianis, T., & Kostopoulou, O. N. (2021). New approaches in targeted therapy for medulloblastoma in children. In *Anticancer Research* (Vol. 41, Issue 4). <https://doi.org/10.21873/anticanres.14936>
- Manns, J. M. (2011). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of proteins. *Current Protocols in Microbiology, SUPPL. 22*. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03ms22>
- Mao, H., Wang, M., Cao, B., Zhou, H., Zhang, Z., & Mao, X. (2016). Interferon-stimulated gene 15 induces cancer cell death by suppressing the NF-κB signaling pathway. *Oncotarget*, 7(43). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12160>
- Martínez León, M. I. (2011). Medulloblastoma pediátrico, revisión y puesta al día. *Radiología*, 53(2). <https://doi.org/10.1016/j.rx.2010.11.005>
- Matikainen, S., Paananen, A., Miettinen, M., Kurimoto, M., Timonen, T., Julkunen, I., & Sareneva, T. (2001). IFN-α and IL-18 synergistically enhance IFN-γ production in human NK cells: Differential regulation of Stat4 activation and IFN-γ gene expression by IFN-α and IL-12. *European Journal of Immunology*, 31(7). [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200107\)31:7<2236::AID-IMMU2236>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200107)31:7<2236::AID-IMMU2236>3.0.CO;2-G)
- Megías, M. (2021). Atlas de Histología Vegetal y Animal. *Alambique: Didáctica de Las Ciencias Experimentales*, 90.
- Millard, N. E., & De Braganca, K. C. (2016). Medulloblastoma. *Journal of Child Neurology*, 31(12), 1341–1353. <https://doi.org/10.1177/0883073815600866>
- Miller, K. D., Ostrom, Q. T., Kruchko, C., Patil, N., Tihan, T., Cioffi, G., Fuchs, H. E., Waite, K. A., Jemal, A., Siegel, R. L., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2021). Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(5). <https://doi.org/10.3322/caac.21693>
- Mirzalieva, O., Juncker, M., Schwartzburg, J., & Desai, S. (2022). ISG15 and ISGylation in Human Diseases. In *Cells* (Vol. 11, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/cells11030538>

- NCI. (2014). *Childhood Central Nervous System Embryonal Tumors Treatment (PDQ®)*. National Cancer Institute.  
<https://doi.org/https://www.cancer.gov/types/brain/hp/child-cns-embryonal-treatment-pdq>
- Negishi, H., Taniguchi, T., & Yanai, H. (2018). The interferon (IFN) class of cytokines and the IFN regulatory factor (IRF) transcription factor family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(11).  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028423>
- Nguyen, H. M., Gaikwad, S., Oladejo, M., Agrawal, M. Y., Srivastava, S. K., & Wood, L. M. (2023). Interferon stimulated gene 15 (ISG15) in cancer: An update. In *Cancer Letters* (Vol. 556).  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216080>
- Nguyen, K. B., Cousens, L. P., Doughty, L. A., Pien, G. C., Durbin, J. E., & Biron, C. A. (2000). Interferon  $\alpha/\beta$ -mediated inhibition and promotion of interferon  $\gamma$ : STAT1 resolves a paradox. *Nature Immunology*, 1(1).  
