

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

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**“ESTUDIO FUNCIONAL DE LA DEFICIENCIA DE TRIM25
EN CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

EVA GUADALUPE PALACIOS SERRATO

DIRECTORA

DRA. ÁNGELES C. TECALCO CRUZ

CO-DIRECTORA

DRA. MARINA MACÍAS SILVA



Ciudad de México, octubre, 2024

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. Elisa Irene Azuara Liceaga, UACM

Vocal: Dra. Ángeles C. Tecalco Cruz, UACM

Plantel de Adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTORA

Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz. UACM.

Grado y nombre del Director

Institución del director

CO-DIRECTORA

Dra. Marina Macías Silva. UNAM.

Grado y nombre del coDirector

Institución del codirector

LECTORES

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez, UACM

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, UACM

Dr. Maximo Berto Martinez Benitez

Agradecimientos

Esta tesis 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. Angeles C. Tecalco como responsable de este proyecto.

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

Se reconoce el apoyo de CONAHCyT que me otorgó una beca para los estudios de Maestría en Ciencias Genómicas en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Agradezco particularmente:

A la Dra. Ángeles C. Tecalco Cruz por permitirme formar parte de un equipo de investigación tan comprometido y responsable. Agradezco su tiempo, asesoría y enseñanza.

A la Dra. Marina Macías Silva por su asesoría y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Lilia López Cánovas y a la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez por su asesoría en la elaboración y revisión de este proyecto.

Al Dr. Maximo Berto Martínez Benítez y a la Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga por su apoyo y guía en la revisión de esta tesis.

A todo el personal que conforma el posgrado en Ciencias Genómicas de la UACM. En especial a Fátima Catalina Sánchez Domínguez, por apoyarme con la mejor disposición en los trámites durante toda mi estancia en la UACM.

Al Dr. Luis Fernando Jacinto Alemán del Posgrado de Odontología de la UNAM por su enseñanza en la técnica de inmunohistoquímica, por ofrecerme un espacio seguro de trabajo, equipo, materiales y reactivos.

Al Dr. Jesús Zepeda Cervantes de la Facultad de Veterinaria de la UNAM por su apoyo y asesoría con respecto al plásmido empleado en este trabajo.

Al laboratorio 224N del Departamento de Biología Celular en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. En especial a la Bióloga Marcela Sosa Garrocho del IFC, por su enseñanza en algunas técnicas de laboratorio y a David Martínez Pastor por su apoyo en el laboratorio.

A la unidad de Microarreglos y a la Unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología de la UNAM.

Al Dr. Josué O. Ramírez Jarquín y a la Dra. Bibiana Ortega Dominguez del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM les agradezco por su amable asesoría y por el préstamo de reactivos.

Dedicatoria y agradecimientos personales.

Le dedico este trabajo, a mi mamá: Luz María Serrato. Gracias por amarme, por enseñarme que la existencia no debe doler y que las cosas se hacen con amor, si no, ¿Para qué? Gracias por ser aire, por volar y dejarme volar.

Dedico este trabajo a mi sol: Jesús Santiago Tonatiuh. Mi tona, estudiar es un regalo de la vida humana. Gracias por nacer y crecer sano, por tus mil preguntas sin respuesta y por tus respuestas a preguntas que nunca me había hecho.

Gracias a Yaret, Gerardo, Carlos y a Pepes. Por ser mi inspiración para hacer las cosas, cuidarme, ser mi red de apoyo y mi ejemplo de lucha. Tengo la fortuna y privilegio de saber que los tengo, los amo con todo mi corazón.

A mis brazos izquierdo y derecho: Ango y Quetzi. Gracias por las mañanas, tardes y noches de pláticas interminables, de cuidados, de paciencia, por su apoyo en cosas que no sabía que necesitaba apoyo y por demostrarme que la vida puede ser distinta. Dedico este trabajo a ustedes también, porque sin ustedes, esta parte de mi vida no hubiera resultado así.

A Mara y Carminita. Mara, eres mi hermana de otra madre, gracias por tus sabios consejos y cariño desinteresado. Gracias Carmina, por evidenciarme la vida. Gracias a Milka, mi corazón te lleva a donde sea que me mueva y haga lo que haga.

Gracias a Yessica Fernandez Orihuela, Gabriela Morales y Verónica Lazcano por su respaldo en cada una de mis decisiones, por crear proyectos juntas, verlos crecer y caer, pero mantenernos en los caminos. Somos fuego juntas.

A mis amigos de otra especie: Malinka, Dexter, Mateo, Antígona, Mirrus. Por sostenerme con su amor sincero.

A Yerye Mayen, Isa Ávila, Xaviera Juárez, Sara Miguel, Leo Carrasco y Orestes de la Rosa. Gracias por creer en mi y estar presentes en el camino y ejercer la educación liberadora.

A Sandra Lizeth Alvarado Ortigoza, mi amiga del camino, mi compañera de clases y de logros académicos. Creamos un equipo invaluable y sólido. Gracias a la tierra por cruzar nuestros caminos.

A mis compañeros de laboratorio Karen Medina y a Enrique Oropeza, gracias por el acompañamiento, la disposición a trabajar en equipo y por las enseñanzas compartidas. A Ziu y Norma por su tiempo y amabilidad.

Agradezco a los pacientes que permitieron que sus datos y/o sus células estuvieran disponibles para la investigación. Tal vez no haya marcha atrás en la conclusión de su vida, pero da esperanza a nuevas respuestas y posibilidades.

Le dedico este trabajo a las personas que padecen alguna enfermedad con mal pronóstico. Que ni la muerte nos quite esperanza.

Contenido

Índice de tablas	8
Índice de figuras	9
Abreviaturas	12
Resumen	14
Abstract	15
1. Introducción	16
1.1 Antecedentes generales	16
1.1.1 Sistema nervioso Central	16
1.1.2 Células del Sistema Nervioso Central	17
1.1.3 Células gliales en la neuroinflamación y el cáncer	20
1.1.4 Cáncer y tumores del Sistema Nervioso Central	21
1.1.5 Clasificación de tumores del SNC	24
1.1.6 Glioblastoma	26
1.2 Antecedentes particulares	27
1.2.1 Superfamilia de proteínas TRIM	27
1.2.2 La proteína TRIM25	30
1.2.3 ISGilación	35
1.2.4 ISG15	36
1.2.5 TRIM25 en cáncer	38
1.2.6 TRIM25 en glioblastoma	41
2. Hipótesis	42
3. Justificación	42
4. Objetivos	43
4.1 Objetivo general	43
4.2 Objetivos particulares	43
5. Estrategia experimental	44

6. Materiales y métodos	45
6.1 Reactivos y líneas celulares	45
6.2 Obtención de extractos proteicos	45
6.3 Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot	46
6.4 Análisis <i>in silico</i>	46
6.5 Microarreglo de tejido tumoral	49
6.6 Ensayo de inmunohistoquímica.....	51
6.7 Fraccionamiento subcelular.....	52
6.8 Predicción de localización subcelular	53
6.9 Ensayo de transfección de RNAi contra TRIM25	53
6.10 Extracción RNA y Microarreglo de cDNA	55
7. Resultados	55
7.1 Análisis <i>in silico</i> de la expresión de <i>TRIM25</i> en muestras de GB humano y en tejido de cerebro normal.....	55
7.2 Evaluación de los niveles de la proteína TRIM25 en muestras de glioblastoma y en tejido de cerebro saludable.....	64
7.3 Evaluación de los niveles y localización subcelular de TRIM25 en líneas celulares derivadas de pacientes con glioblastoma.	70
7.4 Determinación del efecto de la deficiencia de <i>TRIM25</i> sobre el perfil de ISGilación y la expresión de genes asociados a cáncer en células de glioblastoma.	
73	
8. Discusión.....	86
9. Conclusiones.....	95
10. Perspectivas.....	96
11. Bibliografía	97

12. Anexos 113

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los tipos de tumores del sistema nervioso central.

Tabla 2. Ejemplos de cánceres con expresión diferencial de TRIM25 con respecto a su tejido control.

Tabla 3. Características clínicas de las muestras del microarreglo tumoral empleado para la detección de TRIM25 por inmunohistoquímica.

Tabla 4. Expresión de *TRIM25* en diferentes tipos de cáncer respecto a su tejido control.

Tabla 5. Genes que correlacionan negativamente y positivamente con TRIM25 en glioblastoma. Análisis realizado mediante la base de datos UALCAN.

Tabla 6. Lista de 5 genes con expresión disminuida (genes DOWN-regulated) ante la reducción de los niveles de TRIM25 en células A-172 derivadas de un paciente con glioblastoma con mayor Z-score y Fold change.

Tabla 7. Lista de 5 genes con expresión incrementada (genes UP-regulated) ante la reducción de los niveles de TRIM25 en células A-172 derivadas de un paciente con glioblastoma con mayor Z-score y Fold change.

Índice de figuras

Figura 1. Células del sistema nervioso central.

Figura 2. Sellos distintivos del cáncer.

Figura 3. Estructura de proteínas de la familia TRIM.

Figura 4. Estructura de TRIM25.

Figura 5. Funciones estructurales de la proteína TRIM25.

Figura 6. Regulación post-transcripcional de la expresión de TRIM25.

Figura 7. Esquema de la ISGilación.

Figura 8. Efecto de la sobreexpresión de TRIM25 en algunos tipos de cáncer

Figura 9. Desregulación de la expresión de *TRIM25* en diversos cánceres de acuerdo a datos de GEPIA

Figura 10. Desregulación de la expresión de *TRIM25* en diversos cánceres de acuerdo a datos de UALCAN

Figura 11. *TRIM25* se encuentra sobreexpresada en glioblastoma.

Figura 12. *TRIM25* se sobreexpresa en tumores del SNC.

Figura 13. Análisis de supervivencia de los pacientes con glioblastoma usando la base de datos GENT2.

Figura 14. Expresión de E3 ligasas de ISG15 en glioblastoma.

Figura 15. Niveles de expresión de TRIM25 en tejidos.

Figura 16. Estandarización de la técnica de Inmunohistoquímica de la proteína TRIM25.

Figura 17. Niveles de inmunexpresión de TRIM25 en muestras de tejido cerebral sano y glioblastoma.

Figura 18. Detección de la proteína TRIM25 en el TMA de GB.

Figura 19. Correlación del nivel de inmunexpresión de TRIM25 con los datos clínicos de las muestras en el TMA de GB.

Figura 20. Nivel de inmunexpresión de TRIM25 en GB.

Figura 21. Niveles de proteína TRIM25 en diferentes cánceres de la base de datos UALCAN.

Figura 22. Análisis *in silico* de la expresión y abundancia de TRIM25 en líneas celulares derivadas de GB.

Figura 23. Líneas celulares derivadas de GB empleadas para el análisis de localización subcelular.

Figura 24. Localización subcelular de la proteína TRIM25.

Figura 25. Predicción de la localización subcelular de TRIM25.

Figura 26. Niveles de proteína TRIM25 en células A-172 transfectadas con el siRNA-TRIM25.

Figura 27. Niveles de proteína TRIM25 en células A-172 transfectadas con el shRNA-TRIM25.

Figura 28. Efecto del silenciamiento de ISG15 en células A-172

Figura 29. Análisis ontológico de los genes DOWN-regulated en células de glioblastoma A-172 deficientes de TRIM25.

Figura 30. Diagrama de Venn de genes DOWN-regulated en células derivadas de glioblastoma con niveles disminuidos de TRIM25 .

Figura 31. Análisis ontológico de los genes UP-regulated en células de glioblastoma A-172 deficientes de TRIM25.

Figura 32. Diagrama de Venn de genes UP-regulated en células derivadas de glioblastoma con niveles disminuidos de TRIM25.

Figura 33. Análisis de enriquecimiento de los genes DOWN-regulated tras la disminución de TRIM25 en células derivadas de glioblastoma A-172 empleando la base de datos de ShinyGO.

Figura 34. Análisis de enriquecimiento de los genes UP-regulated tras la disminución de TRIM25 en células derivadas de glioblastoma A-172, obtenidos por el programa de ShinyGO.

Figura 35. Resumen gráfico de resultados.

Abreviaturas

ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina de suero bovino
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Ep-GB	Glioblastoma epiteliode
ER	Receptor de estrógeno
FBS	Suero fetal bovino
FT	Factor de transcripción
GB	Glioblastoma
GB-pnc	Glioblastoma con componente neural primitivo
gc-GB	Glioblastoma de células gigantes
GTE_x	<i>del inglés</i> Genotype Tissue Expression
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IFN_γ	Interferón gamma
ISG15	<i>del inglés</i> Interferon-stimulated gene 15
miRNA	MicroRNA
nt	Nucleótido
NFκB	Factor nuclear Kappa B
NO	Óxido nítrico
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPC	Células precursoras de oligodendrocitos
pb	Pares de bases
PBS	Buffer salino de fosfatos
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
TAM	Macrófagos asociados a tumores

TCGA	<i>del inglés</i> The Cancer Genome Atlas
TMA	<i>del inglés</i> Tumoral MicroArray
TME	Microambiente tumoral
TRIM	Motivos tripartita
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
UNV	Unidad neurovascular
UTR	Región no traducida
WB	<i>del inglés</i> Western blot
μL	Microlitros

Resumen

TRIM25 es una proteína que pertenece a la familia de proteínas con motivos tripartita (TRIM). Muchas de las proteínas de la familia TRIM han sido definidas como ligasas E3 de ubiquitina por contener un dominio RING. Específicamente, TRIM25, además de actuar como ligasa E3 de ubiquitina, participa como ligasa E3 de ISG15 en una modificación postraduccional conocida como ISGilación. Incluso, se ha propuesto que TRIM25 puede asociarse con el DNA y RNA y así, modular la expresión génica de sus blancos a nivel transcripcional y postranscripcional. Diversos estudios señalan que la desregulación de TRIM25 se ve involucrada en algunos tipos de cáncer, dando origen a un pronóstico desfavorable. En este proyecto analizamos la expresión y abundancia de TRIM25 en líneas celulares y muestras de pacientes con glioblastoma. También se investigó mediante análisis *in silico* la relación de la expresión de *TRIM25* con el tiempo de supervivencia en muestras de pacientes con glioblastoma. Además, en un microarreglo de tejido tumoral humano con muestras de glioblastoma y tejido cerebral sano, detectamos la proteína TRIM25 con la técnica de inmunohistoquímica. Mediante un análisis predictivo y de enriquecimiento subcelular, identificamos que TRIM25 se localiza principalmente en el núcleo. Además, con la técnica de silenciamiento génico mediante RNAs de interferencia, evaluamos su efecto sobre el perfil ISG15/ISGilación y sobre la expresión de genes asociados al cáncer en células derivadas de glioblastoma; observamos una mayor expresión y niveles de TRIM25 en muestras de pacientes con glioblastoma con respecto a su tejido control, lo cual se correlaciona con un menor tiempo de supervivencia de los pacientes. Además, nuestros resultados sugieren que TRIM25 modula la expresión de genes asociados a mecanismos de evasión de la apoptosis y la respuesta inmune en el contexto de glioblastoma. La disminución de los niveles de la proteína TRIM25 nos permitió detectar mayores niveles de ISG15 libre. En conclusión, con estos hallazgos proponemos que TRIM25 puede considerarse un potencial biomarcador molecular útil para el pronóstico de pacientes con glioblastoma.

Abstract

TRIM25 is a protein that belongs to the tripartite motif (TRIM) family protein. Most of the TRIM protein family are described as E3 ubiquitin ligases through its RING domain. Particularly, TRIM25, in addition to acting as a E3 ubiquitin ligase, participates as an E3 ligase of ISG15 in a post-translational modification known as ISGylation. Additionally, it has even been proposed that TRIM25 can associate with DNA and RNA, and thus modulate the gene expression at the transcriptional and post-transcriptional levels. Several studies indicate that TRIM25 deregulation is involved in some types of cancer, giving rise to an unfavorable prognosis. In this work, we analyzed TRIM25 expression and abundance in human cell lines and tissue samples from patients with glioblastoma versus normal tissue. We investigated by *in silico* analysis the relationship of *TRIM25* expression with survival time in samples derived glioblastoma patients. Using a microarray of tumor tissue, with glioblastoma samples and healthy brain tissue, we detected the TRIM25 protein with the immunohistochemistry technique. Through predictive and subcellular enrichment analysis, we identified the subcellular localization of TRIM25. We detected that TRIM25 is mainly localized in the nucleus. In addition, using RNA interference as gene silencing technique, we evaluated the effect on the ISG15/ISGylation profile and on the expression of cancer-associated genes in glioblastoma-derived cells. We identified higher expression and levels of TRIM25 in glioblastoma patient samples relative to their control tissue, which correlates with shorter patient survival time. Furthermore, our results suggest that TRIM25 modulates the expression of genes associated with apoptosis evasion mechanisms and immune response in the context of glioblastoma. We observed that decreased TRIM25 protein levels allowed us to detect higher levels of free ISG15. In conclusion, with these findings we propose that TRIM25 can be considered a potential useful molecular biomarker in glioblastoma.

1. Introducción

1.1 Antecedentes generales

1.1.1 Sistema nervioso Central

Los órganos en un ser vivo, así como los aparatos y sistemas, se comunican entre sí y envían toda la información a un centro regulador o maquinaria: el sistema nervioso. El sistema nervioso, monitorea y responde a los cambios internos y externos del ambiente. Además, es el responsable de la percepción, el comportamiento y la memoria.

El sistema nervioso inerva todo el cuerpo, permitiendo no solo funciones como el movimiento y la sensación, sino también intervando nichos de células madre tisulares para regular el desarrollo, la homeostasis y la regeneración de diversos órganos y tejidos (Hanahan y Monje, 2023). El sistema nervioso se compone del encéfalo, órgano localizado dentro de la cabeza, que en adultos presenta seis divisiones principales: el bulbo raquídeo, la protuberancia, mesencéfalo, cerebelo, diencéfalo y cerebro. Seguido del encéfalo, se encuentra la médula espinal, encargada de transportar información sensorial en forma de impulsos nerviosos al cerebro y respuestas motoras lejos del cerebro.

A grandes rasgos, el encéfalo y la médula espinal, componen al sistema nervioso central (SNC). Todo el tejido nervioso fuera del SNC compone al sistema nervioso periférico (SNP), aunque el sistema nervioso tiene varias subdivisiones. Por ejemplo; el sistema nervioso somático, compuesto de nervios sensoriales y motores, también conocidos como nervios aferentes y eferentes; el sistema nervioso autónomo, dividido en nervios simpáticos y parasimpáticos y el sistema entérico; el cuál es el sistema nervioso intrínseco del tracto gastrointestinal (Farley *et al.*, 2014). En particular, el SNC es un complejo sistema orgánico, formado por millones de neuronas que establecen comunicación entre ellas; mediante un proceso llamado sinapsis. Es capaz de recibir, retener, recordar y analizar información compleja y remodelarse en respuesta a diversos estímulos (Shrestha *et al.*, 2014). Sin embargo, aunque las neuronas sean las células más representativas del sistema nervioso, no son las únicas, ni las más abundantes. Las células gliales o neuroglia,

son células de apoyo fundamentales para la formación y el funcionamiento del SNC. Mediante el empleo de un fraccionador isotrópico se evidenció que la proporción entre células gliales y neuronas en todo el cerebro humano es de 1:1 (Von Bartheld *et al.*, 2016). Las células gliales influyen en el desarrollo del sistema nervioso, desde el nacimiento neuronal, la migración, la especificación y el crecimiento de los axones, hasta el ensamblaje de los circuitos y la sinaptogénesis. A medida que maduran los circuitos neuronales, las distintas glías desempeñan funciones claves en la comunicación sináptica, la plasticidad, la homeostasis y la actividad a nivel de red, mediante la vigilancia dinámica, la alteración de la estructura y la función del SNC (Allen y Lyons, 2018).

La función neuronal, depende del trabajo en conjunto con las células gliales, pero, además requiere de una regulación estricta del microambiente del SNC. En este sentido, la barrera hematoencefálica (BHE) es necesaria para el control de la homeostasis en el SNC. La BHE es una barrera celular semipermeable que separa al SNC del resto del organismo, está ubicada en la interfaz entre la sangre y el tejido cerebral. La unidad conocida como “unidad neurovascular” (NVU) de la BHE está compuesta de endotelio microvascular, astrocitos, membrana basal y pericitos (Shrestha *et al.*, 2014). Debido, fundamentalmente a la BHE, es que se creyó durante muchos años, que el SNC era una zona inmunológicamente privilegiada. Si bien, es cierto que el SNC presenta una inmunidad específica regulada por la BHE, permite la comunicación con el sistema inmunitario periférico (Daubon *et al.*, 2020). Por lo tanto, la homeostasis del SNC depende en gran medida del equilibrio de la inmunidad innata (Yang y Zhou, 2019).

1.1.2 Células del Sistema Nervioso Central

Las células que componen al cerebro y al SNC se definen por su ubicación, función o características moleculares. Se han descrito cinco clases de células cerebrales: neuronas, células endoteliales y tres tipos de células gliales: astrocitos, oligodendrocitos y microglía (Daubon *et al.*, 2020). Las proporciones relativas de las células gliales en el cerebro varían según la región, la fase de desarrollo y la especie; sin embargo, se considera que el cerebro humano está compuesto por un

20% de astrocitos, un 25% de oligodendrocitos y de un 5 a 15% de microglía (Allen y Lyons, 2018).

En general, las células gliales son las más abundantes y se distribuyen ampliamente en el SNC; interactúan con las neuronas y las células inmunitarias, así como con los vasos sanguíneos (Yang y Zhou, 2019). En esencia, los astrocitos, la microglía y los oligodendrocitos conforman la glía o neuroglia (Figura 1).

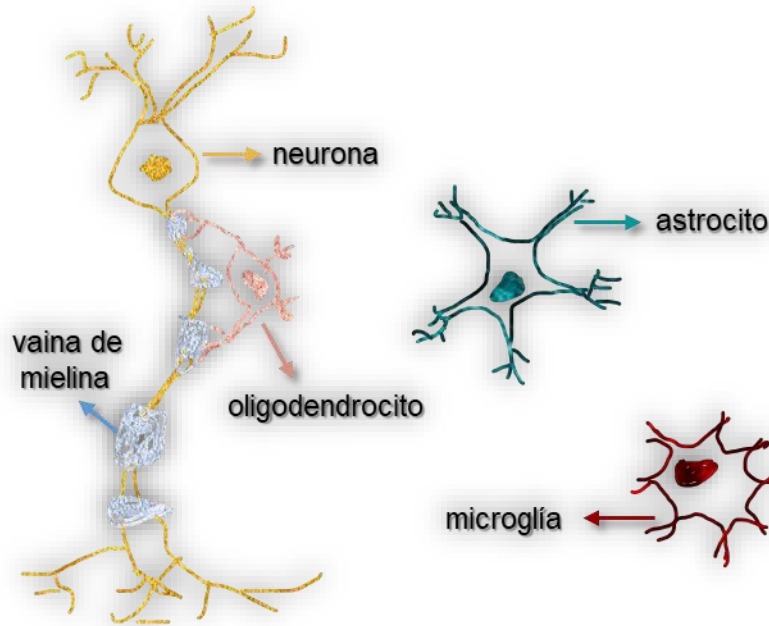


Figura 1. Células del sistema nervioso central. Las neuronas (color amarillo) son células excitables capaces de transmitir y recibir impulsos eléctricos y químicos, a través de potenciales de acción.

Elas son las responsables de la sinapsis cerebral. El oligodendrocito (color rosa) es la célula responsable de producir la vaina de mielina, cuya principal función es proteger los axones neuronales. Los astrocitos (color azul) son células encargadas de mantener la homeostasis en el cerebro. La microglía (color rojo), son las células encargadas de la respuesta inmune en el SNC.

Los astrocitos son células con forma de estrella que participan en múltiples procesos que interactúan con los demás tipos celulares del SNC (Allen y Lyons, 2018). Son de las células gliales más abundantes del SNC y se caracterizan por controlar el metabolismo de las neuronas, manteniendo contacto con ellas y con los vasos capilares, son importantes reguladores de iones y neurotransmisores en el entorno del SNC (Yang y Zhou, 2019). Los astrocitos producen factores involucrados en la sinapsis, o mejor conocidos como “factores sinaptogénicos”, (por ejemplo,

trombospondina y glicanos) que promueven la formación de sinapsis entre neuronas y, por tanto, desempeñan un papel clave en el neurodesarrollo, además de secretar factores que participan en la modulación como glutamato, ATP y D-serina (Pan y Monje, 2022).

El origen de la microglía es a partir de células precursoras mieloides, por lo que se les considera como las células inmunitarias residentes en el SNC y son más conocidas como los macrófagos residentes del cerebro (Allen y Lyons, 2018). Los procesos microgliales son muy activos, siempre se activan antes que otras células gliales bajo estímulos peligrosos o estados patológicos del SNC. Exploran continuamente el microentorno del parénquima, incluso, en estado de reposo (Yang y Zhou, 2019). Además, con el paso de los años se han evidenciado sus funciones durante diferentes etapas del desarrollo y la actividad del sistema nervioso. Durante el desarrollo neurológico, la microglía forma uniones entre neuronas para lograr conexiones sinápticas precisas, por lo tanto, regula su actividad (Pan y Monje, 2022).

Finalmente, los oligodendrocitos son generados por las células precursoras de oligodendrocitos (OPC). Una vez, que los oligodendrocitos han alcanzado su maduración, producen vainas de mielina que aceleran la conducción de impulsos nerviosos y proporcionan apoyo metabólico a los axones (Allen y Lyons, 2018). La función de la mielina es permitir la máxima velocidad de conducción y reducir el consumo de energía axonal (Stadelmann *et al.*, 2019). La función del circuito neuronal depende de la mielinización, se ha demostrado que cambios en los perfiles de mielina pueden alterar la dinámica de dicho circuito e incluso el aprendizaje de ciertas tareas (por ejemplo, practicar piano, aprender a hacer malabares y entrenar la memoria de trabajo) (Pan y Monje, 2022). Además, se caracterizan por ser células con altos requerimientos metabólicos (Yang y Zhou, 2019). Por lo tanto, los oligodendrocitos forman parte de una vasta red de células gliales y neuronales interconectadas, en la que los oligodendrocitos proporcionan activamente apoyo metabólico a las neuronas, regulan la homeostasis de los iones y el agua y se adaptan a las señales neuronales dependientes de la actividad (Stadelmann *et al.*, 2019).

Con base a ensayos experimentales, en donde se observaron células marcadas empleando anticuerpos dirigidos el proteoglicano de condroitina sulfato NG2. Se propuso que existe un cuarto tipo de célula glial del SNC, nombrándolas como células gliales neurona-glía antígeno-2 (NG2) o células precursoras de oligodendrocitos (OPC). Con características diferentes a las de los astrocitos, los oligodendrocitos o la microglía. (Peters, 2004).

Es importante enfatizar, que las células gliales son capaces de establecer comunicaciones glía-glía, célula-glía y glía-neurona mediante diversas moléculas: los gliotransmisores, algunos de ellos son: el ATP, el glutamato, el óxido nítrico (NO) y la D-serina (Yang y Zhou, 2019). Estas interacciones controlan la estructura y función cerebral mediante la señalización eléctrica, el revestimiento axonal, la regulación del flujo sanguíneo, el acoplamiento metabólico y la vigilancia inmune (Daubon *et al.*, 2020).

1.1.3 Células gliales en la neuroinflamación y el cáncer.

Han sido observados diversos cambios en el fenotipo y funciones de las células gliales según el microentorno y escenario patológico. Las células gliales, al igual que las células inmunitarias, pueden actuar como células protectoras o cambiar su fenotipo y promover la progresión de la enfermedad según su progreso y su entorno. En este sentido, la neuroinflamación es una de las patologías más comunes en enfermedades del SNC y resulta de la cooperación de varios tipos de células gliales y de células inmunes periféricas. Diferentes grupos de células gliales trabajan en conjunto, se comunican entre sí y están bien organizados para mantener la homeostasis y modular las respuestas inmunes características del SNC (Yang y Zhou, 2019).

En el contexto del cáncer cerebral o tumores del SNC, muchas de las células presentan perfiles transcriptómicos similares a los de las células macrogliales (oligodendrocitos y astrocitos) y de sus progenitores, por lo que es probable que las interacciones neurona-glía existentes se modifiquen, para favorecer la patogénesis tumoral. Por ejemplo, algunos estudios sugieren que las OPC son el origen de múltiples formas de gliomas (Pan y Monje, 2022).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, la unidad neurovascular (NVU) es una unidad fisiológica funcional que regula la perfusión cerebral y protege de posibles patógenos o toxinas presentes en la sangre. Se ha evidenciado que la NVU se altera significativamente en tumores malignos del SNC, especialmente en glioblastoma (GB) (Daubon *et al.*, 2020).

Particularmente, los astrocitos desarrollan cambios morfológicos, moleculares y/o funcionales en respuesta a varias condiciones patológicas, a estos astrocitos, se les denomina “astrocitos reactivos”. Múltiples estados de astrocitos reactivos han sido identificados como contribuidores de la progresión de un amplio rango de desórdenes del SNC. En glioma, algunas células tumorales adquieren firmas de expresión genética similares a las de los astrocitos. Las células de glioma, también producen factores sinaptogénicos, que aumentan la excitabilidad neuronal y alteran las redes neuronales locales. De manera interesante, se ha visto que las células de glioblastoma secretan glutamato para inducir la hiperexcitabilidad neuronal y la actividad epiléptica, que es una comorbilidad común asociada a los tumores cerebrales (Pan y Monje, 2022).

Por su parte, la microglía, también adopta un fenotipo reactivo asociado a los tumores, adquiriendo una morfología ameboide. En los tumores cerebrales, tanto la microglía como los macrófagos representan una gran parte de las células asociadas al tumor. El número y el fenotipo molecular de la microglía y los macrófagos asociados a tumores (TAM) pueden verse influidos por la edad, la localización cerebral, el tipo y/o subtipo de tumor y el sexo (Pan y Monje, 2022).

Defectos en los oligodendrocitos conducen a defectos en la mielinización, y, debido a su importante papel en la fisiología del SNC en mamíferos, suelen desencadenar patologías neurológicas graves (Stadelmann *et al.*, 2019).

1.1.4 Cáncer y tumores del Sistema Nervioso Central

El cáncer es una patología megadiversa y compleja, que difícilmente se puede conceptualizar. Sin embargo, después de una extensa revisión y constante actualización, Hanahan y Weinberg propusieron que el cáncer se puede describir por ciertas características distintivas o *sellos del cáncer*. En los primeros estudios

se identificaron 6 sellos del cáncer, los cuáles comprenden capacidades biológicas adquiridas durante su desarrollo, como: 1) el mantenimiento de la señalización proliferativa que ocasiona una proliferación crónica; 2) la evasión de supresores del crecimiento, de lo que se han identificado múltiples genes conocidos como supresores de tumores, inactivos en el tumor, como los genes que codifican a las proteínas RB (asociada a retinoblastoma) y TP53; 3) la resistencia a la muerte celular; 4) la inmortalidad replicativa, 5) la inducción de la angiogénesis y 6) la activación de la invasión y la metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000).

Años más tarde se añadieron dos características habilitantes: anomalías del estado neoplásico; que contribuyen a la adquisición de capacidades distintivas y el desarrollo de inestabilidad genómica de las células cancerosas y la promoción de un microambiente tumoral; así como dos características distintivas: la programación del metabolismo energético y la evasión de la destrucción inmunitaria (Hanahan Weinberg, 2011).

Finalmente, en el año 2022 Douglas Hanahan añade otras 4 características importantes en el cáncer. Primero señala que durante la formación de los órganos existe una diferenciación final, mediante la cual, las células progenitoras dejan de crecer, es decir, tiene como resultado final la antiproliferación, entonces, la alteración de esta plasticidad fenotípica y la diferenciación es un componente crítico de la patogénesis del cáncer. Segundo, además de la inestabilidad y mutación del genoma que tiene como consecuencia una expresión génica desregulada cada vez con mayor asociación al desarrollo y progresión del cáncer, se propone una evolución del cáncer sin mutaciones y una reprogramación epigenética de los fenotipos característicos del cáncer. Tercero; los microbiomas polimórficos constituyen características habilitadoras distintivas que facilitan la adquisición de capacidades distintivas. Cuarto y último, se identificó que las células senescentes estimulan de diversas formas el desarrollo tumoral y la progresión maligna (Hanahan, 2022) (Figura 2).

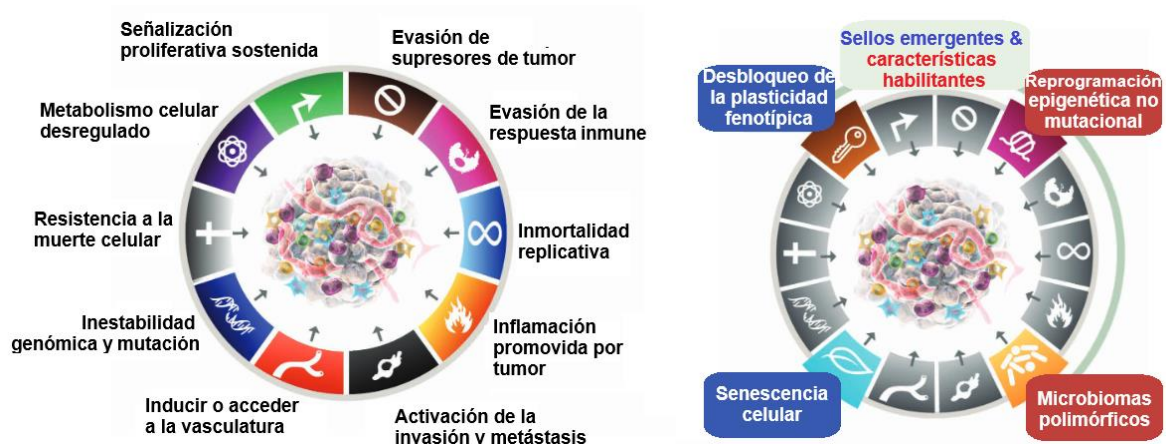


Figura 2. Sellos distintivos del cáncer. A la izquierda se presentan los sellos distintivos del cáncer hasta el 2011. A la derecha se señalan las 4 capacidades distintivas y las características habilitadoras señaladas por Hanahan en el 2022. Figura modificada de (Hanahan, 2022).

Hasta hace poco, el papel de los nervios periféricos en la tumorigénesis estaba poco estudiado porque se pensaba que desempeñaban sólo un papel pasivo. Actualmente se ha señalado que los nervios periféricos son una parte del microambiente tumoral (TME) porque penetran todos los tejidos y los conectan con el SNC, pueden estimular el crecimiento del cáncer mediante la liberación de neurotransmisores (NT) y neuropéptidos que actúan sobre los receptores expresados por células cancerosas (Belotti *et al.*, 2022).

Particularmente, la actividad neuronal en el TME del cerebro promueve el sello distintivo de sostener la señalización proliferativa, a través de mecanismos de señalización paracrinos que activan vías oncogénicas, así como a través de la señalización sináptica de neurona a cáncer. Las interacciones del sistema nervioso con cánceres fuera del SNC también promueven la señalización proliferativa. En ciertos tumores del SNC, la actividad neuronal glutamatérgica impulsa la señalización proliferativa a través de mitógenos paracrinos liberados tanto de las neuronas como de otras células estromales de una manera dependiente de la actividad neuronal (Hanahan y Monje, 2023).

Los tumores del SNC comprenden a los tumores cerebrales, los cuales, en general son poco frecuentes, pero muchos de ellos causan una morbilidad y mortalidad significativa debido a la elevada tasa de recurrencia del tumor, a su naturaleza

incurable, rápida progresión y que, además, en la mayoría de los casos, ocurren en individuos sin un síndrome de cáncer conocido o antecedentes familiares de tumores cerebrales y del SNC (Ostrom *et al.*, 2021). La patogénesis de los tumores cerebrales depende tanto de programas oncogénicos intrínsecos al tumor como de factores extrínsecos del microentorno, incluidas las neuronas y las células gliales (Pan y Monje, 2022).

