



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

“Implicaciones biológicas de las vías moleculares asociadas al factor ISG15 y a la ISGilación de proteínas”

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA.

PRESENTA:

KAREN HAIDEE MEDINA ABREU.



CDMX, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PEDRAZA CHAVERRI JOSÉ

VOCAL: GUTIERREZ AGUILAR MANUEL

SECRETARIO: TECALCO CRUZ ÁNGELES CONCEPCIÓN

1er SUPLENTE: VAZQUEZ MARTINEZ EDGAR RICARDO

2° SUPLENTE: LEON MIMILA PAOLA VIRIDIANA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO (UACM)

MODALIDAD: AULA VIRUTAL

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ÁNGELES CONCEPCIÓN TECALCO CRUZ

SUSTENTANTE:

KAREN HAIDEE MEDINA ABREU

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

El presente trabajo se desarrolló bajo la dirección de la **Dra. Ángeles C. Tecalco Cruz**, del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM). Este trabajo es parte de los proyectos de Investigación del Colegio de Ciencias y Tecnología (CCyT-2021-5) de la UACM.

Se agradece la asesoría técnica del **Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín** y la **Dra. Bibiana Ortega Domínguez**.

Se reconocen las valiosas observaciones y correcciones del jurado asignado conformado por:

PRESIDENTE	Prof. José Pedraza Chaverri
VOCAL	Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar
SECRETARIO	Dra. Angeles C. Tecalco Cruz
SUPLENTE	Prof. Edgar Ricardo Vázquez Martínez
SUPLENTE	Prof. Paola Viridiana Leon Mimila

Índice de figuras:

Figura 1 : Vía del interferón gamma para inducir la expresión de ISG15	14
Figura 2: Vía de activación mediada por interferones $\alpha/\beta/\gamma$	16
Figura 3:Traducción de ISG15.....	17
Figura 3.1:Comparación de dominios Ub e ISG15	17
Figura 4: ISGilación.....	18
Figura 5: Mecanismo de ISGilación y desISGilación.....	20
Figura 6:Actividades de ISG15.....	22
Figura 7:Cáncer	25
Figura 8:Partes de una neurona	36
Figura 9:ISGilación	46
Figura 10:ISGilación de una proteína viral	49
Figura 11:ISGilación para inhibir la replicación viral	49
Figura 12:ISGilación en la oligomerización viral	51
Figura 13:Ébola e ISG15.....	52
Figura 14:Mecanismos de evasión de virus.....	57

Índice de tablas:

Tabla 1:Familia de interferones	15
Cuadro 1:Diferencias entre ISG15 y Ub.....	21
Tabla 2:Lista de biomarcadores para cáncer de mama	27
Tabla 3:Lista de blancos terapéuticos y sus fármacos	27
Tabla 4:Clasificación del cancer de mama	28
Tabla 5:Localización de ISG15 en células cancerosas	29
Tabla 6:Proteínas involucradas en la proliferación celular	29
Tabla 7:Lista de ISG15 en diferentes cáncer	32
Tabla 8:Modificación de ISG15 en algunos tipos de cáncer	33
Tabla 9:Células de la neuroglia.....	34

Contenido General:

1. RESUMEN	7
2. LISTA DE ABREVIATURAS	7
3. INTRODUCCIÓN.....	10
3.1 PLANTEAMIENTO DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN.....	10
3.2 OBJETIVO GENERAL.....	11
3.3 OBJETIVOS PARTICULARES.....	11
3.4 ENFOQUE	11
4. CAPÍTULO 1.....	12
4.1 Generalidades de ISG15 y la ISGilación de proteínas	12
4.2 Características moleculares y estructurales de ISG15.....	17
4.3 Mecanismo de ISGilación y desISGilación.....	19
4.4 ISGilación y Ubiquitinación.....	20
4.5 Las dos formas de la proteína ISG15: libre y conjugada.....	22
5. CAPÍTULO 2.....	24
5.1 El papel de ISG15 en diferentes tipos de cáncer.....	24
5.1.1 Generalidades del cáncer:.....	24
5.2 ISG15 en cáncer de mama	26
5.3 ISG15 en cáncer de páncreas	31
5.4 ISG15 en otros tipos de cáncer	32
6. CAPÍTULO 3.....	34
6.1 ISG15 y la ISGilación en enfermedades neurodegenerativas.....	34
6.1.1 El sistema nervioso central y periférico.....	34
6.2 Generalidades de las enfermedades neurológicas	37
6.3 ISG15 en alteraciones neurológicas.....	39
6.4 ISG15 en Ataxia Telangiectasia.....	39
6.5 ISG15 y su repercusión en el desarrollo dendrítico.....	41
6.6 ISG15 un potencial biomarcador de lesiones neuronales.....	42
6.7 La ISGilación en el edema cerebral	43
7. CAPÍTULO 4	44