<https://doi.org/10.1038/76940>
- Okumura, A., Pitha, P. M., & Harty, R. N. (2008). ISG15 inhibits Ebola VP40 VLP budding in an L-domain-dependent manner by blocking Nedd4 ligase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.0710629105>
- Okumura, F., Zou, W., & Zhang, D. E. (2007). ISG15 modification of the eIF4E cognate 4EHP enhances cap structure-binding activity of 4EHP. *Genes and Development*, 21(3), 255–260. <https://doi.org/10.1101/gad.1521607>
- Ortiz Gómez, L. D., Peláez, R. G., & Contreras, H. J. (2023). Mutaciones en los genes PIK3c2B, ERBB3, KIT y MLH1 se correlaciona con la resistencia al uso de temozolomida en pacientes con gliomas de alto grado. *Revista Colombiana de Hematología y Oncología*, 9(Supl). <https://doi.org/10.51643/22562915.557>
- Pak, J. E., Sharon, C., Satkunarajah, M., Auperin, T. C., Cameron, C. M., Kelvin, D. J., Seetharaman, J., Cochrane, A., Plummer, F. A., Berry, J. D., & Rini, J. M. (2020). *ISG15: It's Complicated Review John. January.*
- Park, J. H., Yang, S. W., Park, J. M., Ka, S. H., Kim, J. H., Kong, Y. Y., Jeon, Y. J., Seol, J. H., & Chung, C. H. (2016). Positive feedback regulation of p53 transactivity by DNA damage-induced ISG15 modification. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12513>
- Park, S. Y., Yoon, S., Kim, H., & Kim, K. K. (2016). 90K Glycoprotein Promotes Degradation of Mutant  $\beta$ -Catenin Lacking the ISGylation or Phosphorylation Sites in the N-terminus. *Neoplasia (United States)*, 18(10).  
<https://doi.org/10.1016/j.neo.2016.08.006>

- Park, Y. S., Kwon, Y. J., & Chun, Y. J. (2017). CYP1B1 activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling through suppression of Herc5-mediated ISGylation for protein degradation on  $\beta$ -catenin in HeLa cells. *Toxicological Research*, 33(3). <https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.3.211>
- Pérez Barco, E. (2023). *Identificación de genes asociados a cáncer modulados por la señalización del IFN-gamma en células de glioblastoma* [UACM]. <https://doi.org/http://repositorioinstitucionaluacm.mx/jspui/handle/123456789/2534>
- Perng, Y. C., & Lenschow, D. J. (2018). ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 423–439. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0020-5>
- Perreault, S., Ramaswamy, V., Achrol, A. S., Chao, K., Liu, T. T., Shih, D., Remke, M., Schubert, S., Bouffet, E., Fisher, P. G., Partap, S., Vogel, H., Taylor, M. D., Cho, Y. J., & Yeom, K. W. (2014). MRI surrogates for molecular subgroups of medulloblastoma. *American Journal of Neuroradiology*, 35(7). <https://doi.org/10.3174/ajnr.A3990>
- Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. In *Immunological Reviews* (Vol. 202). <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>
- Phoenix, T. N., Patmore, D. M., Boop, S., Boulos, N., Jacus, M. O., Patel, Y. T., Roussel, M. F., Finkelstein, D., Goumnerova, L., Perreault, S., Wadhwa, E., Cho, Y. J., Stewart, C. F., & Gilbertson, R. J. (2016). Medulloblastoma Genotype Dictates Blood Brain Barrier Phenotype. *Cancer Cell*, 29(4). <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.002>
- Quinlan, A., & Rizzolo, D. (2017). Understanding medulloblastoma. In *Journal of the American Academy of Physician Assistants* (Vol. 30, Issue 10, pp. 30–36). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000524717.71084.50>
- Ramaswamy, V., Nör, C., & Taylor, M. D. (2016). p53 and medulloblastoma. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026278>
- Renauld, J. C. (2003). Class II cytokine receptors and their ligands: Key antiviral and inflammatory modulators. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 3, Issue 8). <https://doi.org/10.1038/nri1153>
- Robles M. Lucero. (2023). *Caracterización de la proteína ISG15 en células de glioblastoma humano*. UACM.
- Schakelaar, M. Y., Monnikhof, M., Crnko, S., Pijnappel, E. W., Meeldijk, J., ten Broeke, T., & Bovenschen, N. (2023). Cellular immunotherapy for

- medulloblastoma. In *Neuro-Oncology* (Vol. 25, Issue 4).  
<https://doi.org/10.1093/neuonc/noac236>
- Shujathf, J. M. (2011). Advances in interferon delivery methods: A historical perspective. In *Drug Delivery Technology* (Vol. 11, Issue 1).