Aunque los tumores cerebrales y del SNC están sujetos a la biología única del cerebro y su microambiente, son padecimientos heterogéneos, lo cual representa un desafío para el diagnóstico temprano y el desarrollo de tratamientos.

Los tumores de cerebro más agresivos son más frecuentes en adultos mayores de 40 años (Ostrom *et al.*, 2021). Estos tumores tienen la particularidad de ser complejos desde el punto de vista histológico, y en cuanto a los síntomas, el diagnóstico se ve dificultado por la inespecificidad de los mismos; sin embargo, algunos signos incluyen al deterioro físico y cognitivo, dificultad de comunicación, cefaleas exacerbadas, vómitos, alteraciones visuales, debilidad, cambios de personalidad y convulsiones focales o generalizadas (McKinnon *et al.*, 2021).

Si bien, se han propuesto varios factores de riesgo que han sido asociados a los tumores cerebrales y a otros tumores del SNC, a la fecha, no se ha encontrado ningún factor de riesgo que represente una gran proporción de los casos (Ostrom *et al.*, 2021).

1.1.5 Clasificación de tumores del SNC

De acuerdo a la quinta edición de la OMS para la clasificación de tumores del SNC publicada en 2021 (Louis *et al.*, 2021), los tumores cerebrales y otros tumores del SNC se han clasificado según sus cambios genéticos, lo que permite un diagnóstico completo, por asociaciones oncogénicas, por similitudes histológicas e histogenéticas y por características moleculares, considerando la localización y la edad. En la tabla 1 se presentan los principales grupos de esta clasificación.

Tabla 1. Clasificación de los tipos de tumores del sistema nervioso central (Louis *et al.*, 2021).

Clasificación de tumores del SNC	Ejemplos
Gliomas, tumores glioneuronales y tumores neurales.	Glioblastoma, glioma coroideo, ependimoma.
Tumores del plexo coroideo.	Carcinoma del plexo coroideo.
Tumores embrionarios.	Meduloblastoma.
Tumores pineales.	Pineocitoma.
Tumores de los nervios craneales y paraespinales.	Neurofibroma.
Meningiomas.	Meningioma.
Tumores mesenquimales y no mesenquimales.	Hemangioblastoma, sarcoma de Ewing, condrosarcoma.
Tumores melanocíticos.	Melanocitoma meningeo.
Tumores hematolinfoides como los linfomas.	Linfoma, sarcoma histiocítico.
Tumores de células germinales.	Germinoma.
Tumores de la región selar.	Blastoma pituitario.
Metástasis al SNC.	Metástasis al cerebro.

De acuerdo a su histología y clinicopatología, los tumores cerebrales se clasifican en grados. De manera general, entre mayor sea el grado del glioma, mayor será la agresividad e invasión del cáncer. Los tumores de grado I según la OMS eran curables si podían extirparse quirúrgicamente; en el otro extremo, los tumores de grado IV según la OMS eran muy malignos y provocaban la muerte en períodos de tiempo relativamente cortos en ausencia de un tratamiento eficaz (Louis *et al.*, 2021, 2016).

Los cánceres cerebrales son enfermedades devastadoras, en donde los mecanismos de desarrollo y plasticidad del cerebro sano se ven alterados (Pan y Monje, 2022). Los gliomas se infiltran ampliamente en el cerebro y la médula

espinal, pero su crecimiento fuera del SNC es extremadamente raro. La progresión del glioma está regulada no sólo por mecanismos intrínsecos de la célula, sino también por importantes dependencias microambientales (Venkatesh *et al.*, 2019).

1.1.6 Glioblastoma

El glioblastoma es el único tumor de grado IV (Louis *et al.*, 2021, 2016). En particular, los gliomas de alto grado son cánceres cerebrales letales cuya progresión está fuertemente regulada por la actividad neuronal y son la principal causa de muerte por cáncer del SNC (Venkatesh *et al.*, 2019).

El glioblastoma se caracteriza por estar altamente vascularizado, con vasos sanguíneos densos, tortuosos y permeables, además presenta hipoxia y necrosis. Derivan principalmente de células troncales neurales, que se diferencian en linajes astrocíticos o neuronales. Este tipo de cáncer es uno de los más mortíferos en humanos, con una supervivencia media de <15 meses tras el diagnóstico (Daubon *et al.*, 2020).

Dentro de la clasificación de los gliomas, tumores glioneuronales y tumores neurales, *los gliomas difusos de tipo adulto* se dividen en tres subtipos: astrocitoma, con la mutación de la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) grado II, III o IV; oligodendroglioma, con la mutación de la IDH de grado III o IV; y glioblastoma tipo IDH silvestre.

La codeleción de 1p/19q está asociada con la mutación de IDH y con la subclasificación molecular de gliomas en grados II y III. Mientras que el fenotipo IDH silvestre se correlaciona con el subtipo molecular grado IV. De todos los gliomas, el glioblastoma es el único considerado de grado IV. Por lo tanto, el glioma difuso de tipo adulto es el más agresivo, además de ser el tumor maligno primario más frecuente del SNC que se origina a partir de células gliales (Horbinski *et al.*, 2023). La OMS incorpora tres parámetros genéticos como criterios para el diagnóstico del glioblastoma: la mutación del promotor del gen *TERT*, la amplificación del gen *EGFR*, así como la ganancia combinada de todo el cromosoma 7 y la pérdida de todo el cromosoma 10 [+7/-10] (Louis *et al.*, 2021).

Los signos y síntomas que presentan los pacientes con glioblastoma son muy similares a los que se observan en pacientes con otro tipo de tumores cerebrales, tales como el dolor de cabeza, el cuál varía según la ubicación, tamaño y tasa de crecimiento del tumor, un déficit motriz, epilepsia, confusión, déficit visual o dificultad al hablar; por mencionar algunos. La enfermedad evoluciona rápidamente ocasionando un deterioro neurológico, cognitivo y físico del paciente; aproximadamente la mitad de los individuos una vez diagnosticados, tienen que ser atendidos de emergencia en un hospital (McKinnon *et al.*, 2021).

El tratamiento de este tipo de cáncer consiste principalmente en la resección quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia. Los individuos con glioblastoma son tratados con el régimen STUPP estandarizado: cirugía más quimioterapia adyuvante basada en temozolomida (agente alquilante) y radioterapia (Zhao *et al.*, 2022). La principal causa de la eficacia limitada de los tratamientos actuales y de la recurrencia del tumor está asociada con la infiltración de células de GB en el tejido cerebral circundante. En un estudio realizado para identificar si la desregulación de los receptores de neurotransmisores clásicos (dopamina, serotonina, ácido gamma amino butírico, glutamato, acetilcolina, epinefrina y norepinefrina) podría desempeñar un papel en la progresión, se confirmó que los neurotransmisores y sus receptores tienen un papel importante en la progresión y supervivencia de los tumores (Belotti *et al.*, 2022).

La resistencia de los tratamientos, la recurrencia y el estado avanzado del GB conlleva a que el tiempo de vida de los pacientes se extienda a 15 meses después del diagnóstico, en la mayoría de los casos.

1.2 Antecedentes particulares

1.2.1 Superfamilia de proteínas TRIM

La superfamilia de proteínas con motivo tripartita (TRIM) (ver Figura 3) se caracteriza por presentar en el extremo N-terminal una región conservada compuesta por tres dominios: el dominio RING, el dominio B box y el dominio hélice superenrollada (CC: *coiled coil* por sus siglas en inglés) (Wang y Ning, 2021) . El

dominio RING (*Really Interesting New Gen* por sus siglas en inglés) que contiene un motivo de dedo de zinc que comprende residuos de cisteína e histidina que se unen a dos átomos de zinc, cruciales para reclutar a las enzimas E2 conjugadoras de ubiquitina cargadas de ubiquitina confiriendo la actividad de E3 ligasa de ubiquitina (Li *et al.*, 2014).

La mayoría de las proteínas TRIM pueden conjugar a proteínas blanco específicas con una o más moléculas de ubiquitina, mediante una modificación postraduccional (PTM) conocida como ubiquitinación, mediada por tres enzimas; la enzima activadora E1, la enzima conjugadora E2 y la ligasa E3 (Wang y Ning, 2021), dicha PTM está involucrada en la degradación proteosomal del sustrato, en la modulación de la actividad del sustrato, su localización subcelular o su capacidad para interactuar con otras proteínas (van Gent *et al.*, 2018). El dominio RING también ha sido descrito como responsable de catalizar la conjugación de proteínas similares a la ubiquitina, como ISG15 (por su nombre en inglés, interferon-stimulated gene 15) o SUMO, en las reacciones de ISGilación y SUMOilación, respectivamente; estas PTMs están involucradas en endocitosis, el tráfico de vesículas, la respuesta inmunitaria y la inflamación, la respuesta al daño del DNA, la autofagia y la muerte celular, además de estar involucradas en la actividad antiviral descrita para las proteínas de esta familia (van Gent *et al.*, 2018).

El segundo dominio conservado puede estar compuesto de una o dos cajas B, B1 y B2 (Li *et al.*, 2014), estas cajas B contienen motivos de unión a zinc; sin embargo, su función aún no ha sido del todo descrita, pero se ha demostrado que modulan el autoensamblaje de orden superior, su actividad E3-ligasa e incluso las interacciones con otras proteínas (van Gent *et al.*, 2018).

El último subdominio del dominio RBCC de las proteínas TRIM es el dominio de hélice superenrollada (CC o coiled coil), el cual, media las interacciones homodiméricas y heterodiméricas proteína-proteína involucradas principalmente con la actividad antiviral que poseen varias proteínas TRIM (Li *et al.*, 2014).

La región C-terminal de las proteínas TRIM, es variable, aunque generalmente ha sido asociada a dominios de reconocimiento de proteínas, también se ha descrito que puede tener actividad enzimática o unirse a ácidos nucleicos. Las proteínas

TRIM, por tanto, se pueden clasificar en dos grandes grupos: 1 y 2, según su presencia en organismos vertebrados e invertebrados (Wang y Ning, 2021). Estos grupos se pueden subdividir de acuerdo al dominio presente, por ejemplo, las proteínas TRIM del grupo 1 existen tanto en vertebrados como en invertebrados, algunos de los dominios que se encuentran en este grupo son los dominios: FN3 (fibronectina tipo 3), que pueden contener sitios de unión para DNA y heparina; PHD (homeodominios de plantas); y bromodominios, que reconocen residuos de lisina acetilados o MATH (Dominios de homología del factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral). Las proteínas del grupo 2, solo se encuentran en vertebrados y poseen un dominio SPRY o SPY-SPRY, ambos dominios tienen la capacidad de unirse a proteínas y pueden mediar la unión a moléculas de RNA (van Gent *et al.*, 2018) (Figura 3).

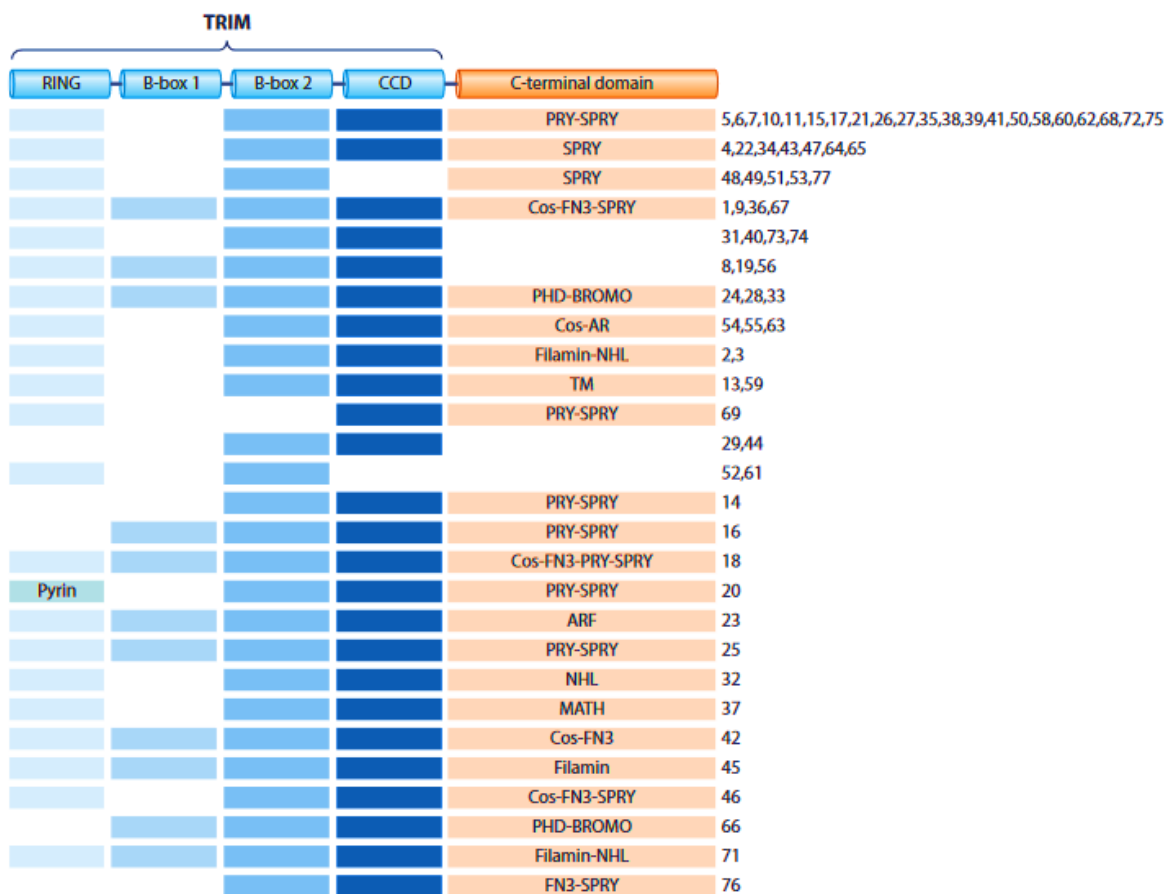


Figura 3. Estructura de proteínas de la familia TRIM. El dominio conservado RBCC de TRIM consta de un dominio de gen nuevo realmente interesante (RING), un dominio B-box 1 y/o B-box 2, y un dominio en espiral (CCD), es seguido por distintos dominios C-terminales: SPRY- dominio

asociado (PRY), SPLa y el dominio del receptor de rianodina (SPRY), dominio característico del subgrupo uno C-terminal (Cos), dominio de fibronectina tipo 3 (FN3), homeodominio de planta (PHD), bromodominio (BROMO), región rica en ácido (AR), dominio de filamina, repeticiones de NHL (NHL), dominio transmembrana (TM), dominio del factor de ribosilación de ADP (ARF) y dominio de homología del factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (MATH) de meprina. Cada fila corresponde a un subgrupo de la familia de proteínas TRIM y los números de la derecha indican a diferentes proteínas TRIM. Figura tomada de (van Gent *et al.*, 2018)

Los miembros de la familia TRIM tienen diferentes mecanismos de acción: como enzimas que median la ubiquitinación, como proteínas de unión a RNA y como posibles moduladoras de la transcripción (Azuma y Inoue, 2022). Diversos autores han señalado que alteraciones en los genes que codifican a los miembros de esta familia, tales como una delección génica, traslocación, pérdida de heterocigosidad, sobreexpresión y la expresión disminuida, están involucradas en diversos tipos de cáncer. Promoviendo la progresión tumoral y la metástasis, con grandes implicaciones en la resistencia a terapia anticancerígena (Rahimi-Tesiye *et al.*, 2023).

1.2.2 La proteína TRIM25

Dentro de la gran familia de proteínas TRIM, se encuentra la proteína conocida como TRIM25 (del inglés *Tripartite motif containing 25*), inicialmente se identificó mediante un microarreglo de genes sensibles al estrógeno, por lo cual también se le llama EFP (del inglés *estrogen-responsive finger protein*) (Inoue *et al.*, 1993), tiene un peso molecular de aproximadamente 71 kDa y contiene 630 aminoácidos. El gen que codifica para la proteína TRIM25 se encuentra en el brazo largo 22 del cromosoma 17 y está organizado en 9 exones (ver Figura 4A).

En condiciones fisiológicas, TRIM25 se distribuye en mayor proporción en placenta, útero, glándula tiroides, aorta y bazo (Shimada *et al.*, 2004). A nivel celular, se localiza principalmente en gránulos de estrés citoplasmáticos y en el núcleo celular (Sánchez-Aparicio *et al.*, 2017).

Las principales funciones descritas para TRIM25 incluyen su participación en la respuesta inmune antiviral y en la progresión tumoral (Zhou y Costello, 2017). Sin embargo, diversos estudios sugieren que está involucrada en múltiples procesos

biológicos como la regulación transcripcional de diversos genes, la organización de la matriz extracelular y en diferentes vías de señalización (Oshiumi *et al.*, 2013). La función molecular de TRIM25 mejor caracterizada es su actividad como E3 ligasa de ubiquitina, involucrada, principalmente, en la señalización de RIG-I durante la respuesta antiviral (Haubrich *et al.*, 2020). TRIM25 media la ubiquitinación en el residuo K-172 de los dominios CARD de RIG-I. Así mismo, permite la interacción no covalente de la cadena de poliubiquitina unida a K-63 con RIG-I, para que dicha proteína pueda reconocer el RNA viral, interactuar con MAVS y así activar diversas vías de señalización involucradas con la producción de interferones (Gack *et al.*, 2007). No obstante, se ha identificado que TRIM25 puede fungir como molécula de unión al RNA y DNA, y mediar procesos de interacción proteica a través de sus dominios estructurales.

La estructura de TRIM25 (ver Figura 4B) consta de una región conservada en el extremo amino terminal (N-terminal). Dicha región, presenta un dominio RING, dos dominio B box (B1/B2) y un dominio de espiral enrollada o hélice superenrollada (C-C); responsable de la homo- y hetero-dimerización (Li *et al.*, 2014). En el extremo carboxilo terminal (C-terminal), presenta un dominio B30.2 (SPRY/PRY) que es responsable de las interacciones proteína-proteína (Ponting, 1997).

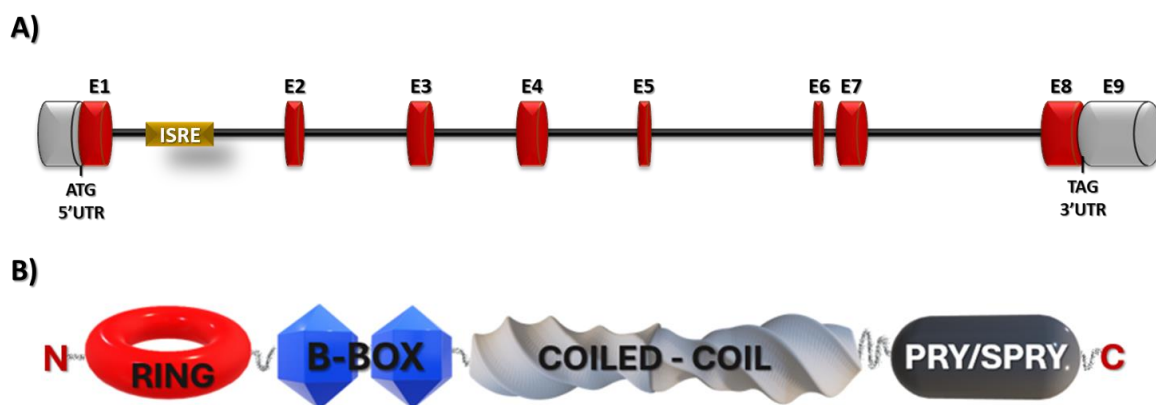


Figura 4. Estructura de TRIM25. A) Esquema del Gen que codifica para TRIM25 y B) estructura de la proteína TRIM25. (Imagen modificada de Palacios *et al.* 2024)

El dominio RING está conformada por dedos de zinc rico en cisteínas (Stevens *et al.*, 2019) y es el responsable de la actividad enzimática de TRIM25 como E3 ligasa de ubiquitina. Este dominio cataliza la formación de un enlace covalente entre el

motivo de unión (LRLRGG) de la ubiquitina con un residuo de lisina en la proteína blanco. Las proteínas blanco de TRIM25, a menudo, suelen ser proteínas de unión a RNA. A la fecha, se han identificado varios sustratos para TRIM25. Algunos autores, sugieren que la posición del residuo de lisina ubiquitinado, determinará la función de la ubiquitinación. Por ejemplo, la poliubiquitinación a través de la K48 promueve la degradación proteosomal. Mientras que la poliubiquitinación dependiente de K63 se ha asociado a mecanismos de estabilidad de complejos proteicos y a cambios en la localización o en la actividad de los sustratos (Haubrich *et al.*, 2020; Koliopoulos *et al.*, 2016).

Además, el dominio RING, también ha sido señalado como responsable de su función como ligasa E3 de ISG15 (Zou y Zhang, 2006). Reacción involucrada en una novedosa modificación postraducciona denominada: *ISGilación*, pero estas acciones han sido escasamente estudiadas (Nakasato *et al.*, 2006) (Figura 5).

Por otro lado, los dominios de caja B, se caracterizan por la interacción coordinada de uno o dos átomos de zinc con el grupo tiol de residuos de cisteína y átomos de nitrógeno de residuos de histidina en la proteína que posee dicho dominio (Klug, 2010). Se ha señalado que los dominios de cajas B, al poseer una estructura similar a los dominios RING, adquieren la funcionalidad de E3 ligasa, mejorando la redundancia de la actividad de ligasa E3 no solamente en las proteínas TRIM con el dominio RING, sino también de otras proteínas con esta función (Anthony Massiah, 2019). Particularmente, se identificó que la presencia de cajas B mejora la actividad de TRIM25 en la formación del complejo entre el dominio RING y una enzima E2 cargada con ubiquitina, para llevar a cabo la transferencia de esta en la ubiquitinación (Koliopoulos *et al.*, 2016). Además, los dominios de cajas B en TRIM25, se han señalado como participantes importantes en la unión al DNA (Li *et al.*, 2020).

El dominio de hélice superenrollada está conformado por dos o más cadenas α -helicoidales (Woolfson, 2017). Diversos autores señalan que la dimerización de TRIM25 es necesaria para que sea una proteína funcional (D'Cruz *et al.*, 2018; Koliopoulos *et al.*, 2016; Sanchez *et al.*, 2016). Jacint G. Sánchez y colaboradores, mediante análisis cristalográficos, evidenciaron que TRIM25 se dimeriza formando

horquillas antiparalelas mediante la interacción de los dominios hélice superenrollada (Sanchez *et al.*, 2014) (Figura 5).

Finalmente, el dominio SPRY-PRY localizado en el extremo C-terminal de TRIM25 actúa como un módulo de interacción proteica (Akshay A. D'Cruz *et al.*, 2013). Hace algunas décadas, TRIM25 fue identificada como proteína de unión a RNA (Baltz *et al.*, 2012; Castello *et al.*, 2012; Kwon *et al.*, 2013). Más tarde, mediante ensayos de EMSA (por sus siglas en inglés, *electrophoretic mobility shift assay*), se determinó que el dominio PRY-SPRY estaba directamente ligado a esta función (Choudhury *et al.*, 2017; Akshay A. D'Cruz *et al.*, 2013) (Figura 5).

Al respecto, las funciones estructurales de TRIM25 y sus acciones biológicas no han sido del todo estudiadas. Se ha propuesto que los dominios de caja B, hélice superenrollada y PRY/SPRY están vinculados estructural y funcionalmente con el dominio RING, llevando a cabo una función cooperadora (Anthony Massiah, 2019; Choudhury *et al.*, 2017; Koliopoulos *et al.*, 2018; Williams *et al.*, 2019). Además, se ha propuesto, que el dominio B-box podría estar implicado en la asociación de TRIM25 con el DNA. Mientras, que los dominios de hélice superenrollada y PRY/SPRY parecen ser importantes para las interacciones con el RNA (Choudhury *et al.*, 2020; Sanchez *et al.*, 2016) (Figura 5).

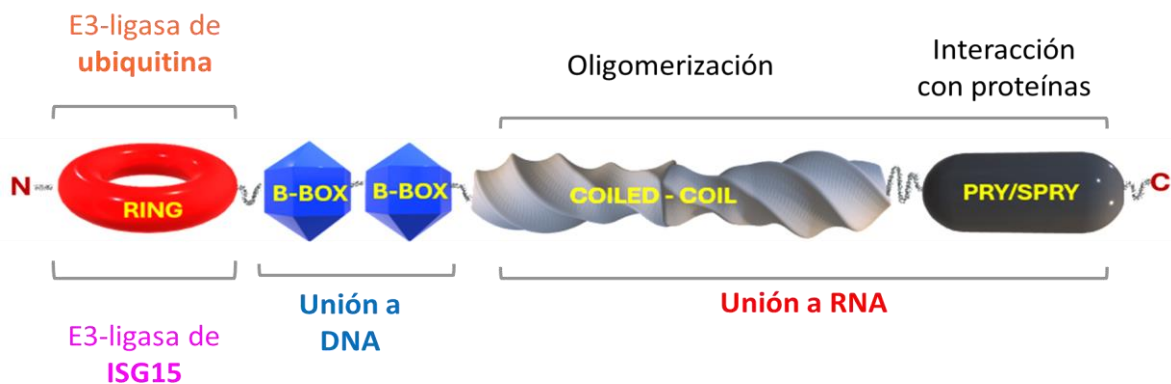


Figura 5. Funciones estructurales de la proteína TRIM25. Representación esquemática de la función asociada a cada dominio estructural de la proteína TRIM25. (Imagen modificada de Palacios E. *et al.* 2024)

Las características de TRIM25 indican que podría ser una proteína multifuncional en diversos contextos. No obstante, su actividad como enzima E3 ligasa de

ubiquitina (de las más de 600 ligasas de ubiquitina E3 que existen) ha sido mayormente descrita, principalmente en su participación en la respuesta inmune antiviral (Choudhury *et al.*, 2020; Gack *et al.*, 2007).

De manera interesante, el gen que codifica para *TRIM25*, también contiene la secuencia para generar al microRNA: miR-3614-3p, el cuál reprime la expresión de *TRIM25* a nivel postranscripcional al unirse a su región 3'UTR (Wang *et al.*, 2019). Así mismo, se han identificado algunos microRNA con capacidad de modular la expresión de *TRIM25* a nivel postranscripcional como el miR-365 descrito en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (Han *et al.*, 2019). El miR-19, el miR-127-5p y el miR-487a-3p en el contexto de carcinoma hepatocelular (J. Wang *et al.*, 2021; Yu y Ren, 2022; Zhang *et al.*, 2020) (Figura 6).

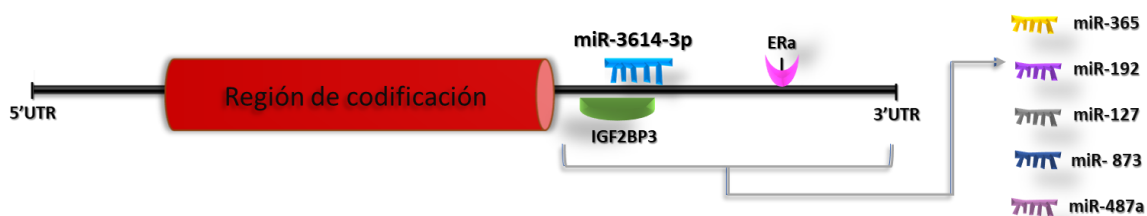


Figura 6. Regulación post-transcripcional de la expresión de *TRIM25*. Mecanismos de regulación de expresión de *TRIM25* POR miRNAs. (Imagen tomada de Palacios *et al.* 2024).

Además, múltiples sitios de fosforilación en la secuencia de *TRIM25* han sido señalados. Sin embargo, hasta el momento solo se ha descrito la función de la fosforilación en el residuo de tirosina en la posición 278 (Y278). Esta modificación en la secuencia de *TRIM25* afecta su actividad enzimática como E3 ligasa de ubiquitina. También, se identificó que la cinasa de tirosinas llamada c-Src, es capaz de inducir la fosforilación de la Y278 en *TRIM25* y que además el dominio PRY/SPRY de la misma, es decisiva para el reclutamiento c-Src (Lee *et al.*, 2018). Mutaciones en los genes *TRIM*, han sido relacionados con trastornos del desarrollo, musculares y neurológicos (Meroni y Desagher, 2022). En el caso de *TRIM25*, recientemente se describió una mutación sin sentido en la p.C168*. Dicha mutación, da origen a una proteína truncada antes del dominio hélice superenrollada, teniendo como consecuencia la pérdida de función (Gómez-Tortosa *et al.*, 2023). Hasta la fecha, es la primera variante génica en *TRIM25* asociada a una patología.

1.2.3 ISGilación

La ISGilación es una modificación postraduccional (PTM) que consiste en la unión covalente de la proteína ISG15 a sus proteínas blanco. ISG15 es una proteína sintetizada a partir de un gen que es inducido por interferones y que puede ser secretada al medio extracelular o conjugarse postraduccionalmente. Tiene un peso molecular de alrededor de 15 kDa. Su estructura se compone de dos dominios parecidos a ubiquitina, UBL1 y UBL2. El dominio UBL2 contiene un motivo C-terminal con dos residuos de glicina, involucrados en la conjugación con la proteína blanco mediante la ISGilación (Mirzalieva *et al.*, 2022).

La ISGilación ocurre a través de un sistema de tres enzimas que median la activación, conjugación y ligación de ISG15 a residuos de lisina de proteínas específicas (Tecalco-Cruz *et al.*, 2022). A diferencia del sistema de ubiquitinación, que cuenta con un gran número de enzimas, los elementos del sistema de ISGilación son 5: una enzima E1 de activación, una enzima E2 de conjugación y tres ligasas E3. Las ligasas E3 de ISG15 son: HHARI, HERC5 y TRIM25 (Takeuchi *et al.*, 2006), las cuales se consideran importantes para la especificidad del sustrato (Figura 7). Sin embargo, las proteínas blanco de ISGilación identificadas y caracterizadas son limitadas. Su función se asocia con la modulación de la estabilidad de la proteína o con las interacciones entre proteínas (Azuma y Inoue, 2022).

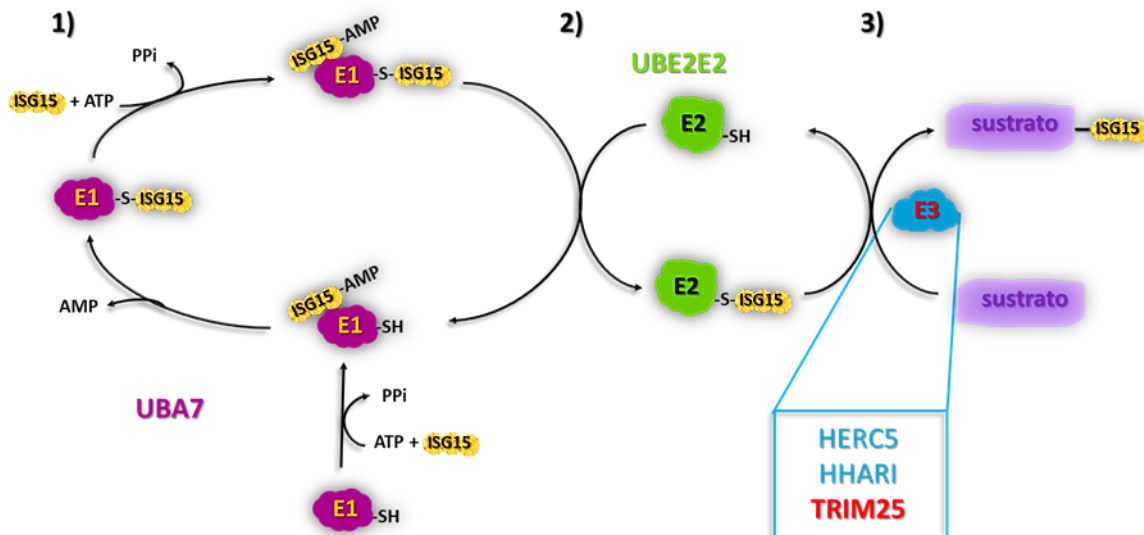


Figura 7. Esquema de la ISGilación. 1) La enzima E1 se une a ISG15 y ATP y cataliza la reacción de adenilación de ISG15. La cisteína catalítica ataca el enlace ISG15-AMP resultando en la formación de un enlace tioéster E1-ISG15. La E1 adenila una segunda molécula de ISG15. 2) ISG15 es transferido a una enzima E2 a través de una reacción de transtioesterificación. 3) La E2 conjugada transfiere una molécula de ISG15 a una enzima ligasa E3; HERC5, HHARI o **TRIM25** mediante una reacción de transtioesterificación para una subsecuente transferencia al residuo de lisina de la proteína sustrato mediante una reacción de aminólisis.

Los niveles de ISG15/ISGilación se encuentran incrementados en la mayoría de los tipos de cáncer estudiados hasta ahora, o bien tras una infección viral y en respuesta a estímulos con interferones (IFN) tipo I, principalmente (Mirzalieva *et al.*, 2022).

1.2.4 ISG15

ISG15 es una proteína perteneciente al grupo de las proteínas parecidas a la ubiquitina (*UBL; ubiquitin like proteins* por sus siglas en inglés), que si bien no ha sido tan estudiada como la ubiquitina, se han mostrado su relevancia en importantes funciones, como su participación en la respuesta inmune antiviral (Zhang y Zhang, 2011), principalmente. Además, en los últimos años, se ha identificado como una proteína con gran implicación en mecanismos de respuesta al daño del DNA, la estabilidad del genoma, el desarrollo de enfermedades del sistema inmune, neurológicas y cáncer (Mirzalieva *et al.*, 2022; Sandy *et al.*, 2020; Wardlaw y Petrini, 2023).

Ha sido descrito que ISG15 se puede encontrar sobreexpresada en varios tipos de cáncer, incluido el glioblastoma (Tecalco-Cruz *et al.*, 2022; Tecalco-Cruz y Cruz-Ramos, 2018; Zuo *et al.*, 2016). Se reportó que en células cancerosas, ISG15 se puede encontrar conjugada con proteínas celulares (ISGilación) o libre (intracelular) (Burks *et al.*, 2015). Sin embargo, ISG15 libre también puede ser secretada al medio extracelular (Dos Santos y Mansur, 2017). Debido a la versatilidad funcional de ISG15, se ha propuesto que tiene funciones protumorales o antitumorales, dependiendo si se encuentra en forma libre o conjugada. La ISGilación se asocia a

funciones protumorales. Mientras que la función de ISG15 libre extracelular, tiene propiedades inmunomoduladoras *in vitro* (Burks *et al.*, 2015). Se conoce muy poco de la función de ISG15 intracelular; sin embargo, Tecalco Cruz y Mejía Barreto describen que la localización, así como la proporción y la regulación de la proteína ISG15 libre y conjugada, será determinante para la progresión de la tumorigénesis y el potencial oncogénico en células derivadas de cáncer de mama (Tecalco Cruz y Mejía-Barreto, 2017).

Las células del sistema inmune producen diversas citocinas con el fin de montar una respuesta inmune. El interferón gamma (IFN γ) es una citocina liberada en respuesta a estímulos por otras citocinas, por activación de receptores de reconocimiento de patrones o receptores de antígenos activados por daño tisular o infecciones microbianas (Ivashkiv, 2018). En general, los interferones participan de manera importante en la homeostasis y el desarrollo celular. Por lo tanto, su ausencia o sobreexpresión se asocia con diversas enfermedades, incluyendo el cáncer.

La síntesis de ISG15 y la conjugación con diversas proteínas o ISGilación son mecanismos inducidos por interferones. Del mismo modo, se describe a *TRIM25* como un gen sensible a IFN (Nakasato *et al.*, 2006). En condiciones fisiológicas, los niveles de ISG15 son mínimos, estos pueden encontrarse aumentados de manera dependiente de IFN en múltiples tipos de cáncer, trastornos neurodegenerativos, enfermedades inflamatorias y en lesiones cerebrales traumáticas (Mirzalieva *et al.*, 2022).