7.1 El impacto de ISG15 en infecciones virales.	44
7.2 ISG15 puede inducir un estado antiviral.	44
7.3 ISGilación de proteínas virales	47
7.4 Otros mecanismos antivirales dependientes de ISG15	50
7.4.1 <i>La ISGilación interfiere con la oligomerización de proteínas virales.</i>	50
7.4.2 <i>ISG15 Inhibe la salida del virus.</i>	51
7.4.3 <i>Interferencia de ISG15 con la entrada de virus.</i>	52
7.5 Propiedades inmunomoduladoras de ISG15 como una citocina	52
7.6 Estrategias de evasión viral para eludir ISG15.	54
7.7 ISG15 y COVID19	55
8. CAPITULO 4.1	56
8.1 ISG15/ISGilación en infecciones no virales.	56
8.2 Mutaciones en el gen 15	59
9. DISCUSIÓN:	61
10. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS:	65
11. Referencias bibliográficas:	67

1. RESUMEN

ISG15 es una proteína de 15 kDa codificada en el gen *ISG15* cuya expresión es regulada por interferones tipo 1 y 2. La función de ISG15 es realizar una modificación postraducciona en algunas proteínas, es decir una unión covalente, con una proteína diana. Para llevarse a cabo la ISGilación se requiere de tres enzimas, E1 de activación, E2 de conjugación y E3 de ligación, no obstante, también existe la desISGilación.

La proteína ISG15 puede detectarse de forma conjugada con la proteína blanco, así como en su forma no conjugada o libre. La forma de ISG15 libre se ha propuesto que puede ser secretada por algunas células del sistema inmunológico y actuar como una citocina. En algunos tipos de cáncer, como de mama o pulmón se han comparado los niveles de ISGilación y la proteína ISG15 libre, encontrando que difieren en los diferentes tipos de cáncer. ISG15/ISGilación también tienen implicaciones importantes en la respuesta inmune contra diversas infecciones. En algunas infecciones virales, ISG15 actúa como antiviral no obstante los virus han desarrollado estrategias para eludir a ISG15. Actualmente se ha estudiado la relación de ISG15 en la infección por SARS-CoV2 reforzando la función de que ISG15 tiene una función antiviral. Adicionalmente, en las enfermedades neurodegenerativas el daño generalmente comienza cuando hay depósitos de proteínas plegadas en la región del cerebro; la ISGilación de proteínas es una modificación postraducciona que parece estar implicada en la degeneración de las redes neuronales. Por ejemplo, en enfermedades como ataxia-telangiectasia, hay una degradación alterada vía autofagia que está relacionada con la ISGilación.

En conclusión, ISG15 tiene implicaciones en varias enfermedades, como la función dual que tiene en cáncer de mama, en infecciones virales primordialmente se conoce su función antiviral, en cuanto a las enfermedades neurológicas aún quedan mecanismos moleculares por dilucidar.

2. LISTA DE ABREVIATURAS

4EHP: Proteína homóloga 4E.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADP: Adenosín difosfato.

APD: adenocarcinoma de próstata ductal.

AT: Ataxia telangiectasia.

ATP: Adenosín trifosfato.

BECN1: beclin 1.

BHE: Barrera hematoencefálica.

COCE: Carcinoma oral de células escamosas.

dsRNA: RNA de doble cadena.

EFP: Proteína dedo responsiva al estrógeno.

EIF4E: Factor de iniciación de traslación eucariótico 4E.

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica.

ERBB2 (HER2): Receptor para el factor de crecimiento epidermal humano 2.

Era: Receptor de estrógeno alfa.

FAT10 Transcripción 10 asociada al antígeno F de leucocitos humanos.

GAF: Factores gamma-activados.

GAS: Elementos de sitios gamma-activados.

HCMV: Citomegalovirus humano.

HERC5: Enzima Dominio HECT y RLD que contiene la proteína ligasa de ubiquitina E3.

MCF-7: Células de cáncer de mama humano con receptores de estrógeno, progesterona y glucocorticoides.

MCF-7: Michigan Cáncer Foundation-7 cells.