- Smoll, N. R., & Drummond, K. J. (2012). The incidence of medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumours in adults and children. *Journal of Clinical Neuroscience*, *19*(11). <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2012.04.009>
- Song, M., Ping, Y., Zhang, K., Yang, L., Li, F., Zhang, C., Cheng, S., Yue, D., Maimela, N. R., Qu, J., Liu, S., Sun, T., Li, Z., Xia, J., Zhang, B., Wang, L., & Zhang, Y. (2019). Low-dose IFN $\gamma$  induces tumor cell stemness in tumor microenvironment of non-small cell lung cancer. *Cancer Research*, *79*(14), 3737–3748. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0596>
- Stratton, M. R., Cooper, C. S., Darling, J., Pilkington, G. J., Stratton, M. R., Lantos, P. L., & Reeves, B. R. (1989). Characterization of the human cell line te671. *Carcinogenesis*, *10*(5). <https://doi.org/10.1093/carcin/10.5.899>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249.  
<https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Swaim, C. D., Scott, A. F., Canadeo, L. A., & Huibregtse, J. M. (2017). Extracellular ISG15 Signals Cytokine Secretion through the LFA-1 Integrin Receptor. *Molecular Cell*, *68*(3). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.003>
- Taylor, M. D., Northcott, P. A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y. J., Clifford, S. C., Eberhart, C. G., Parsons, D. W., Rutkowski, S., Gajjar, A., Ellison, D. W., Lichten, P., Gilbertson, R. J., Pomeroy, S. L., Kool, M., & Pfister, S. M. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. *Acta Neuropathologica*, *123*(4). <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0922-z>
- Tecalco-Cruz, A. C. (2020). Molecular pathways of Interferon-Stimulated Gene 15: Implications in cancer. *Current Protein & Peptide Science*, *21*, 1–10.  
<https://doi.org/10.2174/1389203721999201208200747>
- Tecalco-Cruz, A. C., Cortés-González, C. C., Cruz-Ramos, E., Ramírez Jarquín, J. O., Romero-Mandujano, A. K., & Sosa-Garrocho, M. (2019). Interplay between interferon-stimulated gene 15/ISGylation and interferon gamma signaling in breast cancer cells. *Cellular Signalling*, *54*, 91–101.  
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.11.021>
- Tecalco-Cruz, A. C., & Cruz-Ramos, E. (2018). Protein ISGylation and free ISG15 levels are increased by interferon gamma in breast cancer cells. *Biochemical*

*and Biophysical Research Communications*, 499(4).  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.030>

- Tecalco-Cruz, A. C., Medina-Abreu, K. H., Oropeza-Martínez, E., Zepeda-Cervantes, J., Vázquez-Macías, A., & Macías-Silva, M. (2024). Deregulation of interferon-gamma receptor 1 expression and its implications for lung adenocarcinoma progression. *World Journal of Clinical Oncology*, 15(2).  
<https://doi.org/10.5306/wjco.v15.i2.195>
- Tecalco-Cruz, A. C., Ramírez-Jarquín, J. O., & Cruz-Ramos, E. (2020). Regulation and action of interferon-stimulated gene 15 in breast cancer cells. *Human Cell*, 33(4), 954–962. <https://doi.org/10.1007/s13577-020-00414-x>
- Tecalco-Cruz, A. C., Sosa-Garrocho, M., Vázquez-Victorio, G., Ortiz-García, L., Domínguez-Hüttinger, E., & Macías-Silva, M. (2012). Transforming growth factor- $\beta$ /SMAD target gene SKIL is negatively regulated by the transcriptional cofactor complex SNON-SMAD4. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 26764–26776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.386599>
- Tecalco-Cruz, A. C., Velasco-Loyden, G., Robles-Villarruel, L., Cortes-González, C. C., Zepeda-Cervantes, J., Pineda, B., & Chagoya de Sánchez, V. (2022). Interferon-stimulated gene 15 and ISGylation are upregulated in glioblastoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 621, 144–150.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.07.011>
- Tecalco-Cruz, A. C., Zepeda-Cervantes, J., Tecalco Cruz, A. C., Genómicas, C., & Valle, D. (n.d.). *Protein ISGylation: A posttranslational modification with implications for malignant neoplasms*.