Los componentes conocidos del sistema de ISG15/ISGilación son activados por los IFN de manera dependiente del contexto celular (Tecalco-Cruz *et al.*, 2022). El gen *TRIM25* es uno de los genes inducidos por los IFN tipo I en varios tipos celulares, y a la fecha se ha observado que los IFN tipo II (cuyo único miembro es IFN-gamma) inducen la expresión de *TRIM25* en leucocitos (Wang y Ning, 2021; Zou y Zhang, 2006).

Recientemente, un estudio evidenció que ISG15 y el perfil de ISGilación se incrementan en respuesta al tratamiento del IFN- γ en células derivadas de GB, así como una desregulación en las enzimas del sistema de ISGilación. Además, se

reportó que las muestras de pacientes con GB presentan altos niveles del RNAm y de la proteína de ISG15, y que una alta expresión de *ISG15* correlaciona con una menor supervivencia de los pacientes (Tecalco-Cruz *et al.*, 2022).

Adicionalmente, se ha visto que la señalización canónica del IFN- γ se encuentra aumentada en GB, por lo que el eje IFN- γ -ISG15/ISG15 podría tener una participación importante en el desarrollo del GB.

1.2.5 TRIM25 en cáncer

Estudios recientes han evidenciado cambios en la expresión de algunas proteínas TRIM en los procesos de carcinogénesis y metástasis, principalmente en cáncer de mama, próstata, ovario y endometrio (Azuma y Inoue, 2022). TRIM25 se ha descrito como una proteína que contribuye a la progresión tumoral cuando se encuentra sobreexpresada (Tabla 2), promoviendo la proliferación, migración e invasión de células tumorales derivadas de cáncer de mama, ovario, pulmón y gástrico (Figura 8). El papel dual de TRIM25 en la degradación de p53, vía ubiquitin-proteosoma y la reducción de su actividad transcripcional, ha sido relevante para elucidar su participación en la carcinogénesis y la autorrenovación de células tumorales (Zhou y Costello, 2017).

Tabla 2. Ejemplos de cánceres con expresión diferencial de TRIM25 con respecto a su tejido control.

Tipo de cáncer	Expresión	Referencia
Ovario	incrementada	(Hatakeyama, 2017; Sakuma <i>et al.</i> , 2005)
Mama	incrementada	(Azuma y Inoue, 2022; Tecalco-Cruz <i>et al.</i> , 2021)
Colorectal	incrementada	(Zhou <i>et al.</i> , 2021)
Pulmón	incrementada	(Qin <i>et al.</i> , 2016)
Próstata	incrementada	(Li <i>et al.</i> , 2022; Takayama <i>et al.</i> , 2018)
Glioma	incrementada	(Ge <i>et al.</i> , 2022a)

La expresión de *TRIM25* se incrementa en algunos tumores malignos. Algunos de ellos son los cánceres de páncreas, colorrectal, de pulmón, gástrico y hepático (Li *et al.*, 2022, 2020). Además, las hormonas estrogénicas inducen su expresión en cáncer de mama (Azuma y Inoue, 2022). Particularmente en cáncer de mama, *TRIM25* se ha propuesto como un regulador de la expresión a nivel transcripcional y postranscripcional implicado en la firma de genes asociados a metástasis (Walsh *et al.*, 2017). Así mismo, se ha identificado su participación como E3 ligasa de ubiquitina en la degradación de diversos supresores tumorales. Por mencionar algunos ejemplos; *TRIM25* es capaz de poliubiquitar a la proteína 14-3-3 σ para promover su degradación y así favorecer la proliferación celular (Urano *et al.*, 2002), media la degradación de *ATBF1* (*AT motif binding factor 1*) (Dong *et al.*, 2012), un regulador positivo de la expresión de *ZEB1* (*Zinc finger E-box binding homeobox 1*), involucrado en la represión de la expresión de *E-cadherina* y la inducción de la transición epitelio-mesenquimal o EMT en cáncer de mama (Cao *et al.*, 2016). Además, *TRIM25* es pieza clave para la ubiquitinación de la proteína *AZGP1* (*Zinc-alpha-2-glycoprotein*), una glicoproteína altamente expresada en cáncer de mama que correlaciona negativamente con la supervivencia de pacientes con este tipo de tumores (Qin *et al.*, 2023).

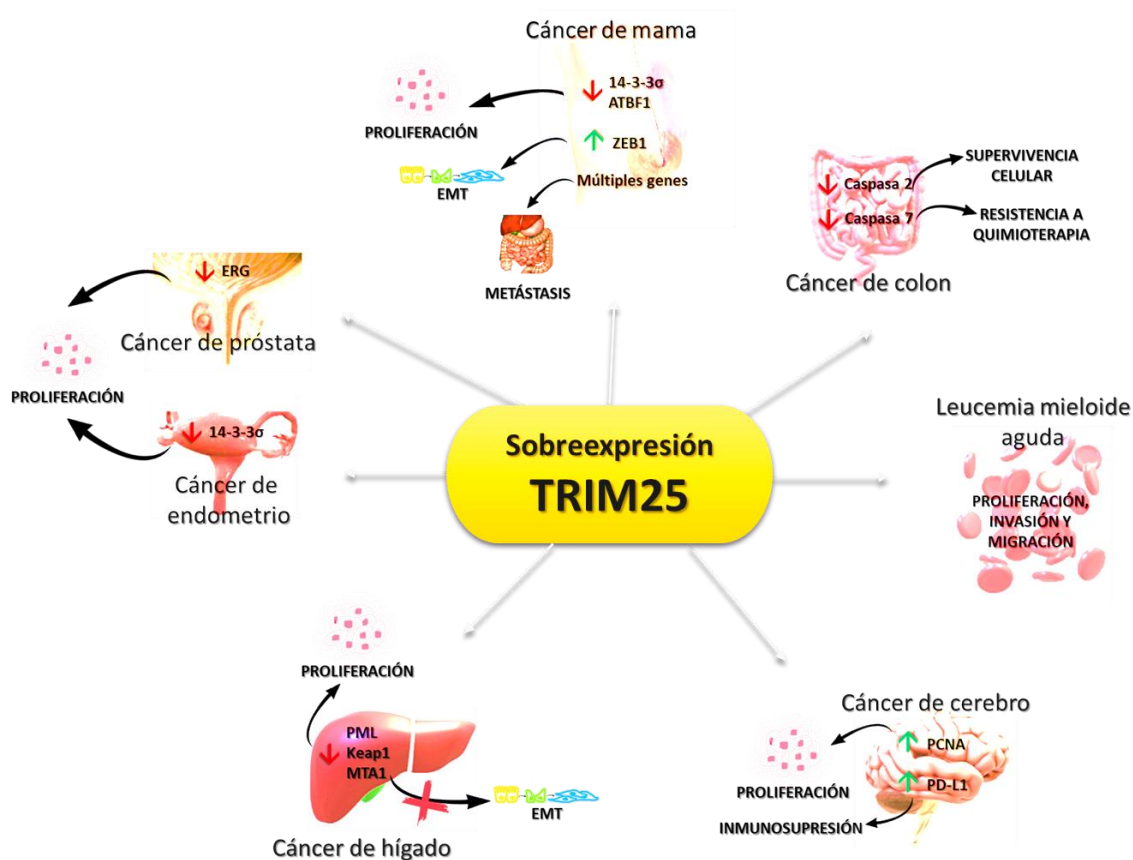


Figura 8. Efecto de la sobreexpresión de TRIM25 en algunos tipos de cáncer (*Imagen tomada de Palacios et al. 2024*).

Debido a su origen y su dependencia con el estrógeno, TRIM25 se encuentra involucrado en la promoción de algunos tipos de cáncer dependientes de hormonas (Azuma y Inoue, 2022). Por ejemplo, Sato y colaboradores describieron que TRIM25 promueve el crecimiento tumoral a través de la modulación de la vía de señalización NF κ B y la degradación de la proteína 14-3-3 σ (Sato *et al.*, 2018). Mientras que en el contexto de cáncer de próstata, TRIM25 podría estar participando como regulador negativo de p53 y de la apoptosis, promoviendo el crecimiento de células tumorales (Takayama *et al.*, 2018).

De manera interesante, se ha descrito la participación de los diferentes dominios estructurales de TRIM25 en diversos tumores. Con esto, una vez más se confirma la multifuncionalidad de TRIM25. F. Li y col., identificaron en cáncer de hígado que TRIM25 se puede estar uniendo a la región del sitio de inicio de la transcripción (TSS) del gen *PML*, probablemente, por la participación de sus dominios de cajas B y así estar regulando negativamente su expresión e induciendo la proliferación celular (Li *et al.*, 2020).

1.2.6 TRIM25 en glioblastoma

Recientemente se reportó que el aumento de la expresión de *TRIM25*, está mediado por la activación de NF- κ B y esto contribuye a un mal pronóstico en pacientes con GB. Mau Xu Ge y colaboradores comprobaron que TRIM25 se encuentra incrementado en pacientes con GB y mediante estrategias de *knockdown* evidenciaron que *TRIM25* promueve la proliferación celular modulando la expresión de genes relacionados. Algunos de ellos son: PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*), XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*), CCNB1 (*Cyclin B1*) y CCND1 (*Cyclin D1*). Así mismo, identificaron que TRIM25 modula la expresión del ligando de muerte programada o *PD-L1* y la importación de NF- κ B al núcleo, contribuyendo a un microambiente inmunosuprimido en los gliomas de alto grado (Ge *et al.*, 2022). Por otro lado, Yike Chen y colaboradores identificaron que TRIM25 media la ubiquitinación del factor de *splicing* NONO, una molécula reguladora de la expresión de *PRMT1*, un gen que codifica para la proteína arginina N-metiltransferasa 1; una importante enzima involucrada en la activación de c-MYC. De esta manera, TRIM25 se encuentra ampliamente involucrado en la promoción del crecimiento tumoral y la migración e invasión celular de células de GB (Chen *et al.*, 2024).

Otro estudio, evidenció que la ubiquitinación degradativa de la enzima colin cinasa α (CHK α o *Choline kinase α*), mediada por TRIM25, se puede ver afectada por la interacción de la enzima glicolítica enolasa-1 (ENO1) con CHK α . La enzima ENO1 se une a CHK α e impide la unión de TRIM25, su ubiquitinación y su posterior degradación proteosomal, ocasionando un incremento en los niveles de CHK α , el metabolismo de la colina y la aceleración del crecimiento de células de GB,

asociándose con un mal pronóstico (Ma *et al.*, 2023). Sin embargo, la participación de TRIM25 en este contexto no es directa.

Adicionalmente, hay estudios que señalan a TRIM25 como una molécula responsable de la resistencia a tratamientos quimioterapéuticos, como es al uso de temozolomida. Primero, se describió que TRIM25 inhibe el estrés oxidativo y la muerte celular ferroptótica en células de glioma bajo tratamiento con temozolomida vía Keap1-Nrf2 (Wei *et al.*, 2023).

TRIM25 media la ubiquitinación degradativa de la inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) cinasa B (ITPKB). Recientemente, se publicó que la interacción entre TRIM25 e ITPKB era más débil en muestras de pacientes bajo tratamiento con temozolomida con respecto a muestras de pacientes que no recibían dicho fármaco. Así mismo, identificaron que la disminución de la fosforilación de TRIM25 en la posición serina 100 (S100) en muestras de GB recurrentes conduce a una ubiquitinación debilitada de ITPKB. Dando como consecuencia un incremento de los niveles de ITPKB, lo que correlaciona con una menor supervivencia de los pacientes con gliomas (Yan *et al.*, 2024).

2. Hipótesis

Los niveles de TRIM25 se encuentran incrementados en glioblastoma, modulando el perfil de ISGilación y, en este contexto, la expresión de genes que se han relacionado al cáncer.

3. Justificación

El GB es un tumor maligno altamente agresivo con un tiempo de supervivencia muy limitado después del diagnóstico, por lo que se requieren más investigaciones para entender las bases moleculares implicadas en la progresión de esta neoplasia. Por otro lado, la proteína TRIM25 podría tener múltiples funciones participando en la regulación transcripcional, postranscripcional y postraducciona de blancos específicos. Sin embargo, el perfil de expresión de TRIM25 y su importancia funcional en células de GB es incierto. Por lo tanto, el estudio de la expresión y

actividad de TRIM25 en GB, contribuirá a la identificación de TRIM25 como una proteína multifuncional que podría ser clave en la progresión de los tumores de GB.

4. Objetivos

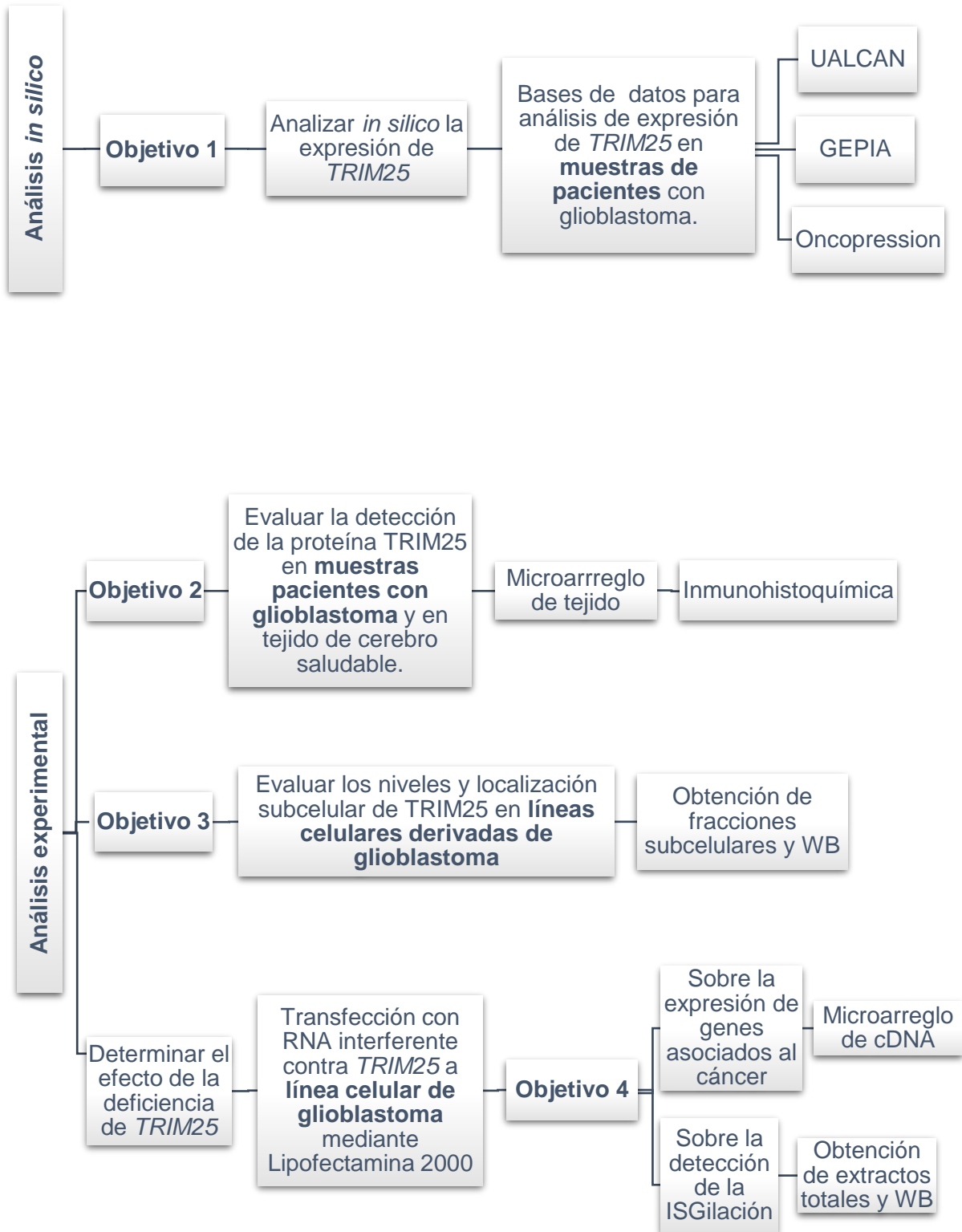
4.1 Objetivo general

Evaluar la expresión de TRIM25 en GB y el impacto funcional de la deficiencia de TRIM25 sobre la ISGilación, los niveles de ISG15 y expresión de genes en células derivadas de GB.

4.2 Objetivos particulares

1. Analizar *in silico* la expresión de TRIM25 en muestras de GB humano y tejido de cerebro normal.
2. Evaluar los niveles de la proteína TRIM25 en muestras de GB y en tejido de cerebro saludable.
3. Evaluar los niveles y localización subcelular de TRIM25 en líneas celulares derivadas de GB.
4. Determinar el efecto de la deficiencia de TRIM25 sobre el perfil de ISGilación, los niveles de ISG15 y la expresión de genes asociados a cáncer en células derivadas de GB.

5. Estrategia experimental



6. Materiales y métodos

6.1 Reactivos y líneas celulares

Se emplearon las líneas celulares A-172, U87 y U373 derivadas de GB, las cuales se mantuvieron en medio DMEM (Medio Eagle modificado de Dulbecco) bajo en glucosa, con L-glutamina, hidrocloreto de piridoxina piruvato de sodio y bicarbonato de sodio a pH 7.4. El medio se complementó con suero bovino fetal (FBS) al 10 % y antibióticos (penicilina/estreptomicina 10,000 U/mL) al 1%. Las células se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% .

6.2 Obtención de extractos proteicos

Las líneas celulares derivadas de GB se trabajaron en cultivos en monocapa. El medio de cultivo se aspiró y se lavó con PBS frío, posteriormente, las células se lisaron usando el buffer TNTE al 0.5% (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5mM, Triton-X-100 AL 0.5%) con inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se incubaron por 30 min a 4°C con agitación constante, seguido de una centrifugación a 13200 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante recuperado, fue el extracto total de proteínas.

Cuantificación de extractos proteicos.

Las concentraciones de proteína fueron determinadas mediante el método de Bradford empleando el espectrómetro Genova. Los resultados de absorbancia obtenidos se interpolaron en una curva patrón de BSA, previamente estandarizada y validada, cuya curva de regresión lineal está representada por la ecuación:

$$\text{Concentración} = \left(\frac{\text{Absorbancia} - 0.066}{0.0518} \right) * \text{factor de dilución}$$

Preparación de las muestras para su carga en un gel SDS-PAGE

Una vez cuantificado el extracto proteico total se ajustó el volumen para que todas las alícuotas tuvieran la misma cantidad de proteína. A cada alícuota, de máximo 30 µL, se le añadió buffer de carga (Laemmli) con β-mercaptoetanol 6X en una proporción 1:10. Las muestras se homogeneizaron y se hirvieron de 3 a 5 min a 93°C. Se dejaron enfriar y se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

6.3 Electroforesis SDS-PAGE y Western Blot

El extracto total de proteínas obtenido de las líneas celulares se cargó en geles de poliacrilamida al 15% para ISG15 y 10% o 7.5% para TRIM25. La electroforesis se efectuó con un voltaje de 90 a 100 V durante 2 h. Finalizada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia de proteínas a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) a 100 V durante 80 min. Subsecuentemente, las membranas se bloquearon usando una solución de leche descremada al 5% en TBS-T por 1 h. Para evaluar los niveles de ISG15, las membranas de PVDF, previamente bloqueadas con leche, se incubaron durante una noche a 4°C con un anticuerpo primario anti-ISG15 (1:1000) (F-9, sc-166,755 Santa-Cruz Biotechnology) y para determinar los niveles de TRIM25, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anti-TRIM25 (E-4, 200 µg/ml, SC-166926, Santa-Cruz Biotechnology). Se usó un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (1:10,000) que se incubó 1h, seguido de 3 lavados. Para evidenciar las bandas correspondientes a las proteínas reconocidas por los anticuerpos empleados, se realizó una reacción de quimioluminiscencia para detectar la señal. Se empleó la detección de tubulina o GAPDH, como control de carga.

Análisis de densitometría

Las placas de Western blot, se escanearon y se analizaron por densidad de píxeles empleando el software ImageJ. Con los resultados de densitometría se realizó el análisis estadístico correspondiente empleando el software Graph Pad Prism 8.

6.4 Análisis *in silico*

Obtención de expresión diferencial de TRIM25; Pan-cáncer y gráfico de expresión diferencial de TRIM25 en glioblastoma.

Un análisis de expresión genética diferencial se realizó entre el tumor y el tejido normal para *TRIM25*. Se utilizó la herramienta web GEPIA2 (www.gepia2.cancer-pku.cn, consultada en enero de 2024). En concreto se utilizó el módulo “Expression DIY”. Todos los conjuntos de datos de cáncer TCGA (The Cancer Genome Atlas)

disponibles en el panel "Selección de conjunto de datos" se agregaron al análisis. El $|\text{Log}_2\text{FC}|$ de 1 y el valor de corte de p de 0.01 se seleccionaron como parámetros. También se eligió la opción "Hacer coincidir datos TCGA normales y GTEx". Por lo tanto, los datos de transcriptómica del cáncer de TCGA se compararon con datos normales de TCGA o con datos del proyecto Genotype-Tissue Expression (GTEx), que es una base de datos pública que contiene datos de expresión y regulación de genes específicos de muestras de 54 sitios de tejido sano en más de 1000 individuos. El método para el análisis diferencial empleado, fue ANOVA unidireccional, utilizando el estado de la enfermedad (tumoral o normal) como variable para calcular la expresión diferencial. A continuación, se seleccionaron aquellos cánceres que presentaban expresión diferencial significativa, es decir, una $p < 0.01$ y se volvió a solicitar el gráfico sólo con los cánceres con expresión desregulada de *TRIM25*.

Se consultó la base de datos UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>), se consultó la expresión diferencial de *TRIM25* en el TCGA en GB, al realizar la solicitud, la plataforma proporcionó el pan-cáncer. De la base de datos de GEPIA2 y UALCAN se obtuvieron los gráficos de expresión diferencial de *TRIM25* en glioblastoma contra tejido normal.

Así mismo se accedió a la base de datos de ONCOPRESSION (http://www.oncopression.com/cgi-bin/show_profile_of_all_tissue.py?genelid=7706) y se buscó *TRIM25*. Se obtuvo una gráfica horizontal de de cajas y bigotes, donde en color rojo se remarcan los tipos de cáncer que presentan sobreexpresión de *TRIM25* y en verde los cánceres con baja expresión con respecto al tejido no canceroso. Para conocer la expresión de *TRIM25* específicamente en glioblastoma, se seleccionó el recuadro de "*brain cancer*" y se localizó el gráfico correspondiente a GB.

Análisis de supervivencia

Se obtuvieron las curvas de Kaplan Meier (KM) de cada una de las bases de datos empleadas y se consideraron estadísticamente significativas cuando el *log-rank* $p \leq 0,05$. Se ingresó a la página <http://gepia2.cancer-pku.cn/>, al módulo de *survival*

analysis, donde se realizó un análisis de supervivencia basado en el estado de expresión de un gen. Se escribió TRIM25 en el recuadro correspondiente a gen y se seleccionó GB como cáncer de interés. Se mantuvieron las especificaciones del programa; overall survival, cutoff High 50%, cutoff low 50%, con intervalo de confianza del 95%, unidades de meses y conjunto de datos múltiples. Se obtuvo el gráfico KM haciendo clic en Plot. Para obtener el gráfico de KM de UALCAN, se seleccionó con un clic el gen y el cáncer de interés, nos dirigió a otra ventana donde estaba la opción de análisis de supervivencia. Se dio clic y se obtuvo la gráfica de KM.

También se ingresó a la base de datos GENT2 (Gene Expression database of Normal and Tumor tissues 2) mediante la liga <http://gent2.appex.kr>, se seleccionó la opción de *subtype* y se ingresaron como datos de búsqueda tejido cerebral como tipo de muestra, prognosis: overall survival y gen TRIM25. Se compararon los tiempos de supervivencia de los pacientes con gliomas. De acuerdo al valor de expresión mediana de TRIM25 en gliomas, los pacientes se analizaron en dos grupos; con baja expresión (TRIM25^{low}) o con alta expresión (TRIM25^{high}).

Análisis de correlación

En la base de datos UALCAN de la Universidad de Alabama en Birmingham, se realizó un análisis de correlación, con la finalidad de evaluar la existencia de genes que se correlacionen con TRIM25 en GB. Se solicitó el análisis de correlación y a continuación se desplegó una lista de genes que podrían estar correlacionando positivamente o negativamente con TRIM25, indicando el nombre del gen y el coeficiente de correlación de Pearson. Los genes con expresión extremadamente baja (mediana de TPM <0,5) se eliminaron de la lista.

Con el fin de examinar el perfil de expresión diferencial entre los genes que codifican para las enzimas ligasas E3 de ISG15 en el contexto de GB, se realizó un análisis por mapa de calor en la base de datos GEPIA, mediante el uso de datos de expresión génica de pacientes con cáncer e individuos sanos, proporcionados por el TCGA y datos del proyecto GTEx.

Obtención de niveles de proteína de TRIM25 en cáncer

La proteína TRIM25 se introdujo en el portal de análisis de datos sobre cáncer de UALCAN. Los niveles de expresión de TRIM25 se compararon entre el GB y el tejido normal. Los conjuntos de datos de proteómica pertenecen al Consorcio de Análisis de Tumores Proteómicos Clínicos (CPTAC). Luego se visualizaron diagramas de caja, en donde en el **eje y** se mostraban los valores Z. Los valores Z fueron las desviaciones estándar de las medianas en las muestras de cada grupo.

Obtención de expresión diferencial de TRIM25 en líneas celulares derivadas de GB.

Los niveles de expresión de *TRIM25* y los niveles de proteína TRIM25 se analizaron en la base de datos de CCLE (*Cancer Cell Line Encyclopedia*) con la herramienta *deapmap interactive* y se obtuvo una gráfica de relación entre los niveles de RNAm y de la proteína de TRIM25, en distintas líneas celulares derivadas de GB.

6.5 Microarreglo de tejido tumoral

Se empleó un microarreglo de tejido humano comercial (TMA, tissue microarray GL806g Biomax.us) que cuenta con 5 tejidos cerebrales como control de tejido sano, 27 casos de glioblastoma (GB), de acuerdo a la clasificación histológica y patológica por la OMS en el 2021 (Louis *et al.*, 2021), 5 casos de glioblastoma epitelioides (ep-GB), el cuál es un subtipo histológico compuesto por células con abundante citoplasma eosinófilo, cromatina vesicular y nucléolos prominentes, generalmente se desarrollan en niños y en adultos jóvenes, presentan mutación BRAF V600E, carecen de amplificación del EGFR y las pérdidas del cromosoma 10 (Louis *et al.*, 2016). Un caso de glioblastoma con componente neural primitivo (GB-pnc) cuyas células presentan células con pérdida de expresión de los marcadores gliales *GFAP* y *OLIG2*, con posible amplificación de *MYC* o *N-MYC* y que tienden a diseminarse por el líquido cefalorraquídeo (Louis *et al.*, 2016). Así como con dos casos de la variable histológica de glioblastoma de células gigantes (gc-GB), que como su nombre lo dice, se va a identificar por un tamaño celular marcadamente agrandado y multinuclear (Lopes Abath Neto y Aldape, 2021). De manera

interesante, se ha descrito que las características histopatológicas compatibles con el GB de células grandes pueden predecir una mejor tasa de supervivencia (Shinojima *et al.*, 2004). Además, dicho microarreglo proporciona datos clínicos relevantes de cada paciente con GB, tales como: edad, sexo, localización anatómica del tumor (en algunos casos) y la clasificación histológica antes mencionada (ver **Tabla 3**).

Tabla 3. Características clínicas de las muestras del microarreglo tumoral empleado para la detección de TRIM25 por inmunohistoquímica. (<https://www.tissuearray.com/tissue-arrays/Brain/GL806g>). GB: glioblastoma, ep-GB: glioblastoma epitelioide, GB-pnc: glioblastoma con componente neural primitivo, gc-GB: glioblastoma de células gigantes.

Posición	Edad	Sexo	Sitio anatómico.	Diagnóstico
A1-A2	47	M	lóbulo temporal	GB
A3-A4	51	M	lóbulo temporal	GB
A5-A6	52	F	cerebro	GB
A7-A8	1	M	lóbulo temporal	ep-GB
A9-A10	42	M	cerebro	GB
B1-B2	33	M	lóbulo occipital	GB
B3-B4	8	F	cerebro	ep-GB
B5-B6	59	M	lóbulo occipital	gc-GB
B7-B8	17	M	lóbulo frontal	ep-GB
B9-B10	52	M	lóbulo frontal	GB-pnc
C1-C2	23	M	lóbulo occipital	ep-GB
C3-C4	61	F	cerebro	GB
C5-C6	40	M	lóbulo frontal	GB
C7-C8	59	F	lóbulo frontal	GB
C9-C10	22	M	lóbulo parietal	GB
D1-D2	63	F	lóbulo frontal	GB
D3-D4	38	F	lóbulo frontal	GB
D5-D6	66	M	cerebro	GB

D7-D8	65	M	lóbulo frontal	GB
D9-D10	43	F	cerebro	GB
E1-E2	36	M	lóbulo frontal	GB
E3-E4	20	M	lóbulo frontal	GB
E5-E6	22	F	lóbulo frontal	gc-GB
E7-E8	26	F	lóbulo temporal	GB
E9-E10	44	M	lóbulo parietal	ep-GB
F1-F2	80	M	lóbulo temporal	GB
F3-F4	44	F	lóbulo frontal	GB
F5-F6	51	M	lóbulo temporal	GB
F7-F8	32	F	cerebro	GB
F9-F10	48	F	lóbulo occipital	GB
G1-G2	47	F	lóbulo temporal	GB
G3-G4	40	F	cerebro	GB
G5-G6	57	M	cerebro	GB
G7-G8	51	M	lóbulo parietal	GB
G9-G10	33	F	lóbulo temporal	GB
H1-H2	50	F	cerebro sano	tejido cerebral
H3-H4	42	F	cerebro sano	tejido cerebral
H5-H6	35	M	cerebro sano	tejido cerebral
H7-H8	24	F	cerebro sano	tejido cerebral
H9-H10	49	M	cerebro sano	tejido cerebral

6.6 Ensayo de inmunohistoquímica

De acuerdo a la metodología previamente reportada (Correa-Arzate *et al.*, 2023), el microarreglo de tejido tumoral de humano (TissueArray GL806g), previamente descrito, se desparafino y rehidrató en diferentes soluciones de xilol-etanol. Para la recuperación de antígeno, se colocó en el horno (KOS Microwave Histostation, Milestone) a 95°C durante 30 min en un buffer de citratos 0.01 M. Después se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% y se permeabilizó el tejido usando Triton X-100 al 0.1%, durante 20 min cada

uno. Para la detección de la proteína TRIM25, el TMA se cubrió con un anticuerpo monoclonal primario anti-TRIM25 (1:350, E-4, 200 µg/ml, SC-166926, Santa-Cruz Biotechnology) y se incubó durante la noche a 4°C. A continuación, los resultados de la inmunodetección se visualizaron utilizando un ImmunoDetector DAB HRP Brown Immunohistochemistry (Bio SB, BSB 0007, Goleta), seguido de una contratinción nuclear con hematoxilina de Harris y se visualizaron bajo un microscopio Leica DM750. Se realizaron cinco fotomicrografías empleando una cámara Leica ICC50 HD, obteniendo imágenes con un aumento de 400x de cada muestra. Los resultados fueron revisados y evaluados por dos patólogos independientes y se calificaron de acuerdo con la proporción de células positivas (valores 0 a 3), donde 0 indica ausencia, 1 indica 0 a 10 %, 2 indica 11 a 50 % y 3 revela una proporción superior al 50%. Para determinar el número de unidades ópticas se utilizó la herramienta multipunto del software Image J 1.54D, y los resultados se calibraron mediante la ecuación que relaciona el índice de inmunoexpresión y la densidad óptica, dada por la fórmula $x = (y - b) / m$, donde “x” es índice de inmunoexpresión y “y” la densidad óptica. Posteriormente, se categorizó la expresión como débil, moderada o tinción intensa (De Matos *et al.*, 2006). Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa estadístico Graph Pad Prism 8.0.1.

6.7 Fraccionamiento subcelular

Las células A-172 y U373 se homogeneizaron con buffer de homogenización (250 mM de sacarosa, 3 mM de imidazol e inhibidores de fosfatasa y proteasas) y después se pasaron 15 veces a través de una aguja de 22 g. Fueron centrifugadas a 3400 rpm por 10 min y se separó el sobrenadante (fracción citoplasmática) del pellet (fracción nuclear). Ambas fracciones fueron lisadas con buffer RIPA 1X (TrisHCl, NaCl, EDTA/0.5% ácido desoxicólico, 1% NP-40 y 0.1% SDS) a 4°C durante 1 h, finalizado el tiempo de lisis, se centrifugaron a 13400 rpm por 5 min a 4°C. Los extractos citoplasmático y nuclear resultantes, se cuantificaron y se realizó un Western blot (WB) para la detección de TRIM25, usando lámina A como control

de carga para la fracción nuclear y a tubulina como control de carga para la fracción citoplasmática.

6.8 Predicción de localización subcelular

La secuencia de aminoácidos de TRIM25 en la base de datos UNIPROT se consultó y se analizó la posible localización de la proteína TRIM25 de acuerdo a su secuencia en la base de datos PSORT II (*Prediction of Protein Sorting Signals and Localization Sites in Amino Acid Sequences*).

6.9 Ensayo de transfección de RNAi contra TRIM25

Transfección con siRNA-TRIM25

Las líneas celulares derivadas de glioblastoma A-172 fueron cultivadas en medio DMEM complementado con FBS al 10% y antibióticos al 1% (penicilina/estreptomicina), e incubadas a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%. El siRNA-EFP (sc-37825, EFP-siRNA(h), Santa Cruz Biotechnology) se transfectó en células de GB usando Lipofectamina 2000 (11668019; Invitrogen, Waltham, MA, USA). El siRNA-TRIM25 se incubó con la solución de Lipofectamina 2000 por 15 min para permitir la formación de los complejos de siRNA/lípido. Esta solución se agregó a las cajas con las células A172 en medio reducido en suero (Opti-MEM™) y se incubaron a 37°C durante 4 h. Después se retiró el medio de transfección, se añadió medio DMEM con FBS al 10% con antibióticos (penicilina y estreptomicina 100U/mL) y se volvieron a incubar en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. A las 48 h después de la transfección, las células fueron lisadas con buffer TNTE al 0.5% y a partir del extracto total de proteínas se realizó una electroforesis SDS-PAGE y un WB para analizar los niveles de TRIM25. De esta manera, se obtuvieron células de glioblastoma siTRIM25 y células control.

Transformación bacteriana y purificación del plásmido.

Se efectuó la transformación de células *E. coli* ultracompetentes (One Shot™ TOP10, Invitrogen™ C404010) mediante choque térmico de acuerdo a la siguiente metodología: las bacterias se incubaron 30 min en solución KCM más el plásmido pSuperRetro-EFP siRNA2 (donado por Dong-Er Zhang: Addgene plasmid # 12450; <http://n2t.net/addgene:12450>; RRID:Addgene_12450) (Zou y Zhang, 2006). Después se llevaron a un baño de 42 °C durante 2 min exactamente y posteriormente se regresaron a hielo. Al vial con las células se le añadió 1 mL de medio Luria Bertani (LB; extracto de levadura, peptona de caseína y cloruro de sodio) y se incubó 1 h a 37°C. Terminado este tiempo, las células se centrifugaron y se sembraron en una caja Petri con agar más ampicilina (50 µg/mL) a 37°C de 12 a 24 h. Se aisló una colonia de células resultantes de la transformación y se incubó en 300 mL de medio LB con antibiótico (ampicilina 50 µg/mL) a 37°C toda la noche en agitación constante. El plásmido se purificó con el kit QIAGEN *Plasmid Midi Kit* se cuantificó mediante el uso de Nano Drop (ND-1000) y se verificó su integridad corriendo un gel de agarosa 1%.