MDA-MB-231: Células de cáncer de mama triple negativo.

HERC6: Dominio HECT y RLD que contiene E3 Ubiquitina proteína ligasa miembro de la familia 6.

HHARI: Homóloga humano de Drosophila Ariadne.

IFN: Interferón.

IFNAR1: Receptor 1 de interferón alfa

IFNAR2: receptor 2 del interferón alfa

IFN- γ : Interferón gamma.

IFN γ R1: Receptor 1 de interferón gamma.

IQGAP1: Motivo IQ que contiene a la proteína activadora de GTPasa 1.

IRF1: Factor de transcripción regulador del interferón 1.

ISG: Genes estimulados por el interferón.

ISRE: Elementos de respuesta estimulados por el interferón.

JAK1: Cinasa de Janus 1.

Ki679: Proteína nuclear de regulación de la proliferación celular.

Ki-Ras: Oncogén homólogo a Kristen del gen ras de mamíferos.

KLF9: Factor parecido a Kruppel 9.

LC3: proteína asociada a microtúbulos 1A/1B de cadena ligera.

LFA-1: Antígeno asociado funcionalmente a linfocitos 1.

MAVS: proteína de señalización antiviral mitocondrial.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad.

MIA: Activación inmune materna.

miRNA: micro RNA.

NEDD4: Célula precursora neural expresada regulada negativamente en el desarrollo 4.

NEDD8: Célula precursora neural expresada regulada negativamente en el desarrollo 8.

NK: Células asesinas naturales.

NMIIA: Miosina IIA no muscular.

p53: Proteína tumoral p53.

PARKIN: Proteína de ubiquitina E3 ligasa parkin RBR.

PARL: Proteína romboidea asociada a presenilinas.

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular.

PE: Fosfatidiletanolamina.

PINK1: Proteína cinasa putativa inducida 1.

PKR: Proteína cinasa R.

PLpro: Proteasas similares a papaína

PR: Receptor de progesterona.

pUL26: Proteína UL26 que está presente en el virión.

Rap2A: Proteína relacionada a RAS.

RIG-I: Gen 1 inducible por ácido retinoico.

RNA: Ácido Ribonucleico.

RNAm: RNA mensajero.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

SH2: Dominio homólogo a Src 2.

SKP2: Proteína 2 asociada a cinasa de fase S.

SNC: Sistema nervioso central.

SOCS: Proteínas supresoras de la señalización de citocinas.

SUMO: Pequeño modificador similar a la ubiquitina.

TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa.

Ub: Ubiquitina

UBCH8: Enzima H8 conjugadora de ubiquitina.

UBE1L: Proteína similar a la enzima E1 activadora de ubiquitina.

ULK1: Complejo de la cinasa de Unc-51-like1.

USP18: Peptidasa específica de ubiquitina 18.

VLP: Partículas similares al virus del Ébola.

3. INTRODUCCIÓN.

El gen *ISG15*, por su nombre en inglés *interferon-stimulated gene 15*, codifica para una proteína similar a la ubiquitina (Ub), que puede ser detectada de dos maneras: 1) como una proteína libre de 15 kDa denominada ISG15 libre; y 2) como una proteína conjugada, es decir, unida covalentemente a otras proteínas para modificarlas a través de un proceso enzimático denominado ISGilación^{1,2,3}. Las funciones de ISG15 libre y conjugada han empezado a dilucidarse en los últimos años. Se sabe que la proteína ISG15 libre funciona como una citocina mientras que la ISGilación modula la estabilidad de las proteínas y sus interacciones proteína-proteína^{4,5}. Además, la expresión de ISG15 está desregulado en algunas alteraciones como el cáncer, enfermedades neurológicas, así como en infecciones bacterianas y virales. Por lo tanto, ISG15 tanto libre como conjugada podrían tener funciones críticas en estos eventos.

3.1 PLANTEAMIENTO DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN.

A pesar de que ISG15 es una proteína parecida a la Ub, sus mecanismos de modulación y acción presentan algunas diferencias. Por ejemplo, mientras que la Ub es conservada desde la levadura al humano, ISG15 es una proteína exclusiva de vertebrados, lo cual podría indicar su relevancia funcional en la homeostasis de estos organismos. En los últimos años las investigaciones sobre ISG15/ISGilación se han incrementado, destacando a ISG15 como una proteína multifacética con críticas implicaciones en diversas enfermedades. El presente trabajo monográfico tiene como finalidad investigar el panorama actual de conocimiento sobre el perfil