- van Bree, N. F. H. N., & Wilhelm, M. (2022). The Tumor Microenvironment of Medulloblastoma: An Intricate Multicellular Network with Therapeutic Potential. In *Cancers* (Vol. 14, Issue 20). <https://doi.org/10.3390/cancers14205009>
- van de Vosse, E., & van Dissel, J. T. (2017). IFN- $\gamma$ R1 defects: Mutation update and description of the IFNGR1 variation database. *Human Mutation*, 38(10).  
<https://doi.org/10.1002/humu.23302>
- Von Bueren, A. O., Von Hoff, K., Pietsch, T., Gerber, N. U., Warmuth-Metz, M., Deinlein, F., Zwiener, I., Faldum, A., Fleischhack, G., Benesch, M., Krauss, J., Kuehl, J., Kortmann, R. D., & Rutkowski, S. (2011). Treatment of young children with localized medulloblastoma by chemotherapy alone: Results of the prospective, multicenter trial HIT 2000 confirming the prognostic impact of histology. *Neuro-Oncology*, 13(6). <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor025>
- Wang, J., Pham-Mitchell, N., Schindler, C., & Campbell, I. L. (2003). Dysregulated Sonic hedgehog signaling and medulloblastoma consequent to IFN- $\alpha$ -

- stimulated STAT2-independent production of IFN- $\gamma$  in the brain. *Journal of Clinical Investigation*, 112(4), 535–543. <https://doi.org/10.1172/jci18637>
- Wirsching, H. G., Galanis, E., & Weller, M. (2016). Glioblastoma. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 134, pp. 381–397). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2>
- Wong, J. J. Y., Pung, Y. F., Sze, N. S. K., & Chin, K. C. (2006). HERC5 is an IFN-induced HECT-type E3 protein ligase that mediates type I IFN-induced ISGylation of protein targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(28). <https://doi.org/10.1073/pnas.0600397103>
- Ximena Zamora-Salas, S., Lucero Robles-Villarruel, M., Macías-Silva, M., Álvarez-Sánchez, M. E., Tecalco-Cruz, Á. C., Valle, D., Benito Juárez, A., & de México, C. (2022). *Interferón-gamma: vías de señalización y sus implicaciones en el cáncer Interferon-gamma: signaling pathways and their implications in cancer*. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023>
- Ye, J., Ortaldo, J. R., Conlon, K., Winkler-Pickett, R., & Young, H. A. (1995). Cellular and molecular mechanisms of IFN- $\gamma$  production induced by IL-2 and IL-12 in a human NK cell line. *Journal of Leukocyte Biology*, 58(2). <https://doi.org/10.1002/jlb.58.2.225>
- Yeung, T. L., Tsai, C. C., Leung, C. S., Yeung, C. L. A., Thompson, M. S., Lu, K. H., Freedman, R. S., Birrer, M. J., Wong, K. K., & Mok, S. C. (2018). ISG15 promotes ERK1 ISGylation, CD8+ T cell activation and suppresses ovarian cancer progression. *Cancers*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/cancers10120464>
- Yuan, Y., Qin, H., Li, H., Shi, W., Bao, L., Xu, S., Yin, J., & Zheng, L. (2023). The Functional Roles of ISG15/ISGylation in Cancer. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/molecules28031337>
- Zamora-Salas, S. X., Macías-Silva, M., & Tecalco-Cruz, A. C. (2024). Upregulation of the canonical signaling pathway of interferon-gamma is associated with glioblastoma progression. *Molecular Biology Reports*, 51(1). <https://doi.org/10.1007/s11033-023-09062-4>
- Zhou, M. J., Chen, F. Z., Chen, H. C., Wan, X. X., Zhou, X., Fang, Q., & Zhang, D. Z. (2017). ISG15 inhibits cancer cell growth and promotes apoptosis. *International Journal of Molecular Medicine*, 39(2). <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2845>
- Zou, W., & Zhang, D. E. (2006). The interferon-inducible ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) EFP also functions as an ISG15 E3 ligase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7). <https://doi.org/10.1074/jbc.M510787200>