Transfección con shRNA-TRIM25

Para la transfección del shRNA-TRIM25 (pSuperRetro-EFP siRNA2, plásmido Addgene # 12450. El plásmido fue otorgado por Dong-Er Zhang), en células A-172 derivadas de glioblastoma se usó el método de Lipofectamina 2000. El plásmido se incubó con la solución de Lipofectamina 2000 por 15 min para permitir la formación de los complejos de DNA/lípido. Esta solución se agregó a las cajas con las células A172 en medio Opti-MEM™ y se incubaron a 37°C durante 4 h. Después se retiró el medio de transfección, se añadió medio DMEM con FBS al 10% con antibióticos (penicilina y estreptomina 100U/mL) y se volvieron a incubar en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37°C. A las 48 h después de la transfección, las células fueron lisadas con buffer TNTE al 0.5% y a partir del extracto total de proteínas se realizó una electroforesis SDS-PAGE y un WB para analizar los niveles de TRIM25. De esta manera, se obtuvieron células de GB sh-TRIM25 y células control.

6.10 Extracción RNA y Microarreglo de cDNA

Se utilizaron células de GB con los niveles de TRIM25 reducidos por efecto de un shRNA, así como las células parentales como control. Con estas dos condiciones, se realizó la extracción de RNA total mediante un kit (Direct-zol RNA Miniprep). La concentración y pureza de los extractos se evaluaron mediante espectrofometría, utilizando un Nano Drop (ND-1000). Se comprobó la integridad del RNA mediante electroforesis en un gel de agarosa. Utilizando el RNA total obtenido se llevó a cabo un ensayo de microarreglo de cDNA por la **Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM** (IFC-UNAM). Para esto, obtuvieron el cDNA e hibridaron las muestras con un chip de cáncer humano (HCan_06_05); la muestra control se marcó con Alexa555 y la muestra deficiente de TRIM25 (shTRIM25) con Alexa 647.

Los datos obtenidos de la cuantificación de imágenes del microarreglo de cDNA se analizaron con el software GenArise, se reportan los genes sobreexpresados (UP) y reprimidos (DOWN-regulated para dos cortes de Z-Score (1.5 y 2.0 desviaciones estándar), están expresados en función de la muestra shTRIM25 con respecto a la muestra control. Los resultados se analizaron bioinformáticamente empleando las bases de datos: David gene Ontology (<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>), GeneCards (<https://www.genecards.org/>) y ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/#tab-9561-5>).

7. Resultados

7.1 Análisis *in silico* de la expresión de TRIM25 en muestras de GB humano y en tejido de cerebro normal

TRIM25 se encuentra presente de manera ubicua en diferentes órganos del ser humano, así que con la finalidad de determinar la expresión en diferentes muestras derivadas de pacientes con tumores malignos con respecto a muestras sanas, revisamos bases de datos públicas con dicha información.

En la figura 9 se representa en un gráfico de cajas y bigotes, aquellos cánceres con una expresión diferencial (DE) de *TRIM25* con respecto a su tejido control, con una diferencia estadísticamente significativa, según la base de datos GEPIA2. De acuerdo a este análisis, el colangiocarcinoma (CHOL), el glioblastoma (GB), la leucemia mieloide aguda (LAML) y los gliomas de bajo grado (LGG) son los cánceres en donde *TRIM25* se encuentra sobreexpresado.

Por otro lado, la neoplasia linfocítica linfoma difuso de células B grandes (DLBC), el carcinoma corticosuprarrenal (ACC), el adenocarcinoma de pulmón (LUAD), el carcinoma de células escamosas de pulmón (LUSC), el timoma (THYM) y el carcinosarcoma uterino (UCS) presentan una expresión disminuida de *TRIM25* respecto al tejido no canceroso del mismo origen.

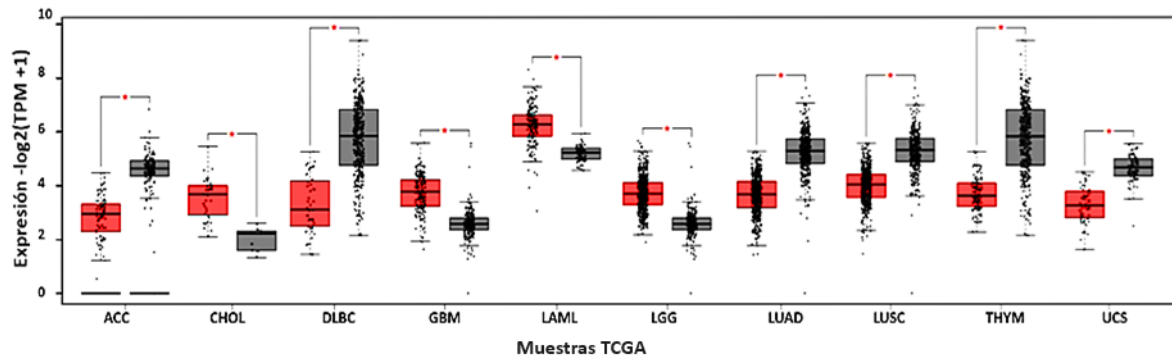


Figura 9. Desregulación de la expresión de *TRIM25* en diversos cánceres. Pan-cáncer de expresión diferencial de *TRIM25* obtenido de la base de datos GEPIA2 (www.gepia2.cancer-pku.cn consultada en enero de 2024). Las muestras tumorales se representan en cajas rojas y las muestras no tumorales en cajas grises. Los resultados de RNAm ($-\log_2(\text{TPM} + 1)$) se consideraron significativos cuando $p < 0.05$ (*). TPM= Transcripts Per Million.

Comparado con tejido normal adyacente, la expresión de *TRIM25*, según UALCAN, fue significativamente mayor en 8 tipos cánceres: incluyendo el carcinoma urotelial de vejiga (BLCA); colangiocarcinoma (CHOL); carcinoma de esófago (ESCA); glioblastoma (GB); carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSC); carcinoma renal de células claras de riñón (KIRC); carcinoma hepatocelular de hígado (LIHC) y adenocarcinoma de estómago (STAD). Además, la expresión de *TRIM25* se encontró disminuida en 7 cánceres: carcinoma invasivo de mama (BRCA); adenocarcinoma de colon (COAD); cromóforo renal (KICH);

adenocarcinoma de pulmón (LUAD); carcinoma de tiroides (THCA); timoma (THYM) y carcinoma endometrial del cuerpo uterino (UCEC) (Figura 10).

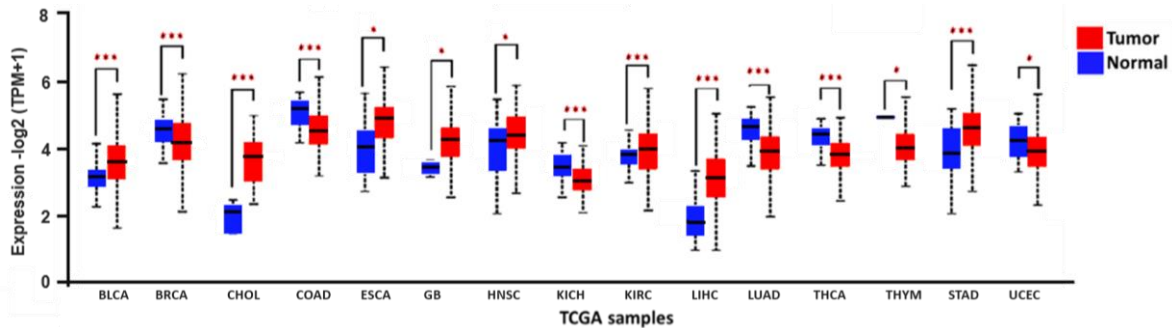


Figura 10. Desregulación de la expresión de *TRIM25* en diversos cánceres. Pan-cáncer de expresión diferencial de *TRIM25* obtenido de la base de datos UALCAN (<https://ualcan.path.uab.edu/analysis.html>). Las muestras tumorales se representan en una caja roja y las muestras no tumorales en caja azul. Los resultados de RNAm ($-\log_2(\text{TPM}+1)$) se consideraron significativos cuando $p < 0.05$ (*) y $p < 0.001$ (***). TPM= Transcripts Per Million.

Se busco en UALCAN cada uno de los 10 cánceres identificados en GEPIA2 que presentaban desregulación significativa de la expresión de *TRIM25* y se realizó una tabla comparativa de la información obtenida de cada base de datos (Tabla 4). Detectamos que mientras GEPIA2 nos proporciona un valor global de la expresión de *TRIM25* en muestras cancerosas respecto a su control, UALCAN nos brinda información de la expresión de *TRIM25* en distintas etapas de un mismo tipo de cáncer. Además, el número de muestras comparadas en GEPIA2 es mayor, que en UALCAN.

Tabla 4. Expresión de *TRIM25* en diferentes tipos de cáncer respecto a su tejido control.

Cáncer	Expresión de <i>TRIM25</i> tumor vs normal GEPIA	Expresión de <i>TRIM25</i> tumor vs normal UALCAN
ACC	Disminuida	No hay datos
CHOL	Incrementada	Sobreexpresión en estadio 4 con respecto al estadio 1
DLBC	Disminuida	No hay diferencia significativa entre las diferentes etapas
GB	Incrementada	Incrementada
LAML	Incrementada	M3 presenta expresión disminuída con respecto a las demás clasificaciones.
LGG	Incrementada	Sobreexpresión en LGG grado 3 respecto al grado 2
LUAD	Disminuida	Disminuída
LUSC	Disminuida	No hay diferencia significativa
THYM	Disminuida	Disminuída
UCS	Disminuida	Sobreexpresión en estadio 1 y 3 con respecto al estadio 4.

Datos obtenidos de la base de datos GEPIA2 con valor de $p < 0.01$ y datos de la base de datos UALCAN.

En la figura 11 se presentan los gráficos de cajas y bigotes de la expresión diferencial de *TRIM25* en GB obtenido de la base de datos GEPIA2 y a UALCAN.

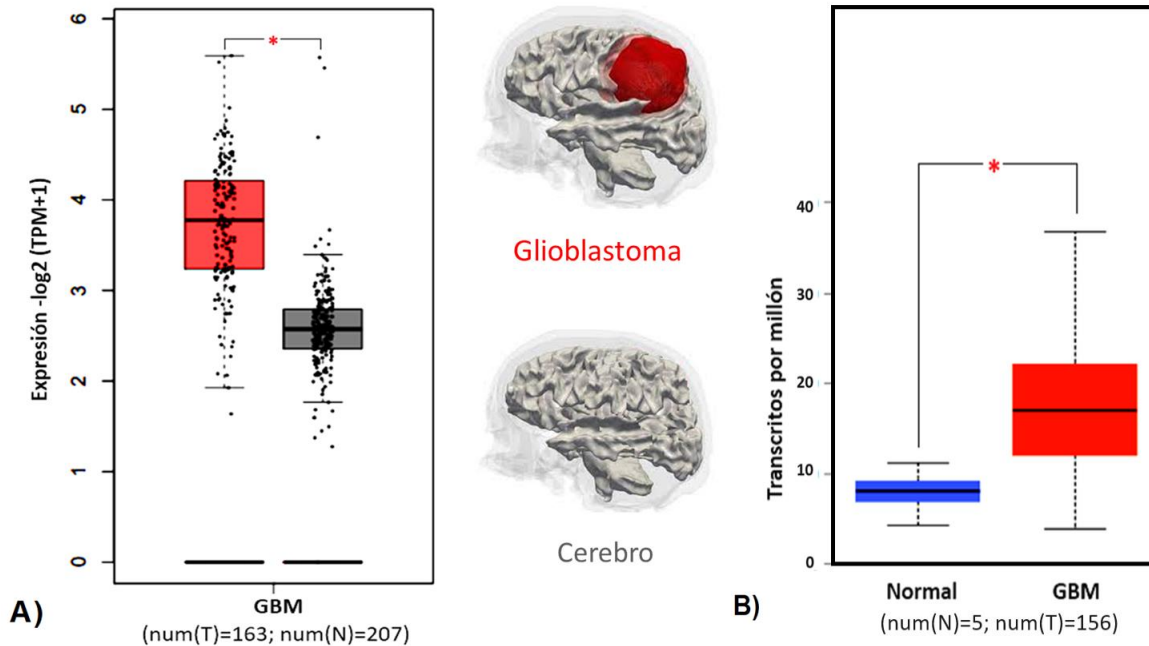


Figura 11. *TRIM25* se encuentra sobreexpresada en glioblastoma. Gráficos de cajas y bigotes de la expresión del RNAm de *TRIM25* en glioblastoma en comparación con tejido de cerebro sano obtenidas de A) GEPIA2 y B) UALCAN. La caja color rojo representa las muestras tumorales en ambas bases de datos. Las diferencias son estadísticamente significativas con una $p < 0.05$ (*).

Adicionalmente, se analizó la expresión génica de *TRIM25* en diferentes tumores cerebrales usando la base de datos *Oncopression*; cuyos datos provienen de microarrays públicos en *Gene Expression Omnibus* (GEO) y *ArrayExpress* (AE) de la plataforma *Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array*. Se observó que la expresión del RNAm de *TRIM25* se encuentra diferencialmente expresada en condiciones de cáncer, y que particularmente en el contexto del cáncer cerebral, su expresión es significativamente más elevada en tejido cerebral proveniente de pacientes con GB y otros gliomas de menor grado, en comparación con su expresión en tejido cerebral sano (Figura 12).

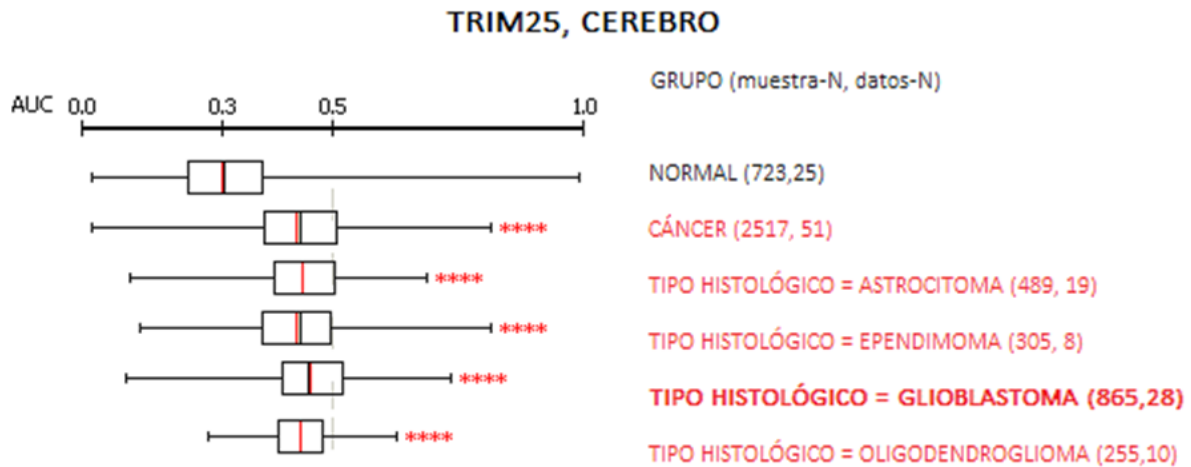


Figura 12. *TRIM25* se sobreexpresa en tumores del SNC. Gráfico de caja y bigotes obtenido de la base de datos Oncoexpression. Análisis de la expresión del RNAm de *TRIM25* en tumores de cerebro. El número de asteriscos significa significancia estadística de comparación con el grupo NORMAL. **** representa un valor de $p < 0,0001$ mediante la prueba t de Student. El valor de expresión génica normalizado por AUC oscila entre 0 y 1,0, donde 0,0 indica que no hay expresión y 1,0 la expresión más fuerte entre otros genes.

Análisis de supervivencia de pacientes

Con el fin de determinar si la expresión diferencial de *TRIM25* tenía un impacto en la supervivencia de los pacientes con GB. Se obtuvieron los gráficos de Kaplan-Maier (KM) para *TRIM25*, en la base de datos GENT2. Al analizar los gráficos proporcionados por dicha base de datos, se observó que la supervivencia de pacientes cuyo tejido tumoral era proveniente de un tumor grado cuatro era estadísticamente menor que la supervivencia de pacientes cuyo tejido tumoral correspondía a tumores cerebrales de menor grado (Figura 13A). En este sentido, cabe resaltar que el GB es un tumor cerebral de grado 4, el único de los tumores glioneuronales. Además, en el gráfico de Kaplan Meier proporcionado por la misma base de datos, se determinó que la supervivencia de pacientes cuyo tejido tumoral cerebral presentaba alta expresión de *TRIM25* es menor que la supervivencia de aquellos que presentaron baja expresión de *TRIM25* (Figura 13B).

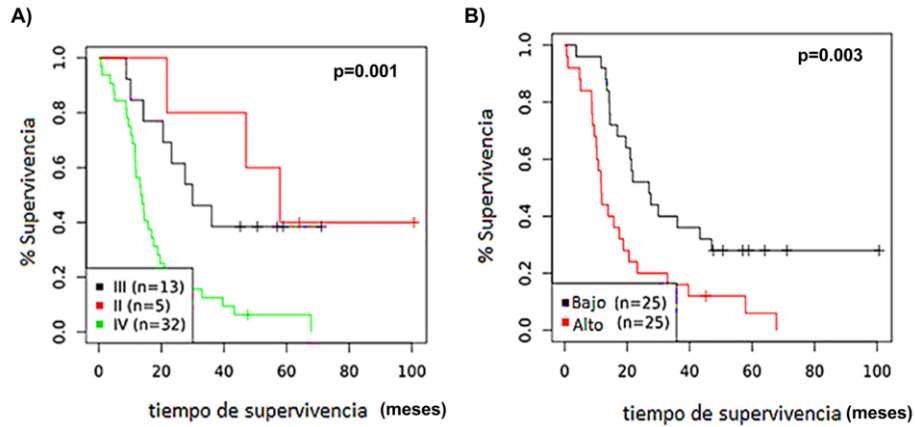


Figura 13. Análisis de supervivencia de los pacientes con glioblastoma usando la base de datos GENT2. A) La gráfica de Kaplan Meier muestra la supervivencia de los pacientes con tumores cerebrales de distintos grados. B) Gráfica de Kaplan Meier muestra la supervivencia de pacientes con tumores cerebrales con expresión alta y baja de TRIM25.

Análisis de correlación

La expresión génica, depende de múltiples factores, algunos de ellos pueden ser: la unión de proteínas al gen diana o a regiones reguladoras, la unión de RNA no codificantes, mutaciones, cambios epigenéticos o incluso la expresión de otros genes. Por esta razón, se realizó un análisis de correlación de la expresión de *TRIM25* con respecto a otros genes desregulados en GB en UALCAN. Considerando que la correlación está determinada por el coeficiente de correlación de Pearson, se seleccionaron los genes que presentaban mayor correlación, considerando valores de coeficiente de Pearson entre 0,50 y 1,00. De manera, que una correlación positiva se indica en números positivos y una correlación negativa en números negativos (Tabla 5).

Tabla 5. Genes que correlacionan negativamente y positivamente con TRIM25 en glioblastoma. Análisis realizado mediante la base de datos UALCAN.

Correlación positiva	Correlación negativa
<i>ZC3HAV1</i>	
<i>ADAR</i>	<i>COX7A2</i>
<i>EIF2AK2</i> o <i>PKR</i>	<i>RBX1</i>
<i>ZNFX1</i>	<i>RPL27</i>
<i>TRIM14</i>	<i>RPS15A</i>
<i>PARP14</i>	
<i>DTX3L</i>	

El gen *ZC3HAV1*, es el gen que presentó mayor correlación con la expresión de *TRIM25* en glioblastoma. La proteína codificada por dicho gen, también conocido como ZAP, está involucrada ampliamente en la inhibición de la replicación viral. Recluta la maquinaria necesaria para degradar los RNA virales. En este sentido, se sabe que *TRIM25* es necesario para que ZAP pueda llevar a cabo sus funciones antivirales, además de estabilizar el complejo proteína-RNA formado (Zheng *et al.*, 2017).

Por otro lado, el gen *COX7A2*, fue aquel que presentó mayor correlación negativa con la expresión de *TRIM25* en glioblastoma. Aunque la interacción entre *TRIM25* y *COX7A2* no ha sido comprobada. Shengze Deng y colaboradores, identificaron que la sobreexpresión de *COX7A2* se asocia con un mejor pronóstico en pacientes con gliomas (Deng *et al.*, 2018).

Retomando, que la proteína codificada por *TRIM25*, es una de las enzimas E3 ligasa de ISG15 involucrada en una modificación postraducciona llamada ISGilación (Zou and Zhang, 2006). Se exploró el perfil de expresión diferencial entre los genes que codifican para las otras enzimas E3 ligasas involucradas en el proceso de ISGilación: *HERC5* y *HHRAI*, e *ISG15*, en el contexto de GB. Se realizó un análisis por mapa de calor usando los datos de GEPIA, y como se puede observar en la Figura 14A, en general, las tres enzimas, hasta ahora descritas como E3 ligasas de

ISG15, se encuentran sobreexpresadas en GB, en comparación con la condición normal. Además, de acuerdo a los gráficos de correlación entre la expresión de *TRIM25* con respecto a *HERC5*, *HHRAI* e *ISG15*, obtenidos de esta misma base de datos, existe una correlación positiva entre la expresión de *TRIM25*, *HERC5*, *HHRAI* e *ISG15*. Se identificó un coeficiente de correlación de 0.71 entre la expresión de *TRIM25* y *HERC5*, destacando una mayor correlación con respecto a *HHRAI* e *ISG15*, cuyo coeficiente de correlación corresponde a 0.50 y 0.44, respectivamente (Figura 14B).

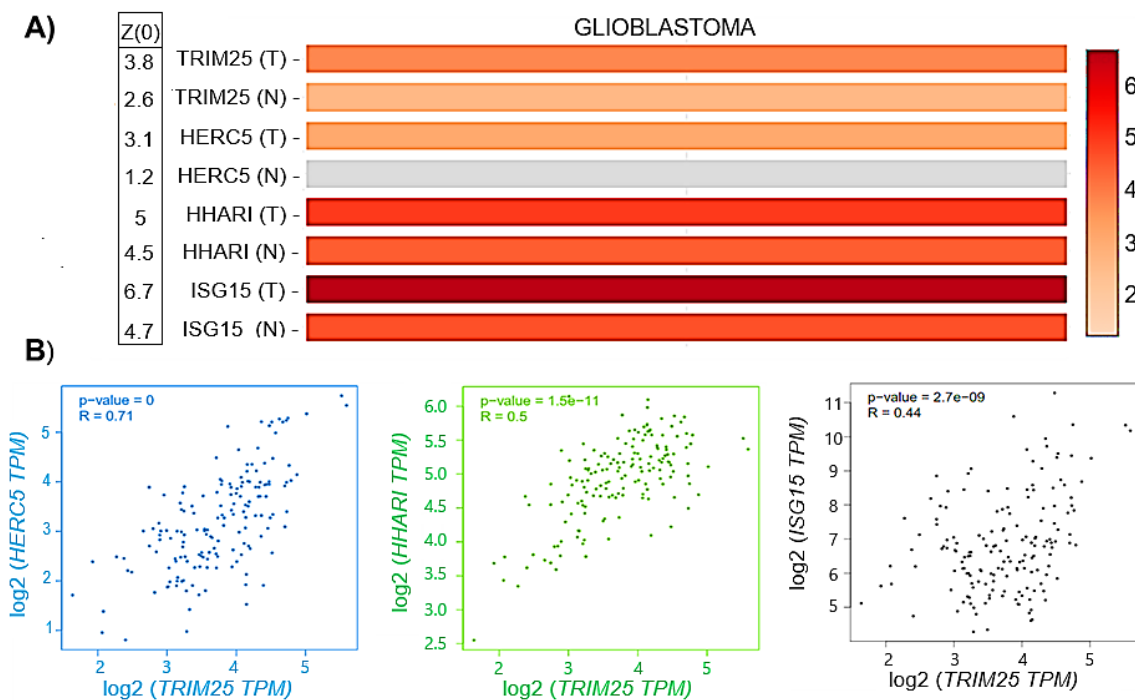


Figura 14. Expresión de E3 ligasas de ISG15 en glioblastoma. **A)** Mapa de calor que representa los niveles de expresión diferencial de genes que codifican para las enzimas E3 ligasa de ISG15 en pacientes con glioblastoma y en individuos sanos con datos del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) y el proyecto Genotipo-Expresión Tisular (GTEx) de la base de datos GEPIA. **B)** Gráficos de correlación de la expresión de *TRIM25* con *HERC5*, *HHAR1* e *ISG15*.

Los niveles de expresión de *TRIM25* se encuentran incrementados en pacientes con glioblastoma y se asocian con un tiempo de supervivencia menor en los pacientes con dicho cáncer. Así mismo, se identificó que la expresión del RNAm de *TRIM25*

correlaciona con la expresión de las enzimas E3-ligasas de ISG15 en muestras de GB.

7.2 Evaluación de los niveles de la proteína TRIM25 en muestras de glioblastoma y en tejido de cerebro saludable.

Debido a los mecanismos de regulación postranscripcional que puede sufrir el transcrito de TRIM25 (Dome *et al.*, 2022) y a las modificaciones postraduccionales a las que se ve sometida una proteína (Ramazi & Zahiri, 2021), no es posible concluir que los altos niveles de expresión de un RNAm siempre resulten en altos niveles de la proteína codificada; por ésta razón, se realizó la detección de la proteína TRIM25 mediante la técnica de inmunohistoquímica en un microarreglo de tejido humano comercial (GL806 Brain glioblastoma, TissueArray), con 40 muestras por duplicado, 35 derivadas de pacientes con GB y 5 de tejido cerebral sano.

La concentración del anticuerpo anti-TRIM25 requerida para la detección de la proteína en el tejido, se estandarizó empleando diversos tejidos que presentaran diferente inmunexpresión de TRIM25. Para esto, se consultó la base de datos del atlas de proteínas humanas y se identificó que en tejido cerebral sano la detección de la proteína TRIM25 es indetectable o muy baja, mientras que, en tejido derivado de colon, es alta. Adicionalmente, se trabajó con un tejido canceroso proveniente de melanoma, el cuál presenta inmunoreactividad moderada contra TRIM25 (Figura 15).

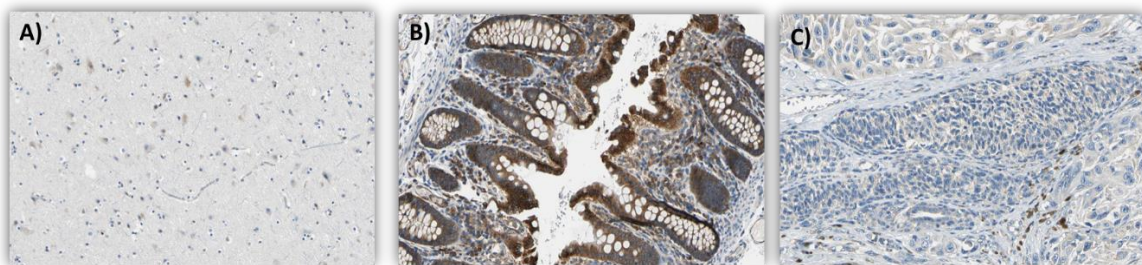


Figura 15. Niveles de expresión de TRIM25 en tejidos. Inmunohistoquímica de la proteína TRIM25 en tejido cerebral sano (A), en tejido derivado de colon (B) y en tejido canceroso de melanoma (C).

Imágenes obtenidas de The human protein atlas 2023.

Los resultados de la estandarización (Figura 16), demostraron que el anticuerpo es específico para la detección de la proteína TRIM25, y, además, se determinó la dilución de anticuerpo a emplear (1:350), considerando dos criterios inversamente proporcionales: el primero, que las marcas de inmunodetección de TRIM25 estuvieran asociadas a las células de interés, dada por la especificidad del anticuerpo, y el segundo, menos marcas inespecíficas. Así mismo, se evitó tomar fotografías en los perímetros de la muestra, pues esto podría dar interpretaciones erróneas debido a que en esta zona tiende a acumularse la tinción y por lo tanto dar señales inespecíficas.

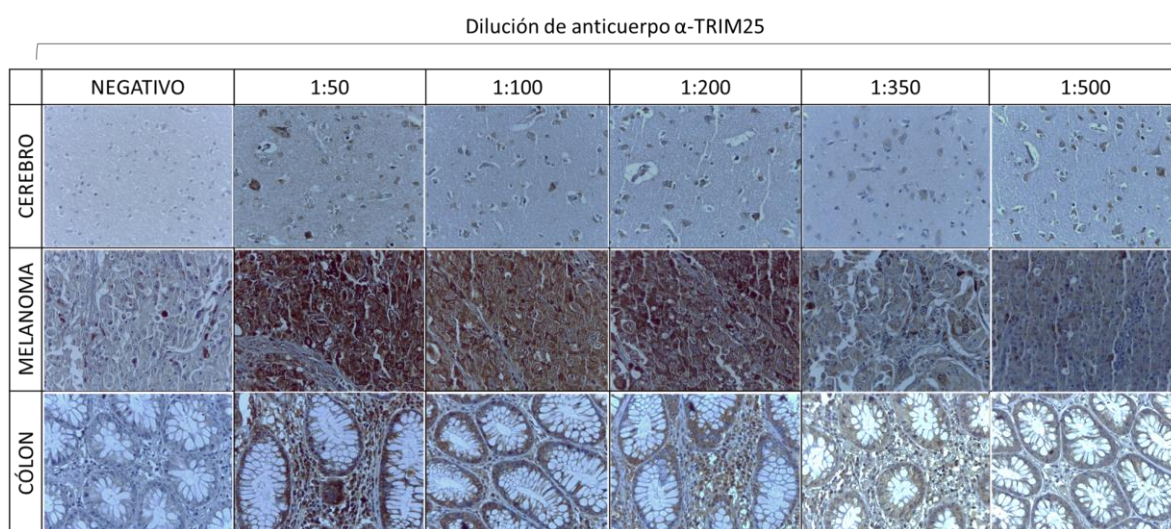


Figura 16. Estandarización de la técnica de Inmunohistoquímica de la proteína TRIM25 en cerebro, melanoma y colon, en concentración 1:50, 1:100, 1:200, 1:350 y 1:500.

Una vez determinada la concentración de anticuerpo, se realizó el experimento de acuerdo a la metodología previamente reportada (Correa-Arzate *et al.*, 2023), empleando el microarreglo de tejido derivado de GB. Se observaron los tejidos en el microscopio LEICA y se tomaron fotografías en 3 campos distintos de cada uno de los spots.

El análisis de las imágenes se realizó en el software ImageJ tomando en cuenta los criterios empleados en la estandarización. Es decir, que la señal café correspondiente a la inmunodetección contra TRIM25 con DAB estuviera en células de interés y no en espacios sin núcleo teñido con hematoxilina (color azul). Otro

aspecto que se consideró, fue que la cantidad de células analizadas en las muestras de tejido control, fueran las mismas que en las analizadas en las muestras de GB. En este contexto, se señalaron las marcas de DAB en 70 células y se midió la intensidad de detección del paso de la luz en pixeles de cada una de ellas. Para determinar el número de unidades ópticas se utilizó la herramienta multipunto del software Image J 1.54D, y los resultados se calibraron mediante la fórmula $x = (y - b) / m$, donde “x” fue el nivel de inmunopresión y “y” la intensidad de señal en unidades ópticas. Luego se categorizó la expresión como tinción débil, moderada o intensa (De Matos *et al.*, 2006). Marcas más intensas arrojaron una intensidad de detección menor, esto corresponde a una inmunoposividad mayor contra TRIM25, es decir, más abundancia de TRIM25 en la muestra. De igual manera, se estableció una escala arbitraria de nivel de inmunodetección. De acuerdo al porcentaje de células y la intensidad de señal, se consideraron niveles de 0 a 3. El nivel cero corresponde a no detección; el 1 a intensidad leve con menos del 10% de células marcada; nivel 2 a intensidad moderada con el 11% al 50% de células positivas y nivel 3 a una señal intensa de detección con más del 50% de células marcadas (Figura 17).

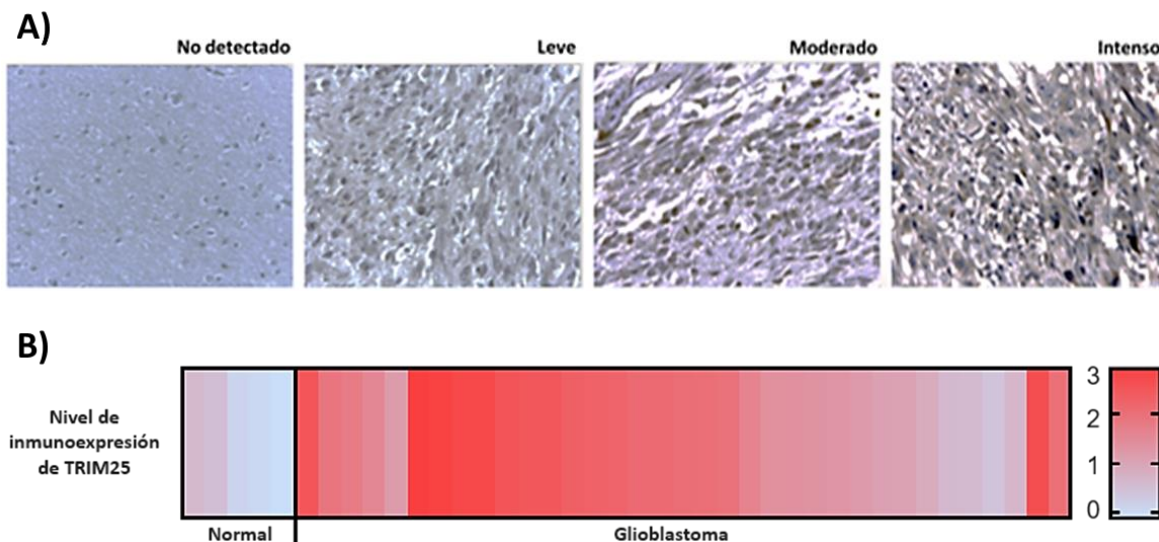


Figura 17. Niveles de inmunopresión de TRIM25 en muestras de tejido cerebral sano y glioblastoma. A) Imágenes de inmunohistoquímicas representativas de los niveles de inmunopresión de las muestras analizadas en el TMA. De izquierda a derecha: No detectada, leve, moderada e intensa. B) Mapa de calor del nivel de inmunopresión de TRIM25 establecido semicuantitativamente para cada muestra en el microarreglo.

Para el análisis de los resultados de las imágenes obtenidas de muestras con tinciones inmunohistoquímicas es necesario precisar que el color de la imagen no refleja la concentración del químico (hematoxilina, eosina, DAB, etc.) que origina el color, pues la velocidad de reacción es distinta de acuerdo a la presencia y localización del antígeno (Campa Fernández, 2017). Así mismo el DAB, cromóforo empleado para la reacción de revelado de la interacción antígeno-anticuerpo, no sigue la ley de Lambert Beer y por lo tanto la relación entre absorción y la concentración del mismo no es lineal, de manera que su tono varía dependiendo de su concentración. A todo esto, los datos que se obtuvieron del análisis de estas imágenes son semicuantitativos.

En general, los casos de GB mostraron niveles de inmunexpresión contra TRIM25 entre 2 y 3, que corresponden a niveles de moderado a intenso, mientras, que las muestras de tejido de cerebro sano presentan niveles bajos (nivel 1) de TRIM25, o bien, sus niveles no se detectan mediante la técnica empleada (nivel 0). En otras palabras, se detectó mayor inmunexpresión de TRIM25 en las muestras de tejido de pacientes con GB que en muestras de tejido cerebral sano, como se observa en la figura 18.

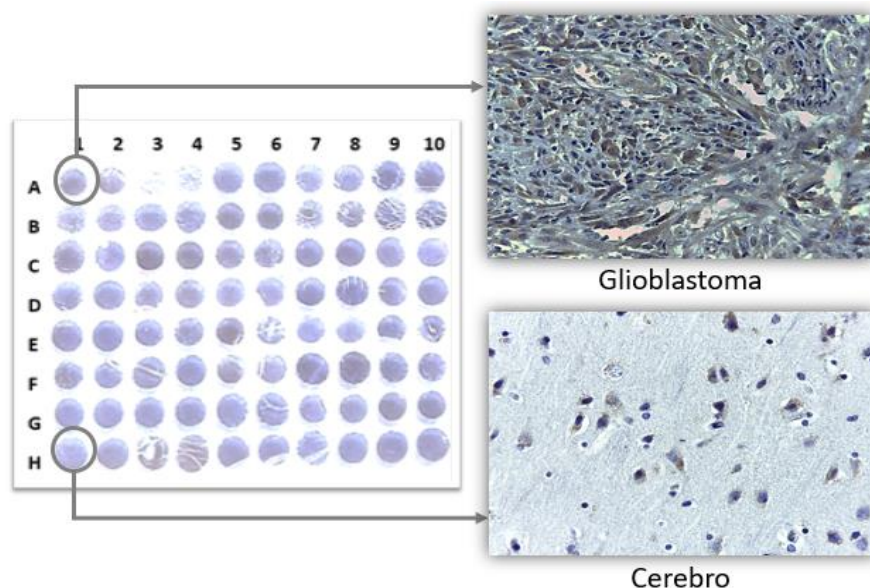


Figura 18. Detección de la proteína TRIM25 en el TMA de GB. Inmunohistoquímica de tejidos de cerebro sano y de glioblastoma. Se muestra un acercamiento zoom de una muestra representativa de glioblastoma y una de tejido de cerebro sano.

Con los datos clínicos de cada paciente se realizó un análisis estadístico para determinar la correlación entre los mismos y con la expresión de TRIM25 en las muestras de GB y no se encontró asociación estadísticamente significativa entre el sexo, edad, localización anatómica del tumor o clasificación histológica del tejido tumoral (Figura 19).

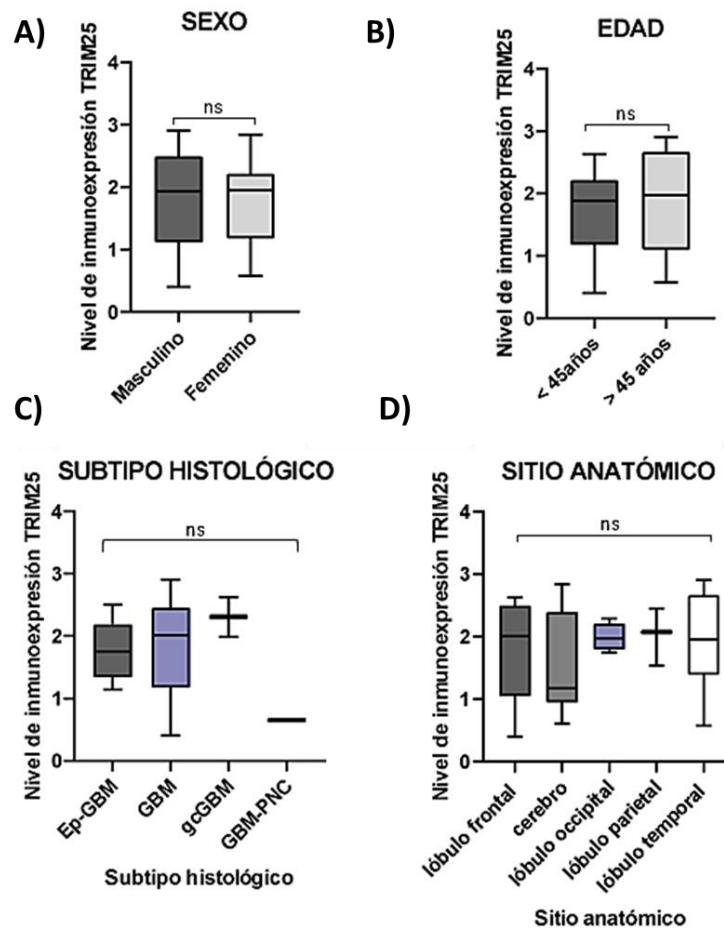


Figura 19. Correlación del nivel de inmunoexpresión de TRIM25 con los datos clínicos de las muestras en el TMA de GB. Gráficos de barras de la inmunodetección de TRIM25 de acuerdo a: A) sexo, B) edad, C) clasificación histológica y D) sitio anatómico.

Aunado a dicho análisis, se determinó que los niveles de inmunoexpresión de TRIM25 en tejido cerebral sano es menor que en muestras de GB, en donde los niveles de inmunoexpresión de TRIM25 en los pacientes van desde bajos, moderados y altos, predominando los niveles moderados y altos (Figura 20).

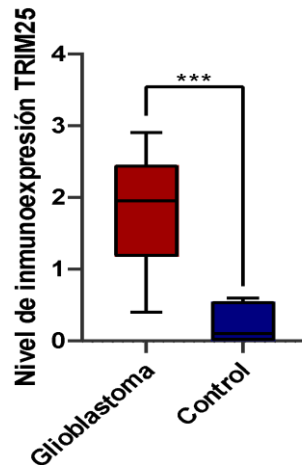


Figura 20. Nivel de inmunoeexpresión de TRIM25 en GB. Gráfico de nivel de inmunoeexpresión de TRIM25 entre glioblastoma y tejido cerebral normal. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0.001$ (***).

Adicionalmente, se realizó un análisis bioinformático para determinar los niveles de la proteína TRIM25 en diversos tipos de cáncer, incluyendo el GB, y como se puede observar en la Figura 21, los niveles de TRIM25 se encuentran incrementados de manera significativa ($p < 0.001$) en muestras de GB y en varios tipos de cáncer en relación a los niveles de su respectivo tejido control.

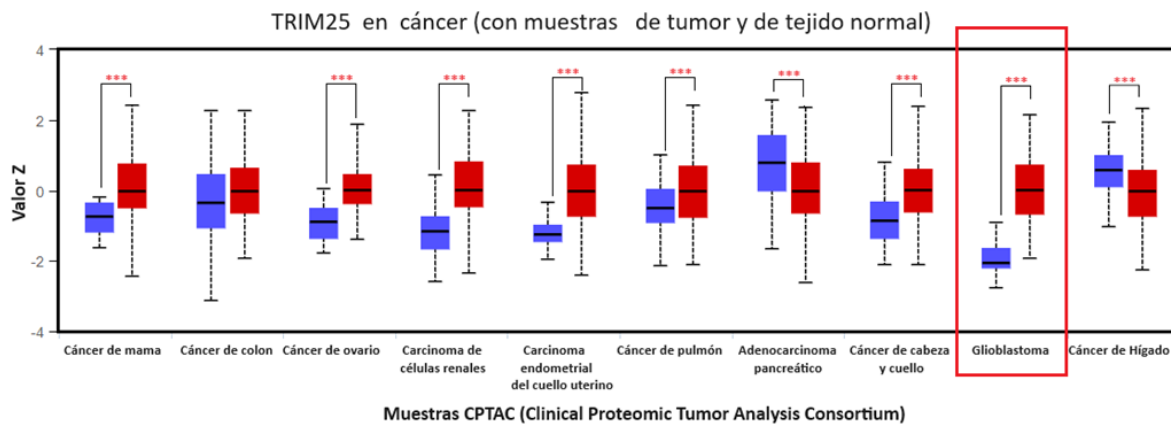


Figura 21. Niveles de proteína TRIM25 en diferentes cánceres de la base de datos UALCAN. Páncancer del nivel de proteína TRIM25 en diferentes tipos de cáncer (caja roja) y muestras de tejido normal (caja azul), obtenida de la base de datos UALCAN. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0.001$ (***). Valor Z = Valor que representa las desviaciones estándar de la mediana entre muestras para un tipo de cáncer determinado.

Estos análisis en muestras de tejido derivado de pacientes, nos permiten identificar que las muestras de GB presentan mayores niveles de proteína TRIM25 con respecto a las muestras de tejido cerebral sano.

7.3 Evaluación de los niveles y localización subcelular de TRIM25 en líneas celulares derivadas de pacientes con glioblastoma.

Considerando que los niveles de expresión y de proteína TRIM25 se encuentran elevados en muestras de pacientes y para determinar el efecto funcional que tiene en la célula. Fue necesario evaluar los niveles de TRIM25 en líneas celulares derivadas de GB e identificar la localización subcelular de dicha proteína, pues la función de una proteína está determinada en gran parte por su localización en la célula.

Para conocer los niveles de TRIM25 en las líneas celulares derivadas de GB, se utilizó la base de datos CCLE (Figura 22A). Además, mediante el uso de la herramienta de *Deapmap interactive* de dicha base de datos, se pudo realizar la relación entre los niveles de RNAm y proteína de TRIM25 en las distintas líneas celulares derivadas de glioblastoma (Figura 22B).

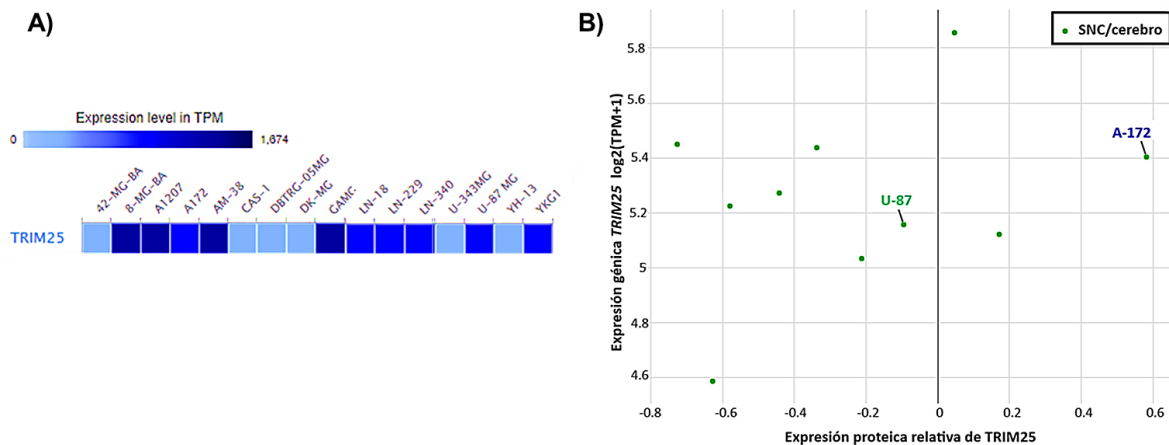


Figura 22.- Análisis *in silico* de la expresión y abundancia de TRIM25 en líneas celulares derivadas de GB. A) Niveles de expresión de *TRIM25* en líneas celulares obtenidos de la base de datos CCLE. B) Gráfica de los niveles de ARNm (eje X) y proteína (eje Y) de TRIM25 en las líneas celulares de glioblastoma disponibles en la base de datos CCLE utilizando la herramienta de *deapmap interactive* de la misma base de datos.

Con los resultados del análisis *in silico* de los niveles de TRIM25 RNAm y proteína, las líneas celulares derivadas de GB A-172 y la U-87 presentaron mayor relación expresión génica/abundancia proteica. De acuerdo a información obtenida de ATCC (del inglés “*American Type Culture Collection*”), la línea celular A-172 se aisló del tejido cerebral de un paciente masculino de 53 años con GB, con delección homocigota en c.1_471del471 de *CDKN2A* y c.165_1212del1048 de *PTEN*. Por otro lado, U-87 es una línea celular con morfología epitelial que se aisló de gliomas malignos de un paciente masculino, probablemente con GB, con delección homocigota de c.1_471del471 de *CDKN2A*, c.209+1G>T de *PTEN* y c.1_507del507 de *CDKN2C*. Dichas líneas celulares fueron empleadas para el análisis de distribución celular de TRIM25 (Figura 23).

Adicionalmente, se empleó la línea celular U-373, que de acuerdo a su secuencia, es idéntica a la línea celular U-251 (Ishii *et al.*, 1999). Es derivada de un tumor de GB maligno mediante técnica de explante, es decir, se extrajo un fragmento de un tejido de un ser vivo para cultivarlo en medio artificial y contiene una mutación en *PTEN* y una delección en *p16*.

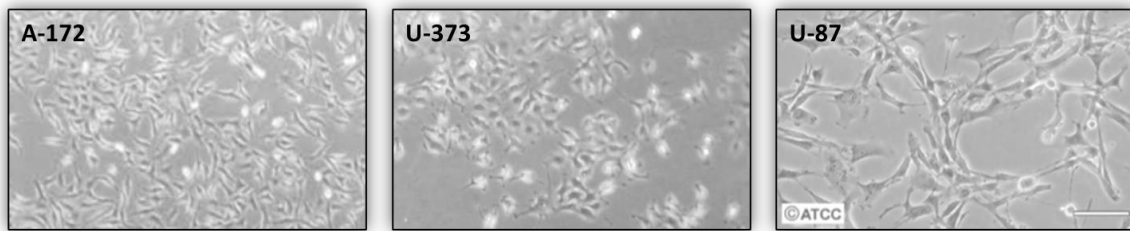


Figura 23.- Líneas celulares derivadas de glioblastoma empleadas para el análisis de localización subcelular. De derecha a izquierda: A-172, U-373 y U-87. La imagen de la U-87 fue tomada de ATCC.

Separando la fracción citoplasmática y nuclear de cultivos en monocapa de las líneas celulares A-172, U-373 y U-87, se detectó a la proteína TRIM25 en mayor abundancia en la fracción nuclear de cada una de las líneas celulares evaluadas (Figura 24).

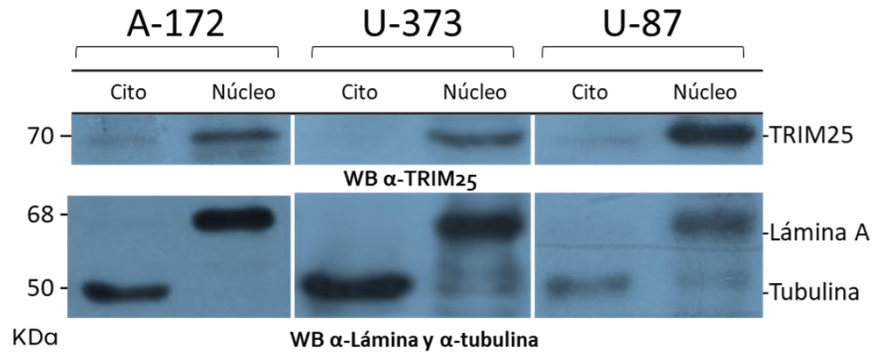


Figura 24. Localización subcelular de la proteína TRIM25. Los extractos nucleares y citoplasmáticos de las líneas celulares: A-172, U-373 y U-87 se separaron en un gel de SDS-PAGE y se analizaron por WB. Tubulina fue usada como control de carga para la fracción citoplasmática y lámina A para la fracción nuclear.

Adicionalmente, mediante un análisis de predicción de la localización de TRIM25 en la base de datos PSORT II, se determinó que TRIM25 puede tener una distribución principalmente nuclear, y en menor proporción en citoplasma, mitocondria, aparato de golgi y en vacuolas (Figura 25).

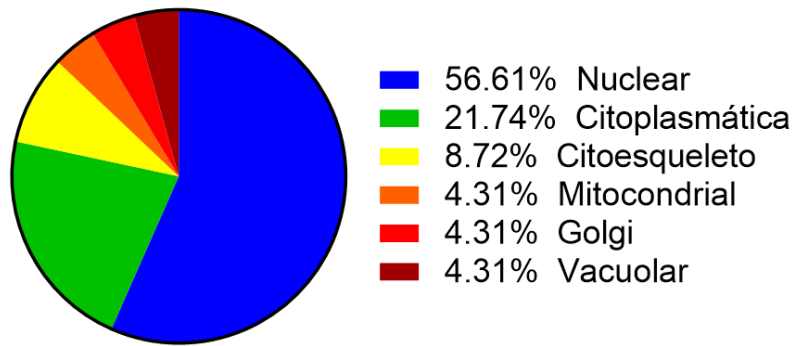


Figura 25. Predicción de la localización subcelular de TRIM25. Se usó la base de datos PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>).

Derivado de estos análisis, identificamos que TRIM25 se encuentra localizada mayoritariamente en núcleo y en menor proporción en otros compartimentos extra nucleares.

7.4 Determinación del efecto de la deficiencia de *TRIM25* sobre el perfil de ISGilación y la expresión de genes asociados a cáncer en células de glioblastoma.

Con base en los resultados anteriormente expuestos y a los antecedentes revisados, se sabe que TRIM25 se encuentra incrementada en células de GB y que además lleva a cabo la función de E3 ligasa de ISG15 en la ISGilación que, de manera interesante, también se ha visto incrementada en muestras de GB y que correlaciona con un menor tiempo de sobrevivencia de pacientes con este tipo de tumores.

Con el objetivo de evaluar la importancia funcional de TRIM25, se recurrió a la estrategia de transfección de un RNA interferente en células A-172, para generar la reducción de los niveles de TRIM25. Se empleó la concentración sugerida por el fabricante de un siRNA dirigido contra TRIM25 (Figura 26A); sin embargo, al notar que el efecto del siRNA no ocasionaba una reducción estadísticamente significativa de los niveles de TRIM25, se emplearon 2 concentraciones distintas, una mayor y una menor con la finalidad de obtener un mejor resultado (Figura 26B). Los resultados no fueron satisfactorios, por lo que se recurrió a la estrategia de la transfección de un shRNA contra TRIM25 (*pSuperRetro-EFP siRNA2* de Addgene), se empleó la concentración previamente estandarizada por el equipo de trabajo y se obtuvo una disminución de la abundancia de TRIM25 estadísticamente significativa con una $p < 0.5$ (Figura 27).

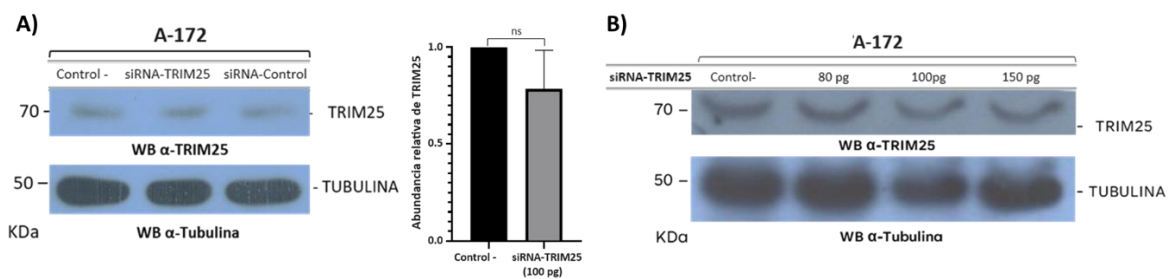


Figura 26. Niveles de proteína TRIM25 en células A-172 transfectadas con el siRNA-TRIM25. Imágenes de Western blot contra TRIM25 y respectivo análisis de densitometría de la transfección de células A-172 con A) 100 pg de siRNA-TRIM25, B) 3 concentraciones diferentes de siRNA-TRIM25. ns= no hay diferencia estadísticamente significativa.

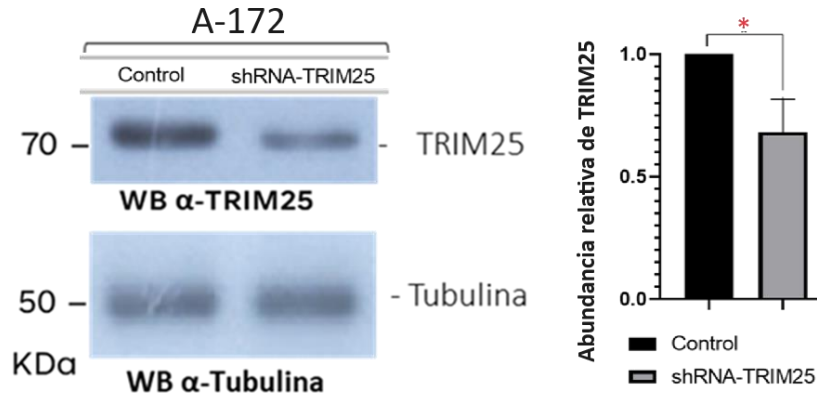


Figura 27. Niveles de proteína TRIM25 en células A-172 transfectadas con el shRNA-TRIM25. Imágenes de Western blot contra TRIM25 y respectivo análisis de densitometría. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0.05$ (*).

Una vez obtenidos bajos niveles proteicos de TRIM25, se emplearon dos grupos de células A-172; uno de células deficientes de TRIM25 y las células parentales como control, para evaluar el efecto de la reducción de los niveles de TRIM25 sobre el perfil de ISGilación. Los resultados indican que la reducción de TRIM25 se asocia con un incremento en los niveles de ISG15 libre (Figura 28).

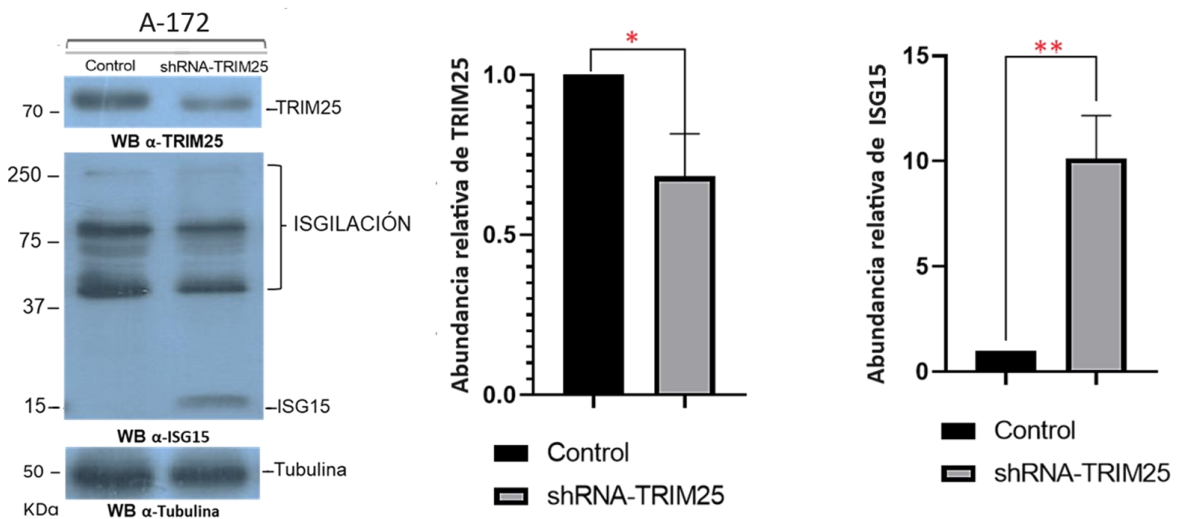


Figura 28. Efecto del silenciamiento de ISG15 en células A-172. Detección de ISG15 en células A-172 tratadas con un shRNA dirigido contra TRIM25 y en células parentales como control. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0.05$ (*) y $p < 0.01$ (**).

Dado que TRIM25 tiene dominios relacionados con la capacidad de unirse a DNA y a RNA, con implicaciones en la regulación transcripcional y postranscripcional, y considerando nuestros análisis de localización subcelular que demuestran que TRIM25 se encuentra distribuido especialmente en núcleo. Se evaluó si la reducción de la abundancia de TRIM25 en células de GB afecta la expresión de genes asociados al cáncer mediante un microarreglo de cDNA que contenía 1920 genes asociados al cáncer. Para ello, se extrajo el RNA de células A-172 transfectadas con el shRNA contra *TRIM25*, y se envió a la unidad de microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

De los resultados, se seleccionaron aquellos genes desregulados tras la reducción de los niveles de TRIM25 en GB con un Z-score mayor a 1.5 desviaciones estándar y un fold change >1 para estudiar los cambios en la expresión génica de genes involucrados en cáncer en GB.

Los genes expresados diferencialmente (DEG, por su denominación en inglés *differentially expressed genes*) en las células de GB con niveles reducidos de TRIM25 fueron 245. La expresión de 98 de ellos, disminuyó ante la reducción de TRIM25 (genes DOWN-regulated). Mientras que 147 de los genes analizados se sobreexpresaron en células derivadas de GB tratadas con el shTRIM25 (genes UP) (Anexo 1 y 2).

Los cinco genes con mayor Z-score y fold change cuya expresión disminuyó (Tabla 6) cuando la abundancia de TRIM25 se redujo en células de GB fueron: *TFG* (del inglés "*TRK-fused gene*"), éste gen participa en reordenamientos oncogénicos que pueden desempeñar un papel importante en la vía NF-kappaB, codifica para la proteína de tráfico desde ER al regulador de Golgi que se ha asociado a diferentes neuropatías; *SMARCB1* (del inglés "*SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1*"), codifica para una proteína que forma parte de un complejo que libera la represión de la cromatina, mutaciones en este gen se han asociado con el desarrollo de tumores rabdoides malignos; *TNFRSF14* (del inglés "*TNF receptor superfamily member 14*") codifica para una proteína involucrada en vías de transducción de señales que activan la respuesta inmune inflamatoria de las células T; *IFI27L2* (del inglés "*interferon alpha*

inducible protein 27 like 2”) da origen a una proteína ampliamente involucrada con procesos apoptóticos y *DAP3* (del inglés “*death associated protein 3*”) es un gen nuclear que da origen a una proteína ribosómica mitocondrial de la subunidad 28S que también participa en las vías apoptóticas iniciadas por el factor de necrosis tumoral alfa, el ligando Fas y el interferón gamma (GeneCards, 2024).

Tabla 6. Lista de 5 genes con expresión disminuida (genes DOWN-regulated) ante la reducción de los niveles de TRIM25 en células A-172 derivadas de un paciente con glioblastoma con mayor Z-score y Fold change.

Símbolo del gen (Genebank)	Nombre del gen	Z-score	Fold change
<i>TFG</i>	Trafficking from ER to golgi regulator	-3.48	-1.70
<i>SMARCB1</i>	SWI/SNF related, matrix associated, actin - dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1	-2.87	-1.51
<i>TNFRSF14</i>	TNF receptor superfamily member 14	-2.79	-1.55
<i>IFI27L2</i>	Interferon alpha inducible protein 27 like 2	-2.58	-1.54
<i>DAP3</i>	Death associated protein 3	-2.52	-1.46

Por otro lado, los cinco genes con mayor Z-score y fold change cuya expresión aumentó (Tabla 7) cuando la abundancia de TRIM25 se vió reducida en células de GB fueron: *MPO* (del inglés “*myeloperoxidase*”) es el gen responsable de la síntesis de la proteína mieloperoxidasa, una importante enzima que cataliza la conversión de peróxido de hidrogeno y cloruro a ácido hipocloroso, una potente especie reactiva de oxígeno involucrada en la actividad inmune de los neutrófilos y que se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer; *NCK1* (del inglés “*NCK adaptor protein 1*”), su proteína codificada es una de las proteínas de señalización y transformación que contienen los dominios de homología Src 2 y 3 (SH2 y SH3), es una proteína adaptadora involucrada en la transducción de señales desde los receptores tirosin-quinasa a señales de

receptores rio abajo como RAS; *EIF3E* (del inglés “*eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E*”) codifica para una proteína que contribuye a la actividad del factor de iniciación de la traducción y está implicado en la regulación positiva de la actividad de unión al ARNm y la regulación de la expresión génica; *DCT* (del inglés “*dopachrome tautomerase*”) es el responsable de codificar para la dopacromo tautomerasa que desarrolla un papel importante en la biosíntesis de melanina y *PTCH2* (del inglés “*patched 2*”) que codifica para un receptor transmembranal de la familia de genes patched, ha sido descrita como posible supresor de tumores en la vía de señalización de hedgehog (GeneCards, 2024).

Tabla 7. Lista de 5 genes con expresión incrementada (genes UP-regulated) ante la reducción de los niveles de TRIM25 en células A-172 derivadas de un paciente con glioblastoma con mayor Z-score y Fold change.

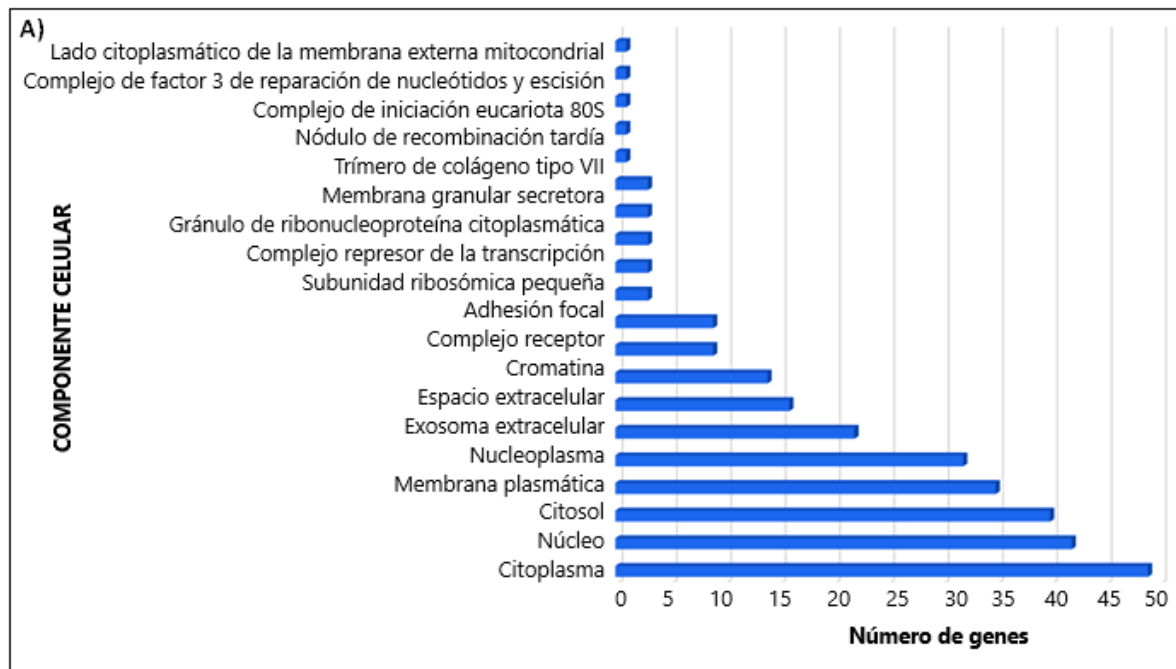
Símbolo del gen (Genebank)	Nombre del gen	Z-score	Fold change
<i>MPO</i>	Myeloperoxidase	3.55	1.60
<i>NCK1</i>	NCK adaptor protein 1	3.07	1.59
<i>EIF3E</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	3.02	1.61
<i>DCT</i>	Dopachrome tautomerase	2.84	1.60
<i>PTCH2</i>	Patched 2	2.59	1.68

Análisis de ontología génica. Empleando la base de datos *GeneCards* se realizó un análisis de ontología génica. Dicha base de datos nos permitió realizar un análisis basado en tres ontologías: función molecular, proceso biológico y componente celular. Respecto a los 98 genes DOWN-regulated en células A-172 con niveles de TRIM25 reducidos, el gen *SFFV* no fue identificado por GeneCards.

El componente celular, que mayor número de genes DOWN-regulated alberga, es el citoplasma, en segundo lugar, el núcleo (Figura 29A). Considerando el mayor número de genes y el mejor “matching score”, la ontología de procesos biológicos

(Figura 29B), que destacó fue la de “Regulación positiva de la transcripción por la ARN polimerasa II”, seguida de “La regulación positiva y negativa de la proliferación celular”. Finalmente, la función molecular (Figura 29C), más sobresaliente, fue la función de “unión de proteína” y la de “unión a DNA (Ver Anexo 3).

El algoritmo LifeMap identificó 13 genes abundantes y 34 genes hospederos que disminuyeron su expresión cuando los niveles de TRIM25 se vieron reducidos en en células A-172.



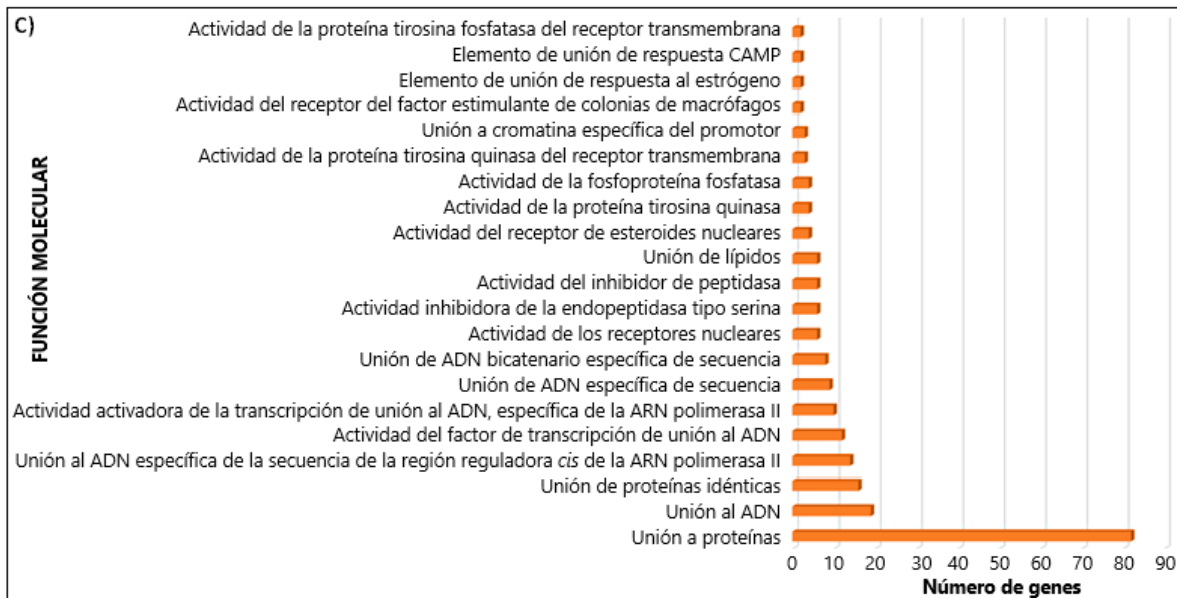


Figura 29. Análisis ontológico de los genes DOWN-regulated en células de glioblastoma A-172 con niveles reducidos de TRIM25. A) Componente celular B) Proceso biológico y C) Función molecular. Análisis realizado en la base de datos GeneCards (<https://www.genecards.org/>).

Los genes DOWN-regulated, cuya expresión disminuyó ante la reducción de TRIM25 en células de GB, representativos en las tres categorías de ontología génica mayormente enriquecidas fueron: *APP*, *GLI2*, *NDN*, *NR2C2* y *RXRA* (Figura 30).

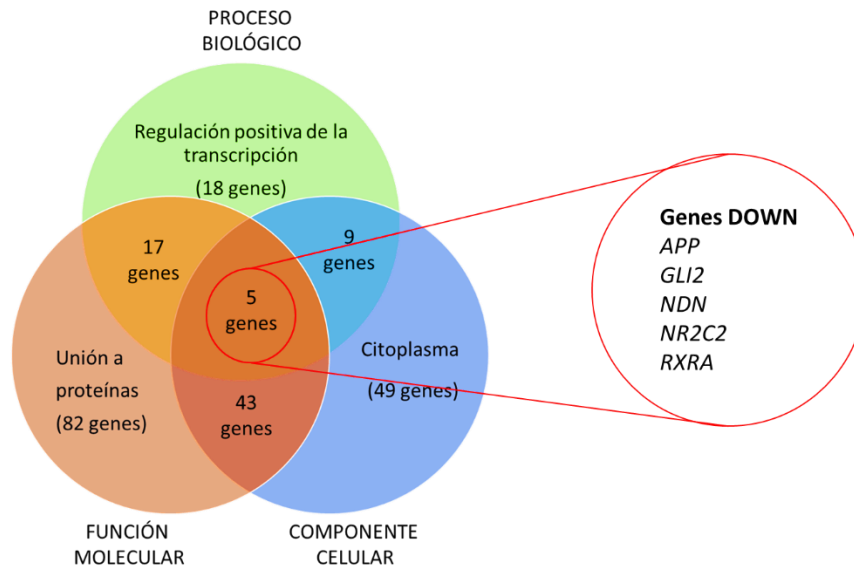


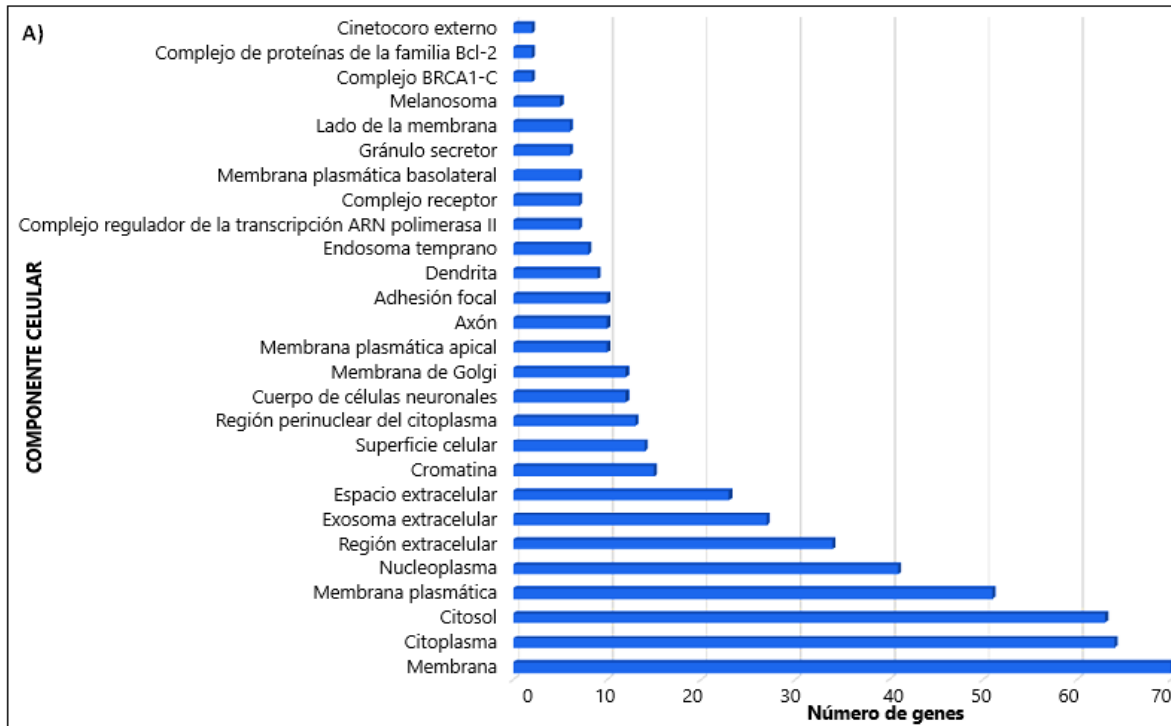
Figura 30. Diagrama de Venn de genes DOWN-regulated en células derivadas de glioblastoma con niveles disminuidos de TRIM25. Se representa en cada círculo la ontología con mayor número de genes DOWN-regulated y mayor “matching score”. En el círculo verde, el proceso biológico; en el círculo anaranjado, la función molecular y en el círculo azul, el componente celular. Se resalta en un círculo rojo aquellos genes que se encontraban enriquecidos en las tres ontologías.

Respecto a los 147 genes sobreexpresados (genes UP-regulated) después de la reducción de TRIM25 en células derivadas de GB A-172. La mayoría de los genes modulados positivamente ante la reducción de los niveles de TRIM25 se encuentran representados en el “componente celular” de citoplasma (Figura 31A). De manera interesante, 34 genes resultaron estar asociados a regiones extracelulares.

Los procesos biológicos (Figura 31B) en donde se vieron involucrados la mayoría de los genes sobreexpresados, fueron: la regulación positiva de la transcripción del templado de DNA, la regulación positiva de la migración celular y en menor medida, la regulación de la vía de señalización canónica Wnt, la respuesta celular al estímulo del factor de crecimiento nervioso y la regulación de la vía de señalización apoptótica.

En lo que respecta a la ontología de función molecular (Figura 31C), de los 147 sobreexpresados en las muestras sh-TRIM25, 130 se encontraban asociados a la función de “unión a proteínas”, 29 a unión a proteínas idénticas y 12 a unión a cromatina (Ver Anexo 4).

El algoritmo LifeMap identificó 25 genes UP-regulated abundantes y 40 constitutivos.



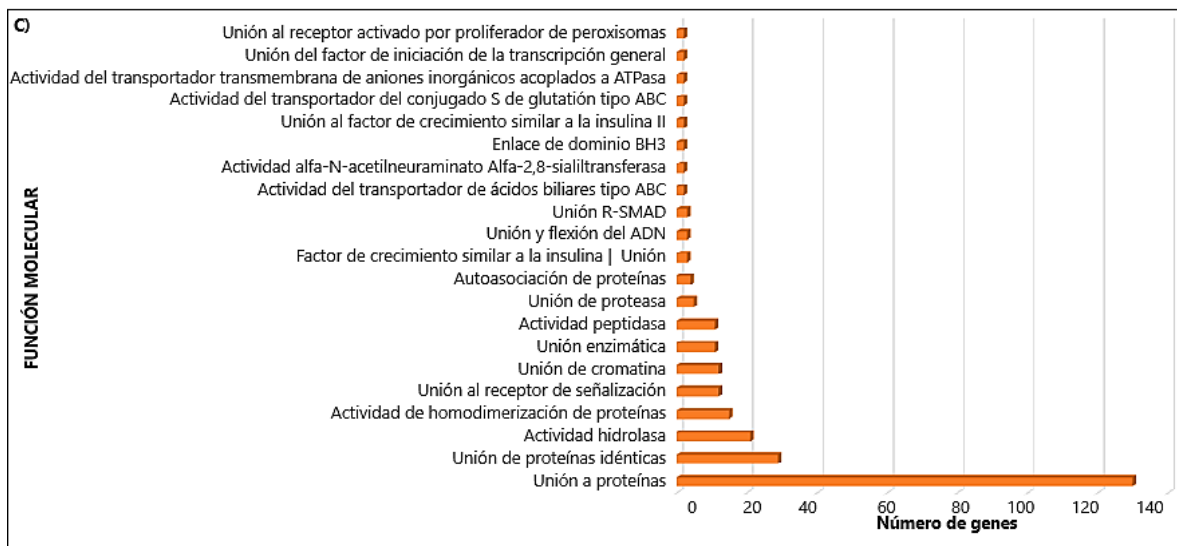
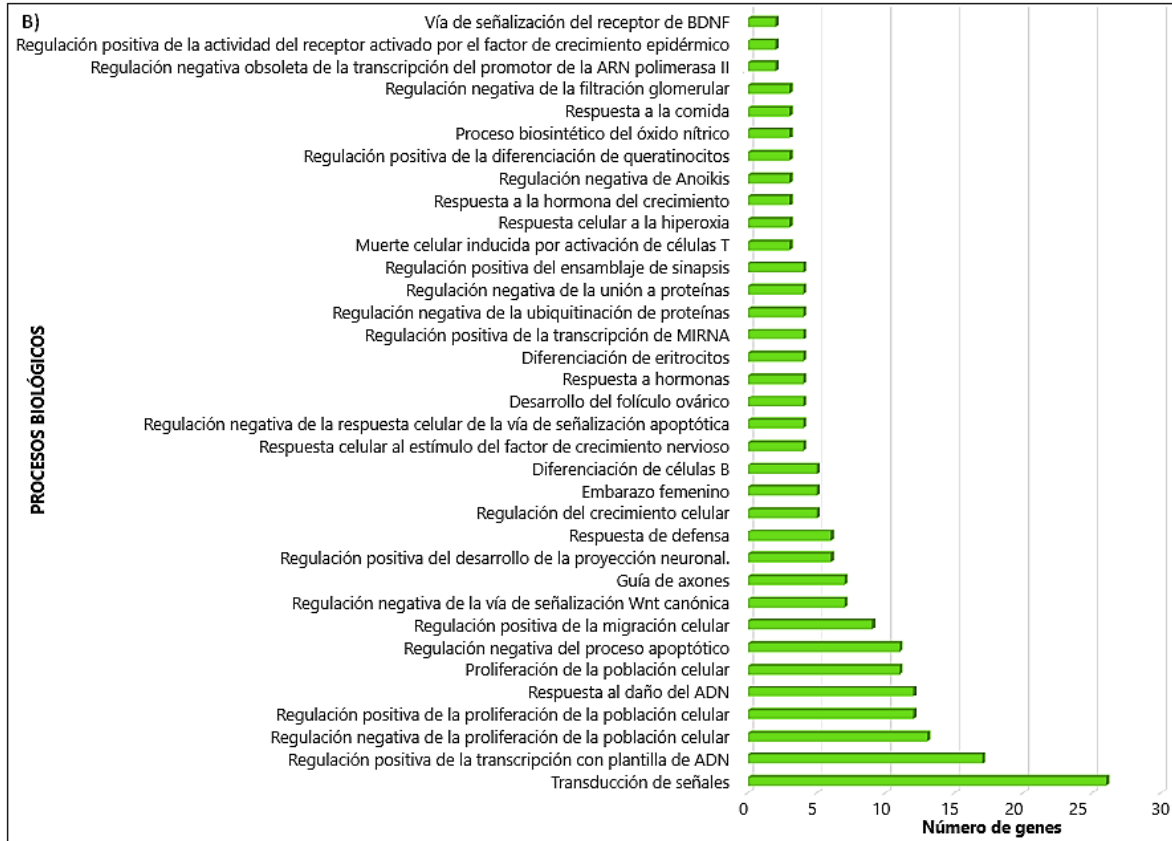


Figura 31. Análisis ontológico de los genes sobreexpresados en células de glioblastoma A-172 deficientes de TRIM25. A) Componente celular B) Proceso biológico y C) Función molecular.

Análisis realizado en la base de datos GeneCards (<https://www.genecards.org/>).

Los genes, cuya expresión incrementó ante la reducción de TRIM25 en células de GB, representativos en las tres categorías de ontología génica mayormente enriquecidas, fueron: *NCF1*, *CCNA2*, *GLI1*, *HDAC1*, *DVL3*, *NME2*, *SMAD4*, *HMGA1*, *BCL10*, *AKT1* y *PPARG* (Figura 32).

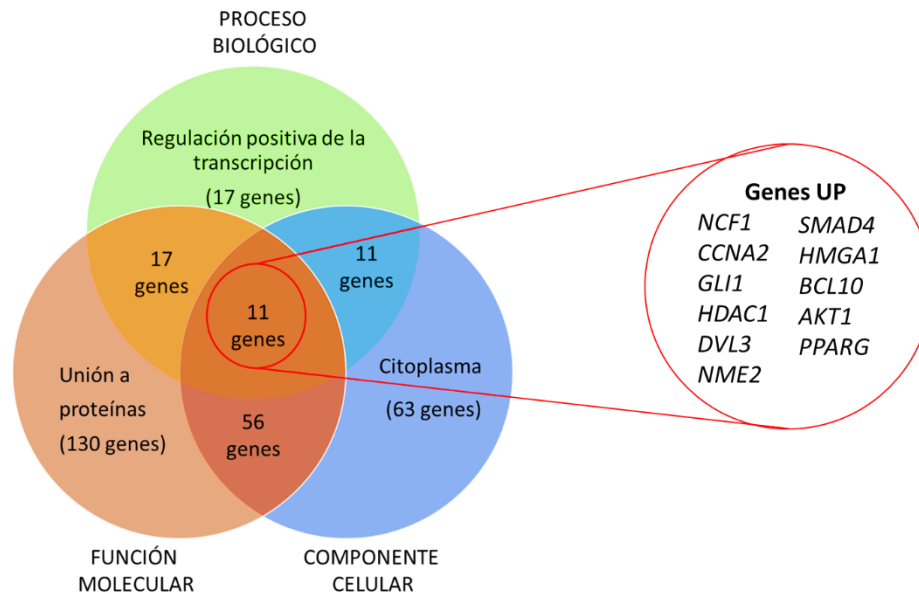


Figura 32. Diagrama de Venn de genes UP-regulados en células derivadas de glioblastoma con niveles disminuidos de TRIM25. Se representa en cada círculo la ontología con mayor número de genes UP-regulados y mayor “matching score”. En el círculo verde, el proceso biológico; en el círculo anaranjado, la función molecular y en el círculo azul, el componente celular. Se resalta en un círculo rojo aquellos genes que se encontraban enriquecidos en las tres ontologías.

En conjunto, estos resultados muestran que, en células de GB, los genes que TRIM25 regula positivamente, es decir, aquellos que su expresión disminuye cuando la expresión de TRIM25 disminuye. Están asociados a mecanismos de regulación de la transcripción de RNA y la regulación de la proliferación. En contraste, algunos genes que TRIM25 regula negativamente en células de GB, genes que se sobreexpresan cuando la expresión y abundancia de TRIM25 disminuye. Están involucrados con la regulación de importantes vías de señalización celular, como la vía Wnt y la vía de señalización apoptótica.

Respecto al componente celular, los DEG modulados por TRIM25 tienen una distribución subcelular mayoritaria en citoplasma y núcleo, en el caso de los disminuidos, y en citoplasma en el caso de los genes que se sobreexpresan.

Además, los DEG regulados positivamente y negativamente están asociados con la función molecular de “unión de proteína”, principalmente, y en particular varios genes regulados positivamente se ven involucrados con la unión a DNA.

Enriquecimiento génico. Se realizó un análisis de enriquecimiento génico haciendo uso de la base de datos ShinyGO. Este programa considera el FDR (por su nombre en inglés, *false discovery rate*), y el “*fold enrichment*”. El FDR es una medida que permite determinar el mayor número de genes que presenten verdaderamente una expresión diferencial con la menor cantidad de falsos positivos. Mientras que el “*fold enrichment*” que hace referencia al porcentaje de genes del análisis en cuestión, que están asociados con una ruta molecular, dividido entre el porcentaje de dichos genes contenidos en bases de datos de ontogenia. Por lo tanto, el *fold enrichment* señala la sobrerrepresentación o enriquecimiento de los genes en una determinada vía molecular.

De acuerdo con dicho análisis, se obtuvo que las vías que involucran a los genes cuya expresión disminuyó ante la reducción de los niveles de TRIM25 en GB, más enriquecidas son las relacionadas con el cáncer. Sin embargo, se observó que menor número de genes están relacionados con las vías de señalización en cáncer de tiroides y amebiasis (Figura 33).

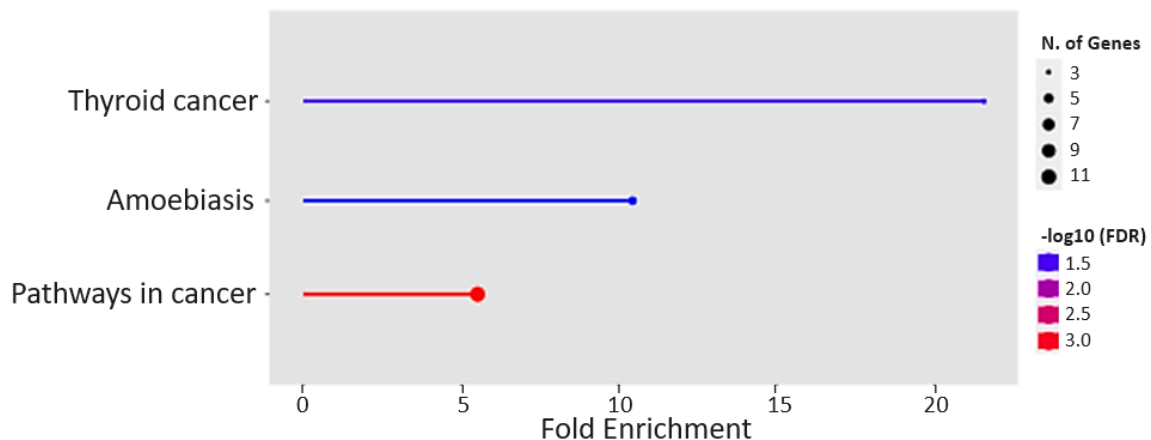


Figura 33. Análisis de enriquecimiento de los genes DOWN-regulated tras la disminución de TRIM25 en células derivadas de glioblastoma A-172 empleando la base de datos de ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/#tab-9561-5>).

En cuanto a los genes sobreexpresados en células de GB con niveles proteicos de TRIM25 disminuidos, se presentaban en las vías de señalización involucradas en cáncer, hepatitis B, sarampión, desregulación transcripcional en cáncer, por mencionar algunas (Figura 34).

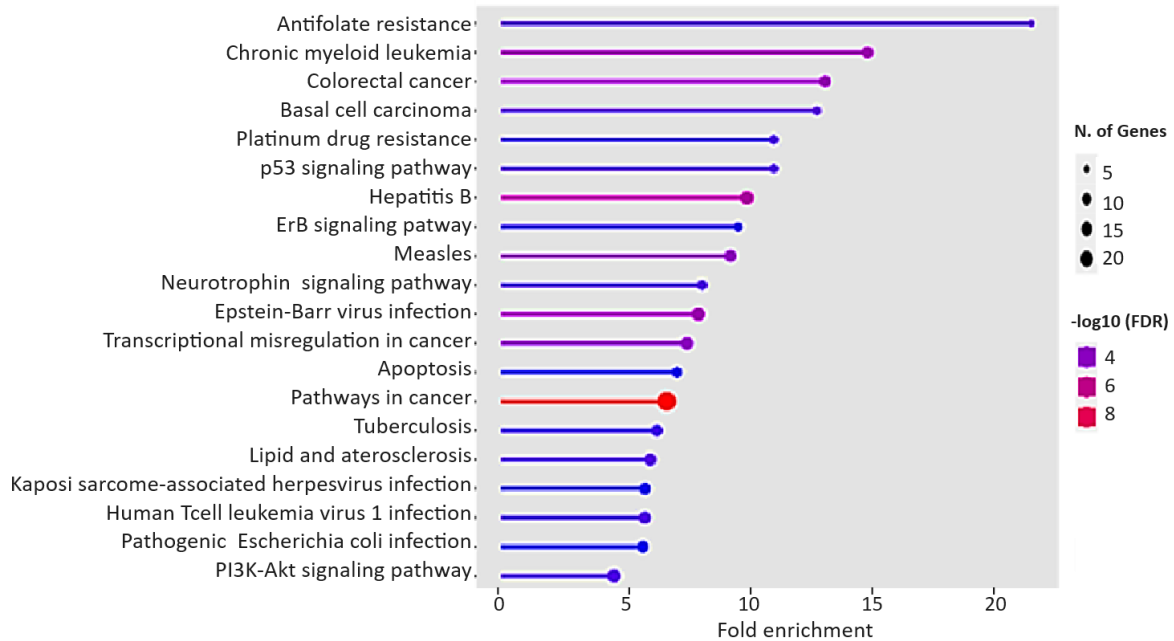


Figura 34. Análisis de enriquecimiento de los genes UP-regulated tras la disminución de TRIM25 en células derivadas de glioblastoma A-172, obtenidos por el programa de ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/#tab-9561-5>).

Con el fin de identificar cuales genes se involucraban en las vías moleculares identificadas en ShinyGO, se consultaron los datos de análisis KEGG. Se reveló que los genes subexpresados en células A-172 con bajos niveles de TRIM25 involucrados en vías del cáncer, son: *ECM*, *GLI*, *GSTs*, *CDKN1A*, *hMLH1*, *CtBP*, *RXR*, *PPAR5* y *CSFR*, mientras que genes como *TFG*, *RXR*, *CDKN1A* y *RET/PTC* se asociaban más con las vías involucradas con cáncer de tiroides.

Por otro lado, de los genes sobreexpresados en las muestras analizadas, se identificó a genes como *CRK*, *DCC*, *DDB2*, *NQO1*, *DVL3*, *AKT1*, *F2R*, *GLI1*, *HDAC1*, *IFNA6*, *IFNA8*, *FAS*, *IL2RA*, *JUN*, *SMAD4*, *MSH3*, *PPARG*, *BAX*, *STAT5B*, *PTCH2*, *CCNA2* y a *LPAR2* enriquecidos en la vía de señalización en cáncer. Así mismo, los genes involucrados con la desregulación transcripcional en cáncer fueron: *DDB2*, *ETV4*, *HDAC1*, *MPO*, *MYCN*, *PPARG*, *BAX*, *BMI1* y *CCNA2*.

8. Discusión

Derivado de los análisis *in silico* para determinar la expresión de *TRIM25* en GB se puede observar que en las tres bases de datos consultadas (GEPIA, UALCAN y Oncoexpression), *TRIM25* se encuentra sobreexpresado, independientemente del número de muestras empleadas en cada una de ellas. La expresión de *TRIM25* se ve incrementada en cuatro tipos de tejido tumoral y disminuida en seis tipos de cánceres, respecto al tejido normal, de acuerdo al análisis de los datos de expresión en la base de datos GEPIA. En contraste, derivado del análisis de los datos de UALCAN, se observó la sobreexpresión de *TRIM25* en 8 muestras de tejido canceroso. Debido a la heterogeneidad del cáncer, los tipos de cáncer y el número de muestras analizadas en cada base de datos, es que podemos encontrar algunas discrepancias entre la significancia estadística de los datos. Sin embargo, con los datos encontrados, identificamos que la expresión de *TRIM25* puede ser diferencial dependiendo del tipo de cáncer analizado y el subtipo molecular de cada tipo de cáncer.

El análisis de supervivencia se realizó a través de la interpretación de los gráficos de Kaplan Meier (KM). La curva de Kaplan Meier se utiliza habitualmente para analizar datos de tiempo hasta un acontecimiento, como el tiempo hasta la muerte o el tiempo hasta que se produce un acontecimiento concreto. Con base en el análisis de los gráficos obtenido de GENT2, una alta expresión de *TRIM25* fue relevante con un pronóstico desfavorable para los pacientes con tumores cerebrales de grados más altos. Además, el tiempo de supervivencia de los pacientes con GB es menor cuando presentan una sobreexpresión de *TRIM25*, lo que sugiere que dicho gen está involucrado en la promoción del tumor.

Así mismo, nuestros resultados de inmunohistoquímica evidencian que los niveles de proteína *TRIM25* están incrementados en muestras de pacientes con GB, con respecto a su tejido control. De manera que una alta expresión génica de *TRIM25* conduce a una abundancia proteica incrementada. Sin embargo, no encontramos correlación alguna entre los niveles incrementados de *TRIM25* con datos como el sexo y la edad de los pacientes, o con el subtipo histológico o la localización del tumor. Es posible que la función de dicha proteína no dependa de identificadores

génicos relacionados con el sexo o edad del paciente, ni con marcadores histológicos o su localización en el cerebro, si no a las características intrínsecas del tumor y del microambiente tumoral que permiten que sea un tumor grado 4.

Debido a las características moleculares y funcionales de TRIM25, como proteína relacionada con la respuesta de defensa inmune, resulta posible inferir que un incremento en su abundancia afecte mecanismos que regulan la respuesta inmunitaria en cáncer. Mau Xu Ge y colaboradores, identificaron algunos genes regulados por TRIM25 que favorecen el microambiente inmunosuprimido en gliomas de alto grado. Comprobando que TRIM25 promueve la proliferación celular, la expresión del ligando de muerte programada o *PD-L1* y la importación de NF- κ B al núcleo (Ge *et al.*, 2022). Un estudio reciente evidenció que TRIM25 promueve el crecimiento, migración e invasión celular de células de GB, a través de mediar la ubiquitinación del factor de splicing NONO, implicado en la modulación de la expresión de *PRMT1* y *c-MYC* (Chen *et al.*, 2024).

Los estudios anteriormente señalados, indican que efectivamente TRIM25 tiene una participación importante en la progresión de tumores de GB mediante la promoción de un microambiente inmunosuprimido, de la viabilidad, migración, invasión y proliferación celular. Los mecanismos y genes propuestos, se ven involucrados en complejas redes de interacción y vías de señalización. Se requieren más estudios para identificar la forma en que TRIM25 puede ejercer su función moduladora sobre los genes blanco identificados en este estudio.

Hasta la fecha se han descrito pocos blancos de ISGilación en donde TRIM25 es la enzima E3 ligasa involucrada, algunos de ellos son: la proteína 14-3-3 σ (Zou y Zhang, 2006), asociada a procesos de señalización oncogénica; PCNA (Park *et al.*, 2014), proteína involucrada con mecanismos de reparación y replicación del DNA; p53 (Park *et al.*, 2016), un factor de transcripción involucrado en la transcripción de múltiples genes involucrados con la regulación del ciclo celular, incluso, se ha demostrado que TRIM25 se puede autoISGilar, ocasionando una reducción de su actividad como E3 ligasa de ISG15 (Zou *et al.*, 2007). Como podemos apreciar, la mayoría de las proteínas blanco de TRIM25 como E3 ligasa de ISG15, se localizan

de manera prioritaria en el núcleo, incluyendo a la misma TRIM25, según nuestros ensayos de fraccionamiento subcelular y predicción de la localización.

Además, considerando que TRIM25 se localiza de manera prioritaria en núcleo. Sugerimos que TRIM25 puede estar llevando a cabo su función como E3 ligasa de ISG15 de manera primordial en el núcleo. La localización nuclear de TRIM25 sugiere que podría actuar como proteína de unión al DNA y que esté involucrada en mecanismos de regulación de la respuesta al daño al DNA, así como en la regulación de la expresión génica y del ciclo celular.

Se sabe que la transportación de las proteínas nucleares es un proceso selectivo, que implica, en la mayoría de los casos, una secuencia corta de aminoácidos que interactúen con proteínas ubicadas en el citoplasma, en la envoltura nuclear y/o en el complejo del poro nuclear, mejor conocidas como señales de localización nuclear o NLS. Después de la unión en el complejo del poro, las proteínas se translocan a través del poro hacia el núcleo de una manera que requiere ATP (Silver, 1991). Sin embargo, de acuerdo a los resultados del análisis de la estructura de TRIM25 en función de sus aminoácidos realizada en PSORT, se determinó que no cuenta con NLS, lo que sugiere que TRIM25 podría estar haciendo uso de otros mecanismos para localizarse en núcleo, así como la presencia de NLS no clásicas o aprovechar proteínas de carga que sí contienen una NLS clásica (Lu *et al.*, 2021). En este sentido, la presencia de dominios de unión a proteínas como PRY/SPRY en TRIM25 podría estar facilitando el mecanismo anteriormente descrito.

Por otro lado, los resultados de correlación de las enzimas E3 ligasas de ISG15 con TRIM25 revelaron una correlación positiva de la expresión de las mismas, con esto podemos identificar que si disminuimos los niveles de TRIM25 disminuiríamos a la par la expresión de *HERC5*, principalmente, así como la expresión de *HHRAI*. Es decir, en células derivadas de GB con bajos niveles de TRIM25, es posible que un perfil de ISGilación disminuido sea consecuencia de la disminución de los niveles de TRIM25. Aunque también, la ISGilación se verá afectada por el decremento de los niveles de las otras enzimas E3 ligasas involucradas con dicha PTM, tal como se observa en los resultados obtenidos de la reducción de los niveles de TRIM25 en células derivadas de GB, en donde detectamos que al reducir la abundancia de

TRIM25 se detectan menos marcas asociadas a un perfil de ISGilación en comparación con las células control.

De manera interesante, en las células de GB con niveles reducidos de TRIM25, se evidenció un incremento estadísticamente significativo de los niveles de ISG15 libre intracelular. Se requieren más investigaciones para determinar el efecto funcional de la forma libre de ISG15 en células de GB y elucidar el mecanismo por el cual hay una relación inversa entre los niveles de TRIM25 e ISG15. Sin embargo, en los últimos años, se ha presentado a ISG15 como una proteína con gran relevancia en cáncer, de tal manera que los niveles de ISG15 se han visto incrementados en células derivadas de GB (Tecalco-Cruz *et al.*, 2022; Tecalco-Cruz & Cruz-Ramos, 2018).

ISG15 se identificó que puede estar conjugado con proteínas celulares (ISGilación) o libre (intracelular) (Burks *et al.*, 2015), y que, además ISG15 libre puede ser secretado al medio extracelular (Dos Santos y Mansur, 2017). A grandes rasgos, la ISGilación se asocia a funciones protumorales. Mientras que, la función de ISG15 libre extracelular tiene propiedades inmunomoduladoras *in vitro* (Burks *et al.*, 2015). Se conoce muy poco de la función de ISG15 intracelular; sin embargo, Tecalco Cruz y Mejía Barreto, describen que la localización, así como la proporción y regulación de proteína ISG15 libre y conjugada, será determinante para la progresión de la tumorigénesis y el potencial oncogénico en células derivadas de cáncer de mama (Tecalco Cruz y Mejía-Barreto, 2017).

Por otro lado, el perfil de expresión génica modulada por TRIM25 en células de GB podría estar involucrado con su capacidad de unirse al DNA, probablemente mediante los dominios de dedos de ZINC. Sin embargo, se requieren ensayos experimentales para comprobar de qué manera se lleva a cabo dicha interacción.

De acuerdo a nuestros primeros análisis, considerando el Z-score y el *fold change* obtenido del análisis del microarreglo de cDNA. Identificamos que genes como *TFG*, *SMARCB1*, *TNFRSF14*, *IFI27L2* y *DAP3* se encuentran disminuidos cuando la expresión de *TRIM25* disminuye, sugiriendo que son regulados positivamente por TRIM25 en el contexto de GB.

Realizando una búsqueda en pubmed, para conocer de qué manera se involucran dichos genes en GB y encontramos que su sobreexpresión se correlaciona con un mal pronóstico en pacientes con este tumor. Por ejemplo, los malos resultados de supervivencia y la resistencia a la terapia con temozolomida se asociaron con una mayor expresión *TFG* (Bhawe *et al.*, 2020). Así mismo, *TFG* interactúa con TRIM25 tras una infección viral y regula negativamente la señalización de IFN tipo I mediada por RIG-I, lo que conduce a una supresión de las vías de señalización del factor nuclear NF-κB (Lee *et al.*, 2013). Como ya se había visto, dicha vía también está ampliamente involucrada con la evasión de la apoptosis de las células de glioma (Ge *et al.*, 2022).

SMARCB1 ha sido relacionado con una variante extremadamente rara de GB que tiende a afectar a pacientes a una edad temprana: GB rabdoide (Byeon *et al.*, 2014; Momota *et al.*, 2011). Mayor expresión de *TNFRSF14* se asocia con una menor supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad en pacientes con GB, así como con una menor respuesta Th1, lo que contribuye a un ambiente inmunosuprimido en este tipo de pacientes (Lombardo *et al.*, 2020). Del mismo modo, se describió que *DAP-3* se regula positivamente en células de GB invasivo y en células de glioma con un fenotipo de motilidad inducida in vitro, lo que les confiere resistencia a la apoptosis cuando se activa la migración celular (Mariani *et al.*, 2001).

Ahora bien, con respecto al análisis de ontología génica y enriquecimiento, los genes como: *APP*, *GLI2*, *NDN*, *NR2C2* y *RXRA* que redujeron su expresión en células con niveles reducidos en TRIM25, también se relacionaban en gran medida con un peor pronóstico para los pacientes con GB. En este sentido, existen marcadores genéticos proinflamatorios y neurodegenerativos, como la proteína precursora amiloide (APP), que al estar incrementados pueden contribuir a la patobiología, el fenotipo y la proliferación del crecimiento de las células gliales en el contexto de GB (Culicchia *et al.*, 2008). La sobreexpresión de *GLI2* en células derivadas de GB se asocia con un incremento en la expresión de *ARHGEF16*, lo que conduce a una mayor migración y proliferación en relación a células control (Huang *et al.*, 2018). En un estudio realizado por Dabrock y colaboradores se

identificó que RXRA, así como otros receptores retinoides, promueven la proliferación de células de GB con características de células troncales, incluso de manera independiente de la señalización por ácido retinoico (Dabrock *et al.*, 2023).

De acuerdo a nuestros resultados, TRIM25 regula positivamente a *NDN* y contrario a lo que se esperaba, una baja expresión de *NDN* se relaciona con mal pronóstico en pacientes con GB. *NDN* es un gen perteneciente a la familia de genes asociados a tumor conocidos como antígenos asociados a melanoma (MAGE). Específicamente *NDN*, pertenece a los MAGE tipo 2, que se han caracterizado por sobreexpresarse en cerebro y estar involucrados con la regulación del desarrollo neuronal, diferenciación y supervivencia. Sin embargo, Arora y colaboradores sugieren que la regulación negativa de MAGEs tipo 2, como lo es *NDN*, se asocian con mayor infiltración inmune y peor pronóstico en pacientes con gliomas de bajo grado y GB (Arora *et al.*, 2020). Es posible que haya mecanismos de regulación negativa de la expresión de *NDN* que se encuentren incrementados en pacientes con GB.

Respecto a los genes, con mayor Z-score y *fold change*, cuya expresión incrementó al reducir los niveles de TRIM25 en células de GB A-172. Destaca *MPO*, un gen que codifica para una importante enzima involucrada en la generación de especies reactivas de oxígeno. De acuerdo a ensayos realizados con radiación local al cerebro con GB, se evidenció un incremento en la respuesta inflamatoria sistémica aguda con aumentos de las células portadoras de MPO, tanto en la periferia como en el tejido tumoral, lo que resultó en un aumento de la actividad de la MPO en el microambiente del tumor. La inhibición o ausencia de la actividad de la MPO aumentó el crecimiento del tumor y disminuyó la supervivencia del huésped, lo que revela que la actividad elevada de la MPO después de la radiación tiene un papel antitumoral (Ali *et al.*, 2022). Una reducción de los niveles de TRIM25 en células de GB conduce a una alta expresión de *MPO*, de manera que se requieren estudios que involucren el estudio de *MPO* y *TRIM25* en GB y ver su efecto.

Mediante el análisis de ontología génica, se identificó que de los cinco genes DOWN-regulated representativos en las ontologías génicas enriquecidas, al menos

tres han sido descritos como oncogenes con función de factores de transcripción. El gen *APP* codifica para la proteína precursora beta amiloide, mutaciones en este gen se han asociado a la enfermedad de Alzheimer autosómica dominante y en la amiloidosis cerebro arterial. *GLI2*, codifica para una proteína que pertenece a la subclase de proteínas con dedos de zinc tipo C₂H₂ de la familia GLI, la cual funciona como un factor de transcripción y ha sido identificada como oncogen en carcinoma embrionario. *NDN*, es un gen sin intrones que se expresa a partir del alelo paterno, la proteína que codifica puede suprimir el crecimiento de las neuronas postmitóticas, de acuerdo a ensayos in vivo en ratones. El gen *NR2C2*, codifica para un receptor nuclear y funciona en muchos procesos biológicos como el desarrollo, la diferenciación celular y la homeostasis. *RXRA*, también codifica para un receptor nuclear cuya función es activar la transcripción de genes mediante la unión con su ligando: el ácido retinoico (National Center for Biotechnology Information (NCBI), 1988).

Por otro lado, identificamos que hay oncogenes y genes supresores de tumores que se incrementan cuando hay niveles reducidos de TRIM25 en células de GB. Por ejemplo; El factor citosólico de neutrófilos 1, *NCF1* es traducida para dar origen a la subunidad citosólica de 47 kDa de la NADPH oxidasa de neutrófilos. Por otro lado, la ciclina A es responsable de la activación de la cinasa 2 dependiente de ciclinas con la finalidad de promover la transición celular a través de G1/S y G2/M. El gen que codifica para la ciclina A es *CCNA2*. El factor de transcripción codificado por *GLI1* está involucrado en la cascada de transducción de señales de Sonic Hedgehog y promueve la transcripción de genes como *PTCH1*, *CCND1*, *CCND2*, *MYC*, *Bcl-2* y *ANG1/2*, promoviendo la proliferación celular. El gen *HDAC1* codifica para la deacetilasa de histonas 1; importante enzima implicada en la regulación epigenética, se ha descrito que puede interactuar con la proteína supresora de tumores del retinoblastoma controlando la proliferación y diferenciación celular. *DVL3* da origen a una fosfoproteína citoplasmática que regula la proliferación celular; *NME2*, a un nucleósido difosfato cinasa 2; *SMAD4*, a un miembro de las proteínas transductoras de señales que responden a la señalización del factor de crecimiento transformante beta; *HMGA1*, codifica para una proteína asociada a la

cromatina, se une a regiones ricas en AT; *BCL10*, da origen a una proteína que se encuentra relacionada con la inducción de la apoptosis y la activación de la vía NF-kappaB; *AKT1* codifica para la serin/treonin quinasa 1, involucrada en la vía de señalización *PI3K/AKT* y mTOR, vías cruciales en la supervivencia tumoral, y *PPARG*, cuyo producto proteico es un miembro de la subfamilia de receptores nucleares del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR) (National Center for Biotechnology Information (NCBI), 1988).

Esta diversidad de funciones, evidencía la compleja red de regulación en cáncer, demostrando que los mecanismos de represión/inducción compiten entre sí, depende del estado tumoral y la abundancia proteica. Se requieren más repeticiones y experimentos adicionales para identificar los mecanismos moleculares en los que se ve involucrado TRIM25.

Sin embargo, mediante la revisión bibliográfica de la relación de los genes representativos identificados en el análisis de ontología génica y enriquecimiento, que aumentaron su expresión en células con bajos niveles de TRIM25 con GB. En general, se determinó que su expresión se encuentra incrementada en GB y esto se relaciona con un mal pronóstico clínico, en pacientes con este tipo de tumor. Por ejemplo, en un estudio realizado en mayo del presente año, se identificó que una alta expresión de *CCNA2* y de una cinasa relacionada con NIMA (*NEK2*) se relaciona con mal pronóstico clínico en pacientes con gliomas. Mediante secuenciación unicelular de GB se reveló que *CCNA2* se encontraba incrementado en células progenitoras neurales positivas (P-NPC) promoviendo la proliferación y progresión, alterando los puntos de control del ciclo celular (Zhou *et al.*, 2024). *GLI1* se ha propuesto como marcador predictivo de menor supervivencia en pacientes con GB al activar la vía Hedgehog. Dicha vía de señalización se encuentra entre las principales involucradas en la renovación de células troncales cancerosas, las cuáles inciden en la resistencia a las terapias actuales en el tratamiento de GB (Rossi *et al.*, 2011). Al inhibir *HDAC1* se suprimió el proceso transición epitelio-mesenquimal en células de glioma, afectando la invasión y migración de las células (Cheng *et al.*, 2023). La sobreexpresión de *HMGA1* se correlaciona con mayor

proliferación, invasión y angiogénesis de células de GB y células troncales cancerosas (Colamaio *et al.*, 2016). Así mismo, la sobreexpresión de *BCL10* promueve el crecimiento de las células de glioma, asociándose con un peor pronóstico en pacientes con dicha neoplasia, además se evidenció el eje *CREB1/ZNF436/BCL10* como un blanco terapéutico potencial para las intervenciones de glioma (Shang *et al.*, 2019). Con respecto a *AKT1*, se propuso que la vía de señalización de la cinasa 1/proteína cinasa B del marco de lectura abierto derecho (RIOK1-AKT) desempeña un papel importante en el fenotipo maligno de las células de glioma (Y. Wang *et al.*, 2021). Además, en un estudio de caso realizado por Ding y colaboradores, se identificó que el polimorfismo *PPARG* c.1347C>T se asoció con riesgo de cáncer de esófago y GB (Ding *et al.*, 2017).

Estos resultados sugieren que, aunque TRIM25 regule negativamente los genes mencionados anteriormente, hay otros mecanismos de regulación competitivos que promueven la expresión de estos genes y por lo tanto su impacto en el desarrollo y progresión del GB. En general, mediante el análisis de los DEG por TRIM25 en células de GB, proponemos que TRIM25 puede promover la progresión tumoral a través de la regulación de genes implicados en la evasión de la muerte celular por apoptosis y en la evasión de la respuesta inmune. TRIM25 regula positivamente genes involucrados con la regulación positiva de la transcripción por RNA polimerasa II en núcleo y citoplasma. Los productos de los genes reprimidos por TRIM25 se encuentran asociados a los procesos de regulación de la proliferación y migración celular, así como a una localización en citoplasma y membrana celular.

9. Conclusiones

Los niveles de expresión de TRIM25 se encuentran incrementados en GB y se asocian con un tiempo de sobrevivida menor en los pacientes con este tipo de cáncer. La expresión de TRIM25 se correlaciona con la expresión de las enzimas E3-ligasas de ISG15 en muestras de GB. La proteína TRIM25 se encuentra incrementada en pacientes con GB y se localiza mayoritariamente en el compartimento nuclear. Los niveles de la proteína ISG15 libre se incrementan en células de GB deficientes de TRIM25. TRIM25 regula la expresión de genes asociados con el desarrollo y la progresión del cáncer (Ver figura 35).

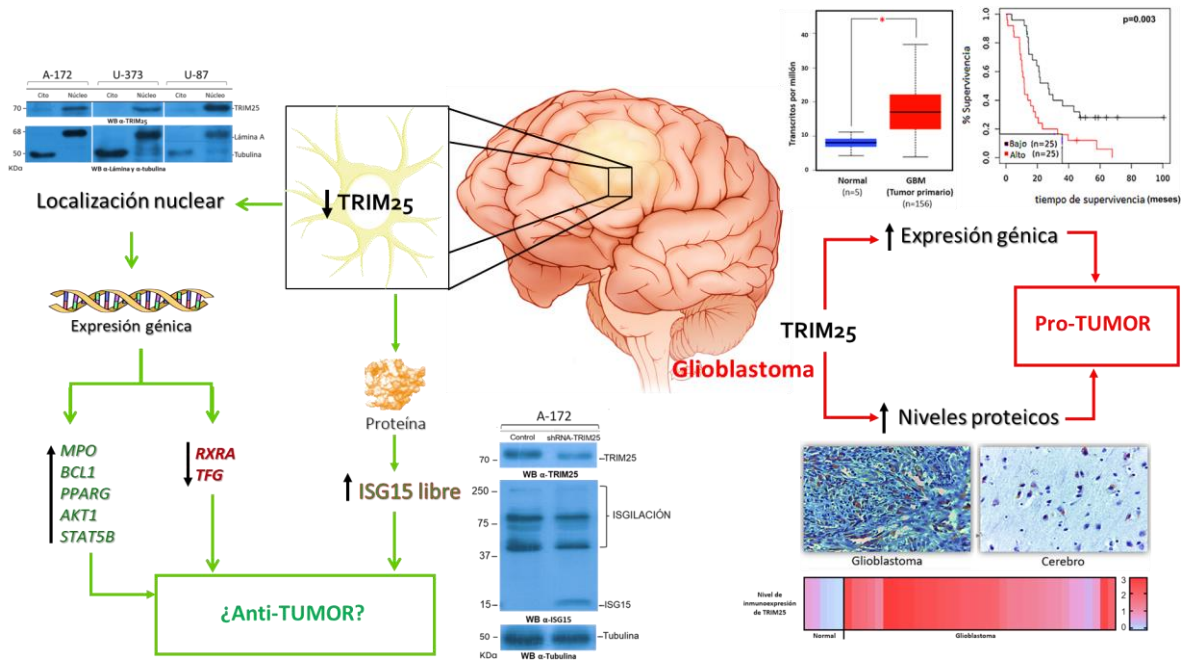


Figura 35. Resumen gráfico. En la imagen superior izquierda se presenta el WB del fraccionamiento subcelular de las células A-172, U-373 y U-87, donde se observa que la localización celular de TRIM25 es mayoritaria en núcleo. El recuadro negro representa a una célula derivada de glioblastoma con bajos niveles de TRIM25. La flecha hacia abajo indica que a nivel proteínico, cuando TRIM25 disminuye, incrementan los niveles de ISG15 libre, así mismo, la reducción de TRIM25 afectará la expresión de diversos genes blanco. Estos resultados se asocian con un probable efecto anti-tumor (recuadro verde). En la imagen superior derecha se indica que los niveles de expresión génica de TRIM25 en glioblastoma se encuentran incrementados en muestras de pacientes con respecto a muestras normales (gráfico de caja y bigotes) y que una alta

expresión de TRIM25 se correlaciona con un menor tiempo de supervivencia de los pacientes con glioblastoma (Gráfico de Kaplan Meier). En la imagen inferior derecha se muestran las imágenes representativas de IHC contra TRIM25 en muestras de tejido de muestras glioblastoma y tejido cerebral sano, y un mapa de calor de los niveles de inmunexpresión de TRIM25 en las muestras del TMA. Las imágenes del lado derecho de la figura indican que una alta expresión génica y elevados niveles de proteína TRIM25 en pacientes con glioblastoma, se asocian a un efecto pro-tumoral (recuadro rojo).

10. Perspectivas

Es importante identificar blancos de TRIM25 en el proceso de ISGilación y analizar el perfil de ISGilación/ISG15 mediado por TRIM25 en las diferentes fracciones subcelulares de líneas derivadas de GB. Además, elucidar y comprobar el mecanismo por el cual ISG15 libre aumenta cuando los niveles de TRIM25 están disminuidos en células de GB. Comprobar experimentalmente la expresión de los DEG en células A-172 con niveles reducidos de TRIM25 e identificar genes que puedan ser potenciales biomarcadores o blancos terapéuticos.

11. Bibliografía

- Ali, M., Fulci, G., Grigalavicius, M., Pulli, B., Li, A., Wojtkiewicz, G.R., Wang, C., Hsieh, K.L.-C., Linnoila, J.J., Theodossiou, T.A., Chen, J.W., 2022. Myeloperoxidase exerts anti-tumor activity in glioma after radiotherapy. *Neoplasia* 26, 100779. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.100779>
- Allen, N.J., Lyons, D.A., 2018. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* 362, 181–185. <https://doi.org/10.1126/science.aat0473>
- Anthony Massiah, M., 2019. Zinc-Binding B-Box Domains with RING Folds Serve Critical Roles in the Protein Ubiquitination Pathways in Plants and Animals, in: Summers, M. (Ed.), *Ubiquitin Proteasome System - Current Insights into Mechanism Cellular Regulation and Disease*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85895>
- Arora, M., Kumari, S., Singh, J., Chopra, A., Chauhan, S.S., 2020. Downregulation of Brain Enriched Type 2 MAGEs Is Associated With Immune Infiltration and Poor Prognosis in Glioma. *Front. Oncol.* 10, 573378. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.573378>
- Azuma, K., Inoue, S., 2022. Efp/TRIM25 and Its Related Protein, TRIM47, in Hormone-Dependent Cancers. *Cells* 11, 2464. <https://doi.org/10.3390/cells11152464>
- Baltz, A.G., Munschauer, M., Schwanhäusser, B., Vasile, A., Murakawa, Y., Schueler, M., Youngs, N., Penfold-Brown, D., Drew, K., Milek, M., Wyler, E., Bonneau, R., Selbach, M., Dieterich, C., Landthaler, M., 2012. The mRNA-Bound Proteome and Its Global Occupancy Profile on Protein-Coding Transcripts. *Mol. Cell* 46, 674–690. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.021>
- Belotti, Y., Tolomeo, S., Yu, R., Lim, W.-T., Lim, C.T., 2022. Prognostic Neurotransmitter Receptors Genes Are Associated with Immune Response, Inflammation and Cancer Hallmarks in Brain Tumors. *Cancers* 14, 2544. <https://doi.org/10.3390/cancers14102544>

- Bhawe, K., Felty, Q., Yoo, C., Ehtesham, N.Z., Hasnain, S.E., Singh, V.P., Mohapatra, I., Roy, D., 2020. Nuclear Respiratory Factor 1 (NRF1) Transcriptional Activity-Driven Gene Signature Association with Severity of Astrocytoma and Poor Prognosis of Glioblastoma. *Mol. Neurobiol.* 57, 3827–3845. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01979-2>
- Burks, J., Reed, R.E., Desai, S.D., 2015. Free ISG15 triggers an antitumor immune response against breast cancer: a new perspective. *Oncotarget* 6, 7221–7231. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3372>
- Byeon, S.-J., Cho, H.J., Baek, H.W., Park, C.-K., Choi, S.-H., Kim, S.-H., Kim, H.K., Park, S.-H., 2014. Rhabdoid glioblastoma is distinguishable from classical glioblastoma by cytogenetics and molecular genetics. *Hum. Pathol.* 45, 611–620. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2013.08.024>
- Campa Fernández, V.M., 2017. Análisis de imágenes de microscopia con ImageJ. Createspace Independent Publishing Platform, Lloc de publicació no identificat.
- Cao, F., Li, D.-P., Wang, L., Li, M., Zhang, H., Tao, M., 2016. TRIM25 promotes oncogenic activities through regulation of ZEB1 in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 10, 9751–9760.
- Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B.M., Strein, C., Davey, N.E., Humphreys, D.T., Preiss, T., Steinmetz, L.M., Krijgsveld, J., Hentze, M.W., 2012. Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell* 149, 1393–1406. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.031>
- Chen, Y., Xu, X., Ding, K., Tang, T., Cai, F., Zhang, H., Chen, Z., Qi, Y., Fu, Z., Zhu, G., Dou, Z., Xu, J., Chen, G., Wu, Q., Ji, J., Zhang, J., 2024. TRIM25 promotes glioblastoma cell growth and invasion via regulation of the PRMT1/c-MYC pathway by targeting the splicing factor NONO. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 43, 39. <https://doi.org/10.1186/s13046-024-02964-6>
- Cheng, Z., Li, S., Yuan, J., Li, Y., Cheng, S., Huang, S., Dong, J., 2023. HDAC1 mediates epithelial–mesenchymal transition and promotes cancer cell

- invasion in glioblastoma. *Pathol. - Res. Pract.* 246, 154481. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2023.154481>
- Choudhury, N.R., Heikel, G., Michlewski, G., 2020. TRIM25 and its emerging RNA-binding roles in antiviral defense. *WIREs RNA* 11. <https://doi.org/10.1002/wrna.1588>
- Choudhury, N.R., Heikel, G., Trubitsyna, M., Kubik, P., Nowak, J.S., Webb, S., Granneman, S., Spanos, C., Rappsilber, J., Castello, A., Michlewski, G., 2017. RNA-binding activity of TRIM25 is mediated by its PRY/SPRY domain and is required for ubiquitination. *BMC Biol.* 15, 105. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0444-9>
- Colamaio, M., Tosti, N., Puca, F., Mari, A., Gattardo, R., Kuzay, Y., Federico, A., Pepe, A., Sarnataro, D., Ragozzino, E., Raia, M., Hirata, H., Gemei, M., Mimori, K., Del Vecchio, L., Battista, S., Fusco, A., 2016. HMGA1 silencing reduces stemness and temozolomide resistance in glioblastoma stem cells. *Expert Opin. Ther. Targets* 20, 1169–1179. <https://doi.org/10.1080/14728222.2016.1220543>
- Correa-Arzate, L., Portilla-Robertson, J., Ramírez-Jarquín, J.O., Jacinto-Alemán, L.F., Mejía-Velázquez, C.P., Villanueva-Sánchez, F.G., Rodríguez-Vázquez, M., 2023. LRP5, SLC6A3, and SOX10 Expression in Conventional Ameloblastoma. *Genes* 14, 1524. <https://doi.org/10.3390/genes14081524>
- Culicchia, F., Cui, J.-G., Li, Y.Y., Lukiw, W.J., 2008. Upregulation of β -amyloid precursor protein expression in glioblastoma multiforme. *NeuroReport* 19, 981–985. <https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e328302f139>
- Dabrock, A., Ernesti, N., Will, F., Rana, M., Leinung, N., Ehrich, P., Tronnier, V., Zechel, C., 2023. RAR-Dependent and RAR-Independent RXR Signaling in Stem-like Glioma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 16466. <https://doi.org/10.3390/ijms242216466>
- Daubon, T., Hemadou, A., Romero Garmendia, I., Saleh, M., 2020. Glioblastoma Immune Landscape and the Potential of New Immunotherapies. *Front. Immunol.* 11, 585616. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.585616>

- D'Cruz, Akshay A., Babon, J.J., Norton, R.S., Nicola, N.A., Nicholson, S.E., 2013. Structure and function of the SPRY/B30.2 domain proteins involved in innate immunity. *Protein Sci.* 22, 1–10. <https://doi.org/10.1002/pro.2185>
- D'Cruz, Akshay A., Kershaw, N.J., Chiang, J.J., Wang, M.K., Nicola, N.A., Babon, J.J., Gack, M.U., Nicholson, S.E., 2013. Crystal structure of the TRIM25 B30.2 (PRYSPRY) domain: a key component of antiviral signalling. *Biochem. J.* 456, 231–240. <https://doi.org/10.1042/BJ20121425>
- D'Cruz, A.A., Kershaw, N.J., Hayman, T.J., Linossi, E.M., Chiang, J.J., Wang, M.K., Dagley, L.F., Kolesnik, T.B., Zhang, J.-G., Masters, S.L., Griffin, M.D.W., Gack, M.U., Murphy, J.M., Nicola, N.A., Babon, J.J., Nicholson, S.E., 2018. Identification of a second binding site on the TRIM25 B30.2 domain. *Biochem. J.* 475, 429–440. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170427>
- 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, 417–424. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322006000500008>
- Deng, S., Li, Y., Yi, G., Lei, B., Guo, M., Xiang, W., Chen, Z., Liu, Y., Qi, S., 2018. Overexpression of COX7A2 is associated with a good prognosis in patients with glioma. *J. Neurooncol.* 136, 41–50. <https://doi.org/10.1007/s11060-017-2637-z>
- Ding, H., Chen, Y., Qiu, H., Liu, C., Wang, Y., Kang, M., Tang, W., 2017. PPARG c.1347C>T polymorphism is associated with cancer susceptibility: from a case-control study to a meta-analysis. *Oncotarget* 8, 102277–102290. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20925>
- Dong, X.-Y., Fu, X., Fan, S., Guo, P., Su, D., Dong, J.-T., 2012. Oestrogen causes ATBF1 protein degradation through the oestrogen-responsive E3 ubiquitin ligase EFP. *Biochem. J.* 444, 581–590. <https://doi.org/10.1042/BJ20111890>
- Dos Santos, P.F., Mansur, D.S., 2017. Beyond ISGylation: Functions of Free Intracellular and Extracellular ISG15. *J. Interferon Cytokine Res.* 37, 246–253. <https://doi.org/10.1089/jir.2016.0103>

- Farley, A., Johnstone, C., Hendry, C., McLafferty, E., 2014. Nervous system: part 1. *Nurs Stand* 28, 46–51. <https://doi.org/doi:10.7748/ns2014.04.28.31.46.e>
- Gack, M.U., Shin, Y.C., Joo, C.-H., Urano, T., Liang, C., Sun, L., Takeuchi, O., Akira, S., Chen, Z., Inoue, S., Jung, J.U., 2007. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446, 916–920. <https://doi.org/10.1038/nature05732>
- Ge, M., Shi, Y., Liu, D., 2022a. Tripartite motif-containing 25 facilitates immunosuppression and inhibits apoptosis of glioma via activating NF- κ B. *Exp. Biol. Med.* 247, 1529–1541. <https://doi.org/10.1177/15353702221099460>
- Ge, M., Shi, Y., Liu, D., 2022b. Tripartite motif-containing 25 facilitates immunosuppression and inhibits apoptosis of glioma via activating NF- κ B. *Exp. Biol. Med.* 247, 1529–1541. <https://doi.org/10.1177/15353702221099460>
- GeneCards, 2024. The human gene database.
- Gómez-Tortosa, E., Baradaran-Heravi, Y., Dillen, L., Choudhury, N.R., Agüero Rabes, P., Pérez-Pérez, J., Kocoglu, C., Sainz, M.J., Ruiz González, A., Téllez, R., Cremades-Jimeno, L., Cárdbaba, B., EU EOD Consortium, Van Broeckhoven, C., Michlewski, G., Van Der Zee, J., 2023. *TRIM25* mutation (p.C168*), coding for an E3 ubiquitin ligase, is a cause of early-onset autosomal dominant dementia with amyloid load and parkinsonism. *Alzheimers Dement.* 19, 2805–2815. <https://doi.org/10.1002/alz.12913>
- Han, Q., Cheng, P., Yang, H., Liang, H., Lin, F., 2019. Altered expression of microRNA-365 is related to the occurrence and development of non-small-cell lung cancer by inhibiting TRIM25 expression. *J. Cell. Physiol.* 234, 22321–22330. <https://doi.org/10.1002/jcp.28798>
- Hanahan, D., 2022. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 12, 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., Monje, M., 2023. Cancer hallmarks intersect with neuroscience in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 41, 573–580. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.012>

- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hatakeyama, S., 2017. TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis. *Trends Biochem. Sci.* 42, 297–311. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.01.002>
- Haubrich, K., Augsten, S., Álvarez, L., Huppertz, I., Simon, B., Perez, K., Masiewicz, P., Lethier, M., Rittinger, K., Gabel, F., Hentze, M.W., Cusack, S., Hennig, J., 2020. Mechanistic insights into RNA binding and RNA-regulated RIG-I ubiquitination by TRIM25 (preprint). *Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.04.070177>
- Horbinski, C., Nabors, L.B., Portnow, J., Baehring, J., Bhatia, A., Bloch, O., Brem, S., Butowski, N., Cannon, D.M., Chao, S., Chheda, M.G., Fabiano, A.J., Forsyth, P., Gigilio, P., Hattangadi-Gluth, J., Holdhoff, M., Junck, L., Kaley, T., Merrell, R., Mrugala, M.M., Nagpal, S., Nedzi, L.A., Nevel, K., Nghiemphu, P.L., Parney, I., Patel, T.R., Peters, K., Puduvalli, V.K., Rockhill, J., Rusthoven, C., Shonka, N., Swinnen, L.J., Weiss, S., Wen, P.Y., Willmarth, N.E., Bergman, M.A., Darlow, S., 2023. NCCN Guidelines® Insights: Central Nervous System Cancers, Version 2.2022: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* 21, 12–20. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2023.0002>
- Huang, D., Wang, Y., Xu, L., Chen, L., Cheng, M., Shi, W., Xiong, H., Zalli, D., Luo, S., 2018. GLI2 promotes cell proliferation and migration through transcriptional activation of ARHGEF16 in human glioma cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37, 247. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0917-x>
- Inoue, S., Orimo, A., Hosoi, T., Kondo, S., Toyoshima, H., Kondo, T., Ikegami, A., Ouchi, Y., Orimo, H., Muramatsu, M., 1993. Genomic binding-site cloning reveals an estrogen-responsive gene that encodes a RING finger protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 11117–11121. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11117>

- Ishii, N., Maier, D., Merlo, A., Tada, M., Sawamura, Y., Diserens, A., Van Meir, E.G., 1999. Frequent Co-Alterations of *TP53*, *p16/CDKN2A*, *p14^{ARF}*, *PTEN* Tumor Suppressor Genes in Human Glioma Cell Lines. *Brain Pathol.* 9, 469–479. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1999.tb00536.x>
- Ivashkiv, L.B., 2018. IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 545–558. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0029-z>
- Klug, A., 2010. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Q. Rev. Biophys.* 43, 1–21. <https://doi.org/10.1017/S0033583510000089>
- Koliopoulos, M.G., Esposito, D., Christodoulou, E., Taylor, I.A., Rittinger, K., 2016. Functional role of TRIM E3 ligase oligomerization and regulation of catalytic activity. *EMBO J.* 35, 1204–1218. <https://doi.org/10.15252/embj.201593741>
- Koliopoulos, M.G., Lethier, M., Van Der Veen, A.G., Haubrich, K., Hennig, J., Kowalinski, E., Stevens, R.V., Martin, S.R., Reis E Sousa, C., Cusack, S., Rittinger, K., 2018. Molecular mechanism of influenza A NS1-mediated TRIM25 recognition and inhibition. *Nat. Commun.* 9, 1820. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04214-8>
- Kwon, S.C., Yi, H., Eichelbaum, K., Föhr, S., Fischer, B., You, K.T., Castello, A., Krijgsveld, J., Hentze, M.W., Kim, V.N., 2013. The RNA-binding protein repertoire of embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1122–1130. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2638>
- Lee, N.-R., Choi, J.-Y., Yoon, I.-H., Lee, J.K., Inn, K.-S., 2018. Positive regulatory role of c-Src-mediated TRIM25 tyrosine phosphorylation on RIG-I ubiquitination and RIG-I-mediated antiviral signaling pathway. *Cell. Immunol.* 332, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.08.004>
- Lee, N.-R., Shin, H.-B., Kim, H.-I., Choi, M.-S., Inn, K.-S., 2013. Negative regulation of RIG-I-mediated antiviral signaling by TRK-fused gene (TFG) protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437, 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.06.061>

- Li, C., Dou, P., Lu, X., Guan, P., Lin, Z., Zhou, Y., Lu, X., Lin, X., Xu, G., 2022. Identification and Validation of TRIM25 as a Glucose Metabolism Regulator in Prostate Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 9325. <https://doi.org/10.3390/ijms23169325>
- Li, F., Sun, Q., Liu, K., Zhang, L., Lin, N., You, K., Liu, M., Kon, N., Tian, F., Mao, Z., Li, T., Tong, T., Qin, J., Gu, W., Li, D., Zhao, W., 2020. OTUD5 cooperates with TRIM25 in transcriptional regulation and tumor progression via deubiquitination activity. *Nat. Commun.* 11, 4184. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17926-7>
- Li, Y., Wu, H., Wu, W., Zhuo, W., Liu, W., Zhang, Y., Cheng, M., Chen, Y.-G., Gao, N., Yu, H., Wang, L., Li, W., Yang, M., 2014. Structural insights into the TRIM family of ubiquitin E3 ligases. *Cell Res.* 24, 762–765. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.46>
- Lombardo, S., Bramanti, A., Ciurleo, R., Basile, M., Pennisi, M., Bella, R., Mangano, K., Bramanti, P., Nicoletti, F., Fagone, P., 2020. Profiling of inhibitory immune checkpoints in glioblastoma: Potential pathogenetic players. *Oncol. Lett.* 20, 332. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12195>
- Lopes Abath Neto, O., Aldape, K., 2021. Morphologic and Molecular Aspects of Glioblastomas. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 32, 149–158. <https://doi.org/10.1016/j.nec.2021.01.001>
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., Ellison, D.W., 2016. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 131, 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
- 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-Oncol.* 23, 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>

- Lu, J., Wu, T., Zhang, B., Liu, S., Song, W., Qiao, J., Ruan, H., 2021. Types of nuclear localization signals and mechanisms of protein import into the nucleus. *Cell Commun. Signal.* 19, 60. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00741-y>
- Ma, Q., Jiang, H., Ma, L., Zhao, G., Xu, Q., Guo, D., He, N., Liu, H., Meng, Z., Liu, J., Zhu, L., Lin, Q., Wu, X., Li, M., Luo, S., Fang, J., Lu, Z., 2023. The moonlighting function of glycolytic enzyme enolase-1 promotes choline phospholipid metabolism and tumor cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 120, e2209435120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2209435120>
- Mariani, L., Beaudry, C., McDonough, W.S., Hoelzinger, D.B., Kaczmarek, E., Ponce, F., Coons, S.W., Giese, A., Seiler, R.W., Berens, M.E., 2001. Death-associated protein 3 (Dap-3) is overexpressed in invasive glioblastoma cells in vivo and in glioma cell lines with induced motility phenotype in vitro. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 7, 2480–2489.
- McKinnon, C., Nandhabalan, M., Murray, S.A., Plaha, P., 2021. Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management. *BMJ* n1560. <https://doi.org/10.1136/bmj.n1560>
- Meroni, G., Desagher, S., 2022. Cellular Function of TRIM E3 Ubiquitin Ligases in Health and Disease. *Cells* 11, 250. <https://doi.org/10.3390/cells11020250>
- Mirzalieva, O., Juncker, M., Schwartzburg, J., Desai, S., 2022. ISG15 and ISGylation in Human Diseases. *Cells* 11, 538. <https://doi.org/10.3390/cells11030538>
- Momota, H., Iwami, K., Fujii, M., Motomura, K., Natsume, A., Ogino, J., Hasegawa, T., Wakabayashi, T., 2011. Rhabdoid glioblastoma in a child: case report and literature review. *Brain Tumor Pathol.* 28, 65–70. <https://doi.org/10.1007/s10014-010-0010-4>
- Nakasato, N., Ikeda, K., Urano, T., Horie-Inoue, K., Takeda, S., Inoue, S., 2006. A ubiquitin E3 ligase Efp is up-regulated by interferons and conjugated with ISG15. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.061>

- National Center for Biotechnology Information (NCBI), 1988. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. NCBI. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Oshiumi, H., Miyashita, M., Matsumoto, M., Seya, T., 2013. A Distinct Role of Riplet-Mediated K63-Linked Polyubiquitination of the RIG-I Repressor Domain in Human Antiviral Innate Immune Responses. *PLoS Pathog.* 9, e1003533. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003533>
- Ostrom, Q.T., Francis, S.S., Barnholtz-Sloan, J.S., 2021. Epidemiology of Brain and Other CNS Tumors. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 21, 68. <https://doi.org/10.1007/s11910-021-01152-9>
- Pan, Y., Monje, M., 2022. Neuron–Glial Interactions in Health and Brain Cancer. *Adv. Biol.* 6, 2200122. <https://doi.org/10.1002/adbi.202200122>
- 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. *Nat. Commun.* 7, 12513. <https://doi.org/10.1038/ncomms12513>
- Park, J.M., Yang, S.W., Yu, K.R., Ka, S.H., Lee, S.W., Seol, J.H., Jeon, Y.J., Chung, C.H., 2014. Modification of PCNA by ISG15 Plays a Crucial Role in Termination of Error-Prone Translesion DNA Synthesis. *Mol. Cell* 54, 626–638. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.031>
- Peters, A., 2004. A fourth type of neuroglial cell in the adult central nervous system. *J. Neurocytol.* 33, 345–357. <https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000044195.64009.27>
- Ponting, C., 1997. SPRY domains in ryanodine receptors (Ca²⁺-release channels). *Trends Biochem. Sci.* 22, 193–194. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01049-9](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01049-9)
- Qin, H., Yuan, Y., Yuan, M., Wang, H., Yang, Y., 2023. Degradation of AZGP1 suppresses the progression of breast cancer cells via TRIM25. *Environ. Toxicol.* tox.24016. <https://doi.org/10.1002/tox.24016>

- Qin, Y., Cui, H., Zhang, H., 2016. Overexpression of TRIM25 in Lung Cancer Regulates Tumor Cell Progression. *Technol. Cancer Res. Treat.* 15, 707–715. <https://doi.org/10.1177/1533034615595903>
- Rahimi-Tesiye, M., Zaersabet, M., Salehiyeh, S., Jafari, S.Z., 2023. The role of TRIM25 in the occurrence and development of cancers and inflammatory diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1878, 188954. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.188954>
- Rossi, M., Magnoni, L., Miracco, C., Mori, E., Tosi, P., Pirtoli, L., Tini, P., Oliveri, G., Cosci, E., Bakker, A., 2011. β -catenin and Gli1 are prognostic markers in glioblastoma. *Cancer Biol. Ther.* 11, 753–761. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.8.14894>
- Sakuma, M., Akahira, J., Suzuki, T., Inoue, S., Ito, K., Moriya, T., Sasano, H., Okamura, K., Yaegashi, N., 2005. Expression of estrogen-responsive finger protein (Efp) is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 99, 664–670. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.07.103>
- Sanchez, J.G., Chiang, J.J., Sparrer, K.M.J., Alam, S.L., Chi, M., Roganowicz, M.D., Sankaran, B., Gack, M.U., Pornillos, O., 2016. Mechanism of TRIM25 Catalytic Activation in the Antiviral RIG-I Pathway. *Cell Rep.* 16, 1315–1325. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.070>
- Sanchez, J.G., Okreglicka, K., Chandrasekaran, V., Welker, J.M., Sundquist, W.I., Pornillos, O., 2014. The tripartite motif coiled-coil is an elongated antiparallel hairpin dimer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 2494–2499. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318962111>
- Sánchez-Aparicio, M.T., Ayllón, J., Leo-Macias, A., Wolff, T., García-Sastre, A., 2017. Subcellular Localizations of RIG-I, TRIM25, and MAVS Complexes. *J. Virol.* 91, e01155-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01155-16>
- Sandy, Z., Da Costa, I.C., Schmidt, C.K., 2020. More than Meets the ISG15: Emerging Roles in the DNA Damage Response and Beyond. *Biomolecules* 10, 1557. <https://doi.org/10.3390/biom10111557>

- Sato, W., Ikeda, K., Urano, T., Abe, Y., Nakasato, N., Horie-Inoue, K., Takeda, S., Inoue, S., 2018. Efp promotes in vitro and in vivo growth of endometrial cancer cells along with the activation of nuclear factor- κ B signaling. *PLOS ONE* 13, e0208351. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208351>
- Shang, Y., Li, Y., Zhang, Y., Wang, J., 2019. ZNF436 promotes tumor cell proliferation through transcriptional activation of BCL10 in glioma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 515, 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.004>
- Shimada, N., Suzuki, T., Inoue, S., Kato, K., Imatani, A., Sekine, H., Ohara, S., Shimosegawa, T., Sasano, H., 2004. Systemic distribution of estrogen-responsive finger protein (Efp) in human tissues. *Mol. Cell. Endocrinol.* 218, 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.12.008>
- Shinojima, N., Kochi, M., Hamada, J.-I., Nakamura, H., Yano, S., Makino, K., Tsuiki, H., Tada, K., Kuratsu, J.-I., Ishimaru, Y., Ushio, Y., 2004. The influence of sex and the presence of giant cells on postoperative long-term survival in adult patients with supratentorial glioblastoma multiforme. *J. Neurosurg.* 101, 219–226. <https://doi.org/10.3171/jns.2004.101.2.0219>
- Shrestha, R., Millington, O., Brewer, J., Bushell, T., 2014. Is Central Nervous System an Immune-Privileged Site? *Kathmandu Univ. Med. J.* 11, 102–107. <https://doi.org/10.3126/kumj.v11i1.11055>
- Silver, P.A., 1991. How proteins enter the nucleus. *Cell* 64, 489–497. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90233-O](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90233-O)
- Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., Simons, M., 2019. Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiol. Rev.* 99, 1381–1431. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2018>
- Stevens, R.V., Esposito, D., Rittinger, K., 2019. Characterisation of class VI TRIM RING domains: linking RING activity to C-terminal domain identity. *Life Sci. Alliance* 2, e201900295. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900295>
- Takayama, K., Suzuki, T., Tanaka, T., Fujimura, T., Takahashi, S., Urano, T., Ikeda, K., Inoue, S., 2018. TRIM25 enhances cell growth and cell survival by

- modulating p53 signals via interaction with G3BP2 in prostate cancer. *Oncogene* 37, 2165–2180. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0095-x>
- Takeuchi, T., Inoue, S., Yokosawa, H., 2006. Identification and Herc5-mediated ISGylation of novel target proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 473–477. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.076>
- Tecalco Cruz, A.C., Mejía-Barreto, K., 2017. Cell type-dependent regulation of free ISG15 levels and ISGylation. *J. Cell Commun. Signal.* 11, 127–135. <https://doi.org/10.1007/s12079-017-0385-7>
- Tecalco-Cruz, A.C., Abraham-Juárez, M.J., Solleiro-Villavicencio, H., Ramírez-Jarquín, J.O., 2021. TRIM25: A central factor in breast cancer. *World J. Clin. Oncol.* 12, 646–655. <https://doi.org/10.5306/wjco.v12.i8.646>
- Tecalco-Cruz, A.C., Cruz-Ramos, E., 2018. Protein ISGylation and free ISG15 levels are increased by interferon gamma in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 499, 973–978. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.030>
- 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. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 621, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.07.011>
- Urano, T., Saito, T., Tsukui, T., Fujita, M., Hosoi, T., Muramatsu, M., Ouchi, Y., Inoue, S., 2002. Efp targets 14-3-3j for proteolysis and promotes breast tumour growth 417.
- van Gent, M., Sparrer, K.M.J., Gack, M.U., 2018. TRIM Proteins and Their Roles in Antiviral Host Defenses. *Annu. Rev. Virol.* 5, 385–405. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092917-043323>
- Venkatesh, H.S., Morishita, W., Geraghty, A.C., Silverbush, D., Gillespie, S.M., Arzt, M., Tam, L.T., Espenel, C., Ponnuswami, A., Ni, L., Woo, P.J., Taylor, K.R., Agarwal, A., Regev, A., Brang, D., Vogel, H., Hervey-Jumper, S., Bergles, D.E., Suvà, M.L., Malenka, R.C., Monje, M., 2019. Electrical and synaptic integration of glioma into neural circuits. *Nature* 573, 539–545. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1563-y>

- Von Bartheld, C.S., Bahney, J., Herculano-Houzel, S., 2016. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J. Comp. Neurol.* 524, 3865–3895. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>
- Walsh, L.A., Alvarez, M.J., Sabio, E.Y., Reyngold, M., Makarov, V., Mukherjee, S., Lee, K.-W., Desrichard, A., Turcan, Ş., Dalin, M.G., Rajasekhar, V.K., Chen, S., Vahdat, L.T., Califano, A., Chan, T.A., 2017. An Integrated Systems Biology Approach Identifies TRIM25 as a Key Determinant of Breast Cancer Metastasis. *Cell Rep.* 20, 1623–1640. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.07.052>
- Wang, J., Yin, G., Bian, H., Yang, J., Zhou, P., Yan, K., Liu, C., Chen, P., Zhu, J., Li, Z., Xue, T., 2021. LncRNA XIST upregulates TRIM25 via negatively regulating miR-192 in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Mol. Med.* 27, 41. <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00278-3>
- Wang, L., Ning, S., 2021. TRIMming Type I Interferon-Mediated Innate Immune Response in Antiviral and Antitumor Defense. *Viruses* 13, 279. <https://doi.org/10.3390/v13020279>
- Wang, Y., Xie, X., Li, S., Zhang, D., Zheng, H., Zhang, M., Zhang, Z., 2021. Co-overexpression of R1OK1 and AKT1 as a prognostic risk factor in glioma. *J. Cancer* 12, 5745–5752. <https://doi.org/10.7150/jca.60596>
- Wang, Z., Tong, D., Han, C., Zhao, Z., Wang, X., Jiang, T., Li, Q., Liu, S., Chen, L., Chen, Y., Li, A., Huang, C., 2019. Blockade of miR-3614 maturation by IGF2BP3 increases TRIM25 expression and promotes breast cancer cell proliferation. *EBioMedicine* 41, 357–369. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.061>
- Wardlaw, C.P., Petrini, J.H.J., 2023. ISG15: A link between innate immune signaling, DNA replication, and genome stability. *BioEssays* 45, 2300042. <https://doi.org/10.1002/bies.202300042>
- Wei, J., Wang, L., Zhang, Y., Sun, T., Zhang, C., Hu, Z., Zhou, L., Liu, X., Wan, J., Ma, L., 2023. TRIM25 promotes temozolomide resistance in glioma by regulating oxidative stress and ferroptotic cell death via the ubiquitination of

- keap1. *Oncogene* 42, 2103–2112. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02717-3>
- Williams, F.P., Haubrich, K., Perez-Borrajero, C., Hennig, J., 2019. Emerging RNA-binding roles in the TRIM family of ubiquitin ligases. *Biol. Chem.* 400, 1443–1464. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0158>
- Woolfson, D.N., 2017. Coiled-Coil Design: Updated and Upgraded, in: Parry, D.A.D., Squire, J.M. (Eds.), *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms, Subcellular Biochemistry*. Springer International Publishing, Cham, pp. 35–61. https://doi.org/10.1007/978-3-319-49674-0_2
- Yan, Y., Zhou, S., Chen, X., Yi, Q., Feng, S., Zhao, Z., Liu, Y., Liang, Q., Xu, Z., Li, Z., Sun, L., 2024. Suppression of ITPKB degradation by Trim25 confers TMZ resistance in glioblastoma through ROS homeostasis. *Signal Transduct. Target. Ther.* 9, 58. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01763-x>
- Yang, Q., Zhou, J., 2019. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. *Glia* 67, 1017–1035. <https://doi.org/10.1002/glia.23571>
- Yu, L., Ren, Y., 2022. Long Noncoding RNA Small Nucleolar RNA Host Gene 3 Mediates Prostate Cancer Migration, Invasion, and Epithelial-Mesenchymal Transition by Sponging miR-487a-3p to Regulate *TRIM25*. *Cancer Biother. Radiopharm.* 37, 451–465. <https://doi.org/10.1089/cbr.2020.3988>
- Zhang, D., Zhang, D.-E., 2011. Interferon-Stimulated Gene 15 and the Protein ISGylation System. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 119–130. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0110>
- Zhang, W., Zhu, L., Yang, G., Zhou, B., Wang, J., Qu, X., Yan, Z., Qian, S., Liu, R., 2020. Hsa_circ_0026134 expression promoted TRIM25- and IGF2BP3-mediated hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion via sponging miR-127-5p. *Biosci. Rep.* 40, BSR20191418. <https://doi.org/10.1042/BSR20191418>
- Zhao, M., Ma, H., Cheng, P., Yang, H., Zhao, Y., Han, Q., 2022. Apatinib combined with temozolomide treatment for pseudoprogression in glioblastoma: A case

- report. *Medicine (Baltimore)* 101, e32156.
<https://doi.org/10.1097/MD.00000000000032156>
- Zheng, X., Wang, X., Tu, F., Wang, Q., Fan, Z., Gao, G., 2017. TRIM25 Is Required for the Antiviral Activity of Zinc Finger Antiviral Protein. *J. Virol.* 91, e00088-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00088-17>
- Zhou, H., Costello, J.C., 2017. All Paths Lead to TRIM25. *Trends Cancer* 3, 673–675. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.08.005>
- Zhou, H.-Y., Wang, Y.-C., Wang, T., Wu, W., Cao, Y.-Y., Zhang, B.-C., Wang, M.-D., Mao, P., 2024. CCNA2 and NEK2 regulate glioblastoma progression by targeting the cell cycle. *Oncol. Lett.* 27, 206. <https://doi.org/10.3892/ol.2024.14339>
- Zhou, S., Peng, J., Xiao, L., Zhou, C., Fang, Y., Ou, Q., Qin, J., Liu, M., Pan, Z., Hou, Z., 2021. TRIM25 regulates oxaliplatin resistance in colorectal cancer by promoting EZH2 stability. *Cell Death Dis.* 12, 463. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03734-4>
- Zou, W., Wang, J., Zhang, D.-E., 2007. Negative regulation of ISG15 E3 ligase EFP through its autoISGylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.210>
- Zou, W., Zhang, D.-E., 2006. The Interferon-inducible Ubiquitin-protein Isopeptide Ligase (E3) EFP Also Functions as an ISG15 E3 Ligase. *J. Biol. Chem.* 281, 3989–3994. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510787200>
- Zuo, C., Sheng, X., Ma, M., Xia, M., Ouyang, L., 2016. ISG15 in the tumorigenesis and treatment of cancer: An emerging role in malignancies of the digestive system. *Oncotarget* 7, 74393–74409. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11911>

12. Anexos

Anexo 1. Genes cuya expresión disminuyó ante la reducción de los niveles de TRIM25 en células A-172 derivadas de un paciente con glioblastoma.

Símbolo del gen (Genebank)	Nombre del gen	Z-score	Fold change
<i>TFG</i>	T rafficking from ER to golgi regulator	-3.48	-1.70
<i>SMARCB1</i>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1	-2.87	-1.51
<i>TNFRSF14</i>	TNF receptor superfamily member 14	-2.79	-1.55
<i>IFI27L2</i>	Interferon alpha inducible protein 27 like 2	-2.58	-1.54
<i>DAP3</i>	Death associated protein 3	-2.52	-1.46
<i>FAU</i>	FAU ubiquitin like and ribosomal protein S30 fusion	-2.47	-1.46
<i>NME3</i>	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 3	-2.45	-1.50
<i>SFFV</i>	Homo sapiens spleen focus forming virus proviral integration oncogene spi1 (SPI1)	-2.38	-1.35
<i>RPS16</i>	Ribosomal protein S16	-2.34	-1.40
<i>USP6NL</i>	USP6 N-terminal like	-2.31	-1.37
<i>APP</i>	Amyloid beta precursor protein	-2.29	-1.45
<i>GAS8</i>	growth arrest specific 8	-2.29	-1.44
<i>EPS15P1</i>	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15 pseudogene 1	-2.24	-1.36
<i>MAFG</i>	MAF bZIP transcription factor G	-2.20	-1.57
<i>RXRA</i>	Retinoid X receptor alpha	-2.18	-1.39
<i>ERCC3</i>	ERCC excision repair 3, TFIIH core complex helicase subunit	-2.14	-1.41
<i>NDN</i>	Necdin, MAGE family member	-2.13	-1.67
<i>TFF1</i>	trefoil factor 1	-2.12	-1.44
<i>NR3C1</i>	Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1	-2.10	-1.34
<i>PRMT2</i>	Protein arginine methyltransferase 2	-2.10	-1.49
<i>GAS1</i>	Growth arrest specific 1	-2.08	-1.48
<i>RAB3D</i>	RAB3D, member RAS oncogene family	-2.07	-1.41
<i>EVPL</i>	Envoplakin	-2.06	-1.34
<i>MLH1</i>	MutL homolog 1	-2.05	-1.28
<i>IL11RA</i>	Interleukin 11 receptor subunit alpha	-2.04	-1.38
<i>AVP</i>	Arginine vasopressin	-2.03	-1.42

<i>PPP4C</i>	Protein phosphatase 4 catalytic subunit	-2.00	-1.33
<i>MAGED1</i>	MAGE family member D1	-1.96	-1.31
<i>PRDM10</i>	PR/SET domain 10	-1.94	-1.40
<i>COL4A2</i>	Collagen type IV alpha 2 chain	-1.93	-1.31
<i>RASSF7</i>	Ras association domain family member 7	-1.92	-1.35
<i>TIE1</i>	Tyrosine kinase with immunoglobulin like and EGF like domains 1	-1.91	-1.31
<i>SERPINB6</i>	Serpin family B member 6	-1.91	-1.35
<i>RAD23A</i>	RAD23 homolog A, nucleotide excision repair protein	-1.90	-1.37
<i>ABO</i>	ABO, alpha 1-3-N-acetylgalactosaminyltransferase and alpha 1-3-galactosyltransferase	-1.89	-1.46
<i>PTPRF</i>	Protein tyrosine phosphatase receptor type F	-1.88	-1.24
<i>LHB</i>	Luteinizing hormone subunit beta	-1.87	-1.34
<i>FOXH1</i>	Forkhead box H1	-1.87	-1.33
<i>PITPNA</i>	Phosphatidylinositol transfer protein alpha	-1.86	-1.46
<i>YWHAE</i>	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein epsilon	-1.85	-1.30
<i>GATM</i>	Glycine amidinotransferase	-1.85	-1.29
<i>PATZ1</i>	POZ/BTB and AT hook containing zinc finger 1	-1.84	-1.61
<i>REG1A</i>	Regenerating family member 1 alpha	-1.84	-1.38
<i>CCNC</i>	cyclin C	-1.82	-1.41
<i>FES</i>	FES proto-oncogene, tyrosine kinase	-1.82	-1.22
<i>CDKN1A</i>	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	-1.80	-1.37
<i>CCDC6</i>	Coiled-coil domain containing 6	-1.80	-1.32
<i>GSTA2</i>	Glutathione S-transferase alpha 2	-1.79	-1.50
<i>TNFSF4</i>	TNF superfamily member 4	-1.79	-1.22
<i>MEST</i>	Mesoderm specific transcript	-1.78	-1.25
<i>CTDSP2</i>	CTD small phosphatase 2	-1.77	-1.34
<i>WFDC2</i>	WAP four-disulfide core domain 2	-1.77	-1.25
<i>MAN2A2</i>	Mannosidase alpha class 2A member 2	-1.76	-1.32
<i>FXYD3</i>	FXYD domain containing ion transport regulator 3	-1.75	-1.33
<i>OR3A1</i>	Olfactory receptor family 3 subfamily A member 1	-1.74	-1.27
<i>CTBP1</i>	C-terminal binding protein 1	-1.74	-1.52
<i>RAPGEF1</i>	Rap guanine nucleotide exchange factor 1	-1.74	-1.32
<i>VIPR1</i>	Vasoactive intestinal peptide receptor 1	-1.73	-1.32
<i>NKX2-8</i>	NK2 homeobox 8	-1.72	-1.31

<i>HPS1</i>	HPS1 biogenesis of lysosomal organelles complex 3 subunit 1	-1.71	-1.33
<i>SYT1</i>	Synaptotagmin 1	-1.71	-1.41
<i>NR2C2</i>	Nuclear receptor subfamily 2 group C member 2	-1.70	-1.23
<i>MST1R</i>	Macrophage stimulating 1 receptor	-1.70	-1.34
<i>ITPR3</i>	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3	-1.70	-1.21
<i>INSM1</i>	INSM transcriptional repressor 1	-1.69	-1.24
<i>PPP2R5B</i>	Protein phosphatase 2 regulatory subunit B'beta	-1.69	-1.33
<i>HYAL1</i>	Hyaluronidase 1	-1.67	-1.35
<i>RRAS</i>	RAS related	-1.67	-1.26
<i>CD99</i>	CD99 molecule (Xg blood group)	-1.66	-1.30
<i>ALOX15</i>	Arachidonate 15-lipoxygenase	-1.65	-1.37
<i>MAS1</i>	MAS1 proto-oncogene, G protein-coupled receptor	-1.65	-1.26
<i>NINJ1</i>	Ninjurin 1	-1.65	-1.26
<i>CSF1R</i>	Colony stimulating factor 1 receptor	-1.64	-1.39
<i>PBOV1</i>	Prostate and breast cancer overexpressed 1	-1.63	-1.21
<i>MLANA</i>	Melan-A	-1.62	-1.39
<i>TSPAN4</i>	Tetraspanin 4	-1.62	-1.39
<i>CXCL1</i>	C-X-C motif chemokine ligand 1	-1.61	-1.42
<i>MVK</i>	Mevalonate kinase	-1.60	-1.31
<i>BECN1</i>	beclin 1	-1.60	-1.29
<i>PPARD</i>	Peroxisome proliferator activated receptor delta	-1.60	-1.21
<i>TACC2</i>	Transforming acidic coiled-coil containing protein 2	-1.60	-1.39
<i>LGALS4</i>	Galectin 4	-1.60	-1.21
<i>GLI2</i>	GLI family zinc finger 2	-1.60	-1.31
<i>PGR</i>	Progesterone receptor	-1.59	-1.25
<i>SERPINB1</i>	Serpin family B member 1	-1.59	-1.17
<i>NR4A3</i>	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 3	-1.59	-1.38
<i>CAPRN1</i>	Cell cycle associated protein 1	-1.59	-1.28
<i>MN1</i>	MN1 proto-oncogene, transcriptional regulator	-1.59	-1.30
<i>MTAP</i>	Methylthioadenosine phosphorylase	-1.59	-1.20
<i>TCF12</i>	Transcription factor 12	-1.58	-1.46
<i>PTPRN2</i>	Protein tyrosine phosphatase receptor type N2	-1.55	-1.21
<i>PABPC1</i>	Poly(A) binding protein cytoplasmic 1	-1.54	-1.22
<i>COL7A1</i>	Collagen type VII alpha 1 chain	-1.53	-1.29
<i>SERPINB13</i>	Serpin family B member 13	-1.52	-1.23

<i>DOC1</i>	Homo sapiens downregulated in ovarian cancer 1	-1.52	-1.28
<i>ZNF71</i>	Zinc finger protein 71	-1.51	-1.46
<i>RPL38</i>	Ribosomal protein L38	-1.50	-1.19
<i>MARCKS</i>	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	-1.50	-1.28

Anexo 2. Genes cuya expresión incrementó ante la reducción de los niveles de TRIM25 en células A-172 derivadas de un paciente con glioblastoma.

Símbolo del gen (Genebank)	Nombre del gen	Z- score	Fold change
<i>MPO</i>	Myeloperoxidase	3.55	1.60
<i>CD160</i>	CD160 molecule	3.25	1.51
<i>NCK1</i>	NCK adaptor protein 1	3.07	1.59
<i>EIF3E</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	3.02	1.61
<i>XRCC2</i>	X-ray repair cross complementing 2	2.84	1.42
<i>DCT</i>	Dopachrome tautomerase	2.84	1.60
<i>BMI1</i>	BMI1 proto-oncogene, polycomb ring finger	2.71	1.52
<i>FOLR1</i>	Folate receptor alpha	2.63	1.45
<i>STMN2</i>	Stathmin 2	2.61	1.57
<i>SEMA3F</i>	Semaphorin 3F	2.59	1.48
<i>PTCH2</i>	Patched 2	2.59	1.68
<i>NPRL2</i>	NPR2 like, GATOR1 complex subunit	2.56	1.53
<i>LYST</i>	Lysosomal trafficking regulator	2.55	1.33
<i>ETV4</i>	ETS variant transcription factor 4	2.48	1.37
<i>CALCA</i>	Calcitonin related polypeptide alpha	2.45	1.47
<i>JUN</i>	Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	2.41	1.34
<i>IFNA6</i>	Interferon alpha 6	2.41	1.44
<i>CTSV</i>	Cathepsin V	2.36	1.35
<i>GOLGA2</i>	Golgin A2	2.36	1.48
<i>RECQL</i>	RecQ like helicase	2.35	1.34
<i>CYP7B1</i>	Cytochrome P450 family 7 subfamily B member 1	2.35	1.44
<i>INTS6</i>	Integrator complex subunit 6	2.33	1.58
<i>TOM1</i>	Target of myb1 membrane trafficking protein	2.32	1.34
<i>GCNT3</i>	Glucosaminyl-N-acetyl- transferase 3, mucin type	2.32	1.64
<i>TPD52</i>	Tumor protein D52	2.31	1.59
<i>ADGRB1</i>	Adhesion G protein-coupled receptor B1	2.31	1.52

<i>IDI1</i>	Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	2.31	1.44
<i>NOL4</i>	Nucleolar protein 4	2.30	1.42
<i>STAT5B</i>	Signal transducer and activator of transcription 5B	2.29	1.58
<i>CCNA2</i>	Cyclin A2	2.28	1.46
<i>ULBP1</i>	UL16 binding protein 1	2.28	1.73
<i>IFNA8</i>	Interferon alpha 8	2.27	1.55
<i>CRISP3</i>	Cysteine rich secretory protein 3	2.26	1.43
<i>THRB</i>	Thyroid hormone receptor beta	2.25	1.36
<i>TAGLN</i>	Transgelin	2.24	1.51
<i>TERF1</i>	Telomeric repeat binding factor 1	2.22	1.44
<i>MCL1</i>	MCL1 apoptosis regulator, BCL2 family member	2.22	1.34
<i>FAS</i>	Fas cell surface death receptor	2.21	1.56
<i>PSG3</i>	Pregnancy specific beta-1-glycoprotein 3	2.21	1.43
<i>BUB1B</i>	BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase B	2.21	1.33
<i>NTRK2</i>	Neurotrophic receptor tyrosine kinase 2	2.19	1.46
<i>IL2RA</i>	Interleukin 2 receptor subunit alpha	2.18	1.41
<i>NQO1</i>	NADPH quinone dehydrogenase 1	2.18	1.41
<i>KLK10</i>	Kallikrein related peptidase 10	2.18	1.47
<i>TP53I3</i>	Tumor protein p53 inducible protein 3	2.15	1.43
<i>PNP</i>	Purine nucleoside phosphorylase	2.15	1.33
<i>ABCC3</i>	ATP binding cassette subfamily C member 3	2.14	1.57
<i>MAZ</i>	MYC associated zinc finger protein	2.14	1.34
<i>MMP14</i>	Matrix metalloproteinase 14	2.13	1.38
<i>IGFBP6</i>	Insulin like growth factor binding protein 6	2.13	1.60
<i>SERPINB3</i>	Serpin family B member 3	2.10	1.52
<i>EBAG9</i>	Estrogen receptor binding site associated antigen 9	2.08	1.46
<i>PTH1R</i>	Parathyroid hormone 1 receptor	2.08	1.34
<i>UGCG</i>	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	2.07	1.38
<i>DDB2</i>	Damage specific DNA binding protein 2	2.06	1.33
<i>ADSL</i>	Adenylosuccinate lyase	2.05	1.62
<i>PPARG</i>	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	2.04	1.43
<i>RPL39L</i>	Ribosomal protein L39 like	2.02	1.55
<i>RAB6A</i>	RAB6A, member RAS oncogene family	2.01	1.32
<i>PAGE1</i>	PAGE family member 1	2.00	1.26
<i>PTPRU</i>	Protein tyrosine phosphatase receptor type U	1.99	1.49
<i>AKAP12</i>	A-kinase anchoring protein 12	1.98	1.42

<i>RFXAP</i>	Regulatory factor X associated protein	1.97	1.43
<i>MTHFR</i>	Methylenetetrahydrofolate reductase	1.97	1.36
<i>TOP2A</i>	DNA topoisomerase II alpha	1.94	1.34
<i>TYRP1</i>	Tyrosinase related protein 1	1.94	1.35
<i>LRP1B</i>	LDL receptor related protein 1B	1.93	1.26
<i>CEACAM7</i>	CEA cell adhesion molecule 7	1.90	1.36
<i>TNFSF18</i>	TNF superfamily member 18	1.90	1.40
<i>SLC12A2</i>	Solute carrier family 12 member 2	1.90	1.32
<i>MELTF</i>	Melanotransferrin	1.89	1.36
<i>HNRNPA3P1</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 pseudogene 1	1.89	1.56
<i>ST8SIA2</i>	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8- sialyltransferase 2	1.88	1.31
<i>SEMA3B</i>	Semaphorin 3B	1.88	1.27
<i>CLC</i>	Charcot-Leyden crystal galectin	1.87	1.54
<i>SRSF10</i>	Serine and arginine rich splicing factor 10	1.87	1.28
<i>TRPM5</i>	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 5	1.87	1.42
<i>ADAMTS8</i>	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 8	1.86	1.34
<i>ABCC4</i>	ATP binding cassette subfamily C member 4 , PEL blood group	1.86	1.28
<i>NBR1</i>	NBR1 autophagy cargo receptor	1.86	1.34
<i>ADAM17</i>	ADAM metallopeptidase domain 17	1.85	1.24
<i>STAG1</i>	STAG1 cohesin complex component	1.85	1.37
<i>IGFBP5</i>	Insulin like growth factor binding protein 5	1.85	1.56
<i>RPS12</i>	Ribosomal protein S12	1.84	1.60
<i>BDNF</i>	Brain derived neurotrophic factor	1.83	1.46
<i>PSG5</i>	Pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5	1.81	1.32
<i>CTAG2</i>	Cancer/testis antigen 2	1.81	1.32
<i>DVL3</i>	Dishevelled segment polarity protein 3	1.80	1.26
<i>NR2E1</i>	Nuclear receptor subfamily 2 group E member 1	1.80	1.23
<i>MSH3</i>	MutS homolog 3	1.79	1.44
<i>SMAD4</i>	SMAD family member 4	1.78	1.37
<i>EPHA3</i>	EPH receptor A3	1.77	1.31
<i>REG3A</i>	Regenerating family member 3 alpha	1.76	1.32

<i>KLK13</i>	Kallikrein related peptidase 13	1.75	1.42
<i>BCAN</i>	Brevican	1.75	1.41
<i>EIF4B</i>	Eukaryotic translation initiation factor 4B	1.75	1.46
<i>MYCN</i>	MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor	1.75	1.38
<i>PTPRO</i>	Protein tyrosine phosphatase receptor type O	1.75	1.32
<i>BCL10</i>	BCL10 immune signaling adaptor	1.73	1.25
<i>RAB22A</i>	RAB22A, member RAS oncogene family	1.73	1.24
<i>FANCF</i>	FA complementation group F	1.72	1.44
<i>MAGEC1</i>	MAGE family member C1	1.72	1.26
<i>UMPS</i>	Uridine monophosphate synthetase	1.72	1.40
<i>GET3</i>	Guided entry of tail-anchored proteins factor 3, ATPase	1.71	1.24
<i>ST8SIA1</i>	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 1	1.71	1.31
<i>ANXA7</i>	Annexin A7	1.70	1.22
<i>AKT1</i>	AKT serine/threonine kinase 1	1.70	1.36
<i>NEFM</i>	Neurofilament medium chain	1.68	1.28
<i>F2R</i>	Coagulation factor II thrombin receptor	1.67	1.25
<i>BAX</i>	BCL2 associated X, apoptosis regulator	1.67	1.28
<i>INHA</i>	Inhibin subunit alpha	1.67	1.30
<i>NCF1</i>	Neutrophil cytosolic factor 1	1.66	1.22
<i>USP4</i>	Ubiquitin specific peptidase 4	1.66	1.23
<i>RAB10</i>	RAB10, member RAS oncogene family	1.65	1.39
<i>NBN</i>	Nibrin	1.64	1.28
<i>AIM2</i>	Absent in melanoma 2	1.64	1.32
<i>TOPORS</i>	TOP1 binding arginine/serine rich protein, E3 ubiquitin ligase	1.63	1.22
<i>VIM</i>	Vimentin	1.62	1.33
<i>NDC80</i>	NDC80 kinetochore complex component	1.61	1.42
<i>LRP2</i>	LDL receptor related protein 2	1.61	1.36
<i>UCHL1</i>	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1	1.61	1.39
<i>DUT</i>	Deoxyuridine triphosphatase	1.61	1.31
<i>BAP1</i>	BRCA1 associated protein 1	1.61	1.37
<i>RAB1A</i>	RAB1A, member RAS oncogene family	1.61	1.48
<i>RPS19</i>	Ribosomal protein S19	1.60	1.26
<i>LPAR2</i>	Lysophosphatidic acid receptor 2	1.60	1.49

<i>GLI1</i>	GLI family zinc finger 1	1.59	1.40
<i>HMGA1</i>	High mobility group AT-hook 1	1.59	1.29
<i>METAP2</i>	Methionyl aminopeptidase 2	1.57	1.29
<i>SLC3A2</i>	Solute carrier family 3 member 2	1.57	1.18
<i>KLK5</i>	Kallikrein related peptidase 5	1.57	1.28
<i>TIMP4</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 4	1.57	1.29
<i>C3</i>	Complement C3	1.56	1.25
<i>CAV1</i>	Caveolin 1	1.56	1.38
<i>CRK</i>	CRK proto-oncogene, adaptor protein	1.56	1.19
<i>SLC13A4</i>	Solute carrier family 13 member 4	1.56	1.20
<i>VAMP2</i>	Vesicle associated membrane protein 2	1.54	1.20
<i>PLAAT4</i>	Phospholipase A and acyltransferase 4	1.54	1.36
<i>TCRA</i>	H.sapiens rearranged TCRA HW3a mRNA	1.54	1.27
<i>NME2</i>	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2	1.54	1.25
<i>MBOAT7</i>	Membrane bound O-acyltransferase domain containing 7	1.54	1.28
<i>GPRC5A</i>	G protein-coupled receptor class C group 5 member A	1.54	1.26
<i>DCC</i>	Homo sapiens deleted in colorectal carcinoma	1.53	1.28
<i>RAB1F</i>	RAB interacting factor	1.53	1.37
<i>POM121L1P</i>	POM121 transmembrane nucleoporin like 1, pseudogene	1.52	1.32
<i>RBBP8</i>	Homo sapiens retinoblastoma binding protein 8	1.52	1.25
<i>HDAC1</i>	Histone deacetylase 1	1.50	1.25

Anexo 3. Genes DOWN-regulated en células A-172 con niveles reducidos de TRIM25 que componen las ontologías génicas mayormente enriquecidas.

GO	GO enriquecida	Número de genes	Genes DOWN
Componente celular	Cytoplasm	49	<i>CAPRIN1, PBOV1, MVK, GAS8, TACC2, GATM, FES, RAPGEF1, GLI2, PGR, PPP2R5B, NR2C2, PPP4C, NDN, RASSF7, NR3C1, RPL38, CTBP1, MARCKS, NME3, ITPR3, TCF12, HYAL1, YWHAE, LHB, PABPC1, BECN1, APP,</i>

			<i>CCDC6, CD99, MAGED1, PRMT2, PITPNA, MTAP, ALOX15, TFG, RXRA, RPS16, FAU, RAD23A, SERPINB1, SERPINB13, SERPINB6, GSTA2, EVPL, SYT1, CDK2AP1, HPS1, CDKN1A,</i>
	Nuclear	32	<i>PBOV1, CSF1R, INSM1, CCNC, TACC2, GLI2, PGR, NR2C2, PPP4C, DAP3, NDN, NR3C1, NR4A3, CTBP1, CTDSP2, ITPR3, TCF12, ERCC3, SMARCB1, MAFG, PPARD, PRMT2, MTAP, RXRA, RPS16, FAU, RAD23A, SERPINB13, MLH1, CDK2AP1, PATZ1, CDKN1A</i>
Procesos biológicos	Positive Regulation of Transcription By RNA Polymerase II	18	<i>ZNF71, CCNC, NKX2-8, GLI2, PGR, PPP2R5B, NR2C2, NDN, NR3C1, NR4A3, PRDM10, TCF12, FXH1, SMARCB1, MAFG, APP, PPARD, RXRA</i>
	Negative Regulation of Cell Population Proliferation	10	<i>CSF1R, INSM1, GAS8, CTBP1, CXCL1, SMARCB1, BECN1, APP, TFF1, CDKN1A</i>
	Positive Regulation of Cell Population Proliferation	10	<i>AVP, TNFSF4, CSF1R, INSM1, GLI2, VIPR1, REG1A, MAS1, MST1R, IL11RA</i>
Funcion molecular	Protein Binding	82	<i>CAPRIN1, AVP, TNFSF4, CSF1R, MVK, NINJ1, GAS1, GAS8, ZNF71, CCNC, GATM, FES, TIE1, RAPGEF1, WFDC2, GLI2, PTPRF, PGR, PPP2R5B, COL4A2, COL7A1, NR2C2, PPP4C, VIPR1, DAP3, NDN, RASSF7, NR3C1, NR4A3, RPL38, CTBP1, CTDSP2, MEST, NME3, PRDM10, ITPR3, MN1, TCF12, LGALS4, MAS1, CXCL1, YWHAE, LHB, RRAS, ERCC3, MST1R, FOXH1, IL11RA, PABPC1, SMARCB1, BECN1, MAFG, APP, TNFRSF14, CCDC6, PPARD,</i>

			<i>CD99, RAB3D, MAGED1, PRMT2, PITPNA, TSPAN4, MTAP, ALOX15, TFF1, TFG, FXYD3, RXRA, RPS16, FAU, RAD23A, SERPINB1, SERPINB13, MLANA, EVPL, SYT1, MLH1, CDK2AP1, PATZ1, HPS1, CDKN1A, GSTA2</i>
	DNA-binding Transcription Factor Activity	12	<i>INSM1, NKX2-8, GLI2, PGR, NR2C2, NR3C1, NR4A3, TCF12, FOXH1, MAFG, PPARD, RXRA</i>

Anexo 4. Genes UP-regulated en células A-172 con niveles reducidos de TRIM25 que componen las ontologías génicas mayormente enriquecidas.

GO	GO enriquecida	Número de genes	Genes UP
Componente celular	Cytosol	63	<i>RPS19, NCF1, EIF3E, NCK1, MMP14, STAT5B, CEACAM7, EIF4B, ADSL, CCNA2, NQ01, GLI1, STMN2, VIM, BUB1B, KLK5, NDC80, TP5313, USP4, BAP1, HDAC1, DCC, BAX, METAP2, DVL3, EPHA3, DCT, NME2, UCHL1, AIM2, SMAD4, HMGA1, PLAAT4, AKAP12, BCL10, ULBP1, LYST, NTRK2, IDI1, AKT1, VAMP2, RAB1A, PPARG, UMPS, ADAM17, SRSF10, CLC, TOM1, CRK, FANCF, RPS12, RAB6A, RABIF, FAS, MCL1, BMI1, PNP, SERPINB3, STAG1, NBN, NBR1, RAB10, MTHFR</i>
	Extracellular Region	34	<i>CEACAM7, F2R, TIMP4, KLK10, KLK13, KLK5, MELTF, CD160, EPHA3, NME2, REG3A, CTSV, BCAN, FOLR1, C3, BDNF, MPO, SEMA3B, SEMA3F, PSG3, PSG5, CRISP3, IFNA6, IFNA8, CALCA, IGFBP5, FAS, IGFBP6, ADAMTS8, PNP, ADGRB1, SERPINB3, ST8SIA2, INHA</i>

Procesos biológicos	Positive Regulation of DNA-templated Transcription	17	<i>NCF1, TOPORS, CCNA2, MYCN, GLI1, F2R, HDAC1, DVL3, NME2, SMAD4, HMGA1, BCL10, JUN, MAZ, AKT1, PPARG, RFXAP</i>
	Positive Regulation of Cell Migration	9	<i>MMP14, GLI1, F2R, CAV1, MAZ, SEMA3B, SEMA3F, ADAM17, SERPINB3</i>
	Negative Regulation of Canonical Wnt Signaling Pathway	7	<i>GLI1, PTPRO, PTPRU, CAV1, HDAC1, SMAD4, IGFBP6</i>
	Cellular Response to Nerve Growth Factor Stimulus	4	<i>STMN2, AKT1, CRK, CALCA</i>
	Negative Regulation of Apoptotic Signaling Pathway	4	<i>BAX, BDNF, MAZ, BMI1</i>
Funcion molecular	Protein Binding	130	<i>RPS19, NCF1, SLC12A2, EIF3E, SLC13A4, NCK1, TNFSF18, THRB, NPRL2, MMP14, STAT5B, EIF4B, TOP2A, LRP1B, TOPORS, ABCC4, CCNA2, INTS6, MYCN, NQO1, GLI1, STMN2, TYRP1, F2R, PTPRO, TIMP4, PTPRU, LRP2, VIM, KLK13, BUB1B, NR2E1, KLK5, ANXA7, NDC80, CAV1, CTAG2, RBBP8, RPL39L, USP4, GET3, BAP1, HDAC1, DCC, MELTF, CD160, BAX, RECQL, DUT, GOLGA2, METAP2, XRCC2, DVL3, EPHA3, DCT, NME2, UCHL1, REG3A, DDB2, UGCG, AIM2, CTSV, NEFM, TAGLN, BCAN, MSH3, SMAD4, FOLR1, HMGA1, TRPM5, PLAAT4, AKAP12, BCL10, ULBP1, LYST, C3, EBAG9, JUN, NTRK2, BDNF, MPO, MAZ, IDI1, AKT1, NOL4, VAMP2, TPD52, RAB1A, RAB22A, TERF1, SEMA3B, SEMA3F, PPARG, PAGE1, PSG5,</i>

			<i>ADAM17, MBOAT7, SRSF10, CRISP3, CLC, IFNA6, IFNA8, MAGEC1, IL2RA, TOM1, CRK, FANCF, RPS12, RAB6A, SLC3A2, GPRC5A, CALCA, RABIF, IGFBP5, FAS, IGFBP6, MCL1, BMI1, PNP, ETV4, ADGRB1, ST8SIA1, LPAR2, STAG1, NBN, PTH1R, NBR1, INHA, RAB10, RFXAP</i>
	Identical Protein Binding	29	<i>RPS19, TNFSF18, STAT5B, ADSL, NQ01, TYRP1, VIM, NDC80, CAV1, RBBP8, USP4, BAX, DUT, GOLGA2, NME2, REG3A, AIM2, SMAD4, BCL10, JUN, AKT1, TERF1, PPARG, UMPS, CLC, CALCA, FAS, IGFBP6, PNP</i>
	Protein Homodimerization Activity	15	<i>STAT5B, TOP2A, TYRP1, PTPRO, TP5313, BAX, MSH3, SMAD4, NTRK2, AKT1, TPD52, TERF1, SLC3A2, MCL1, PTH1R</i>
	Signaling Receptor Binding	12	<i>NCK1, TNFSF18, F2R, CAV1, CD160, DVL3, C3, BDNF, SEMA3F, CALCA, IGFBP6, INHA</i>
	Chromatin Binding	12	<i>THR3, STAT5B, TOP2A, GLI1, BAP1, HDAC1, SMAD4, HMGA1, MPO, PPARG, BMI1, STAG1</i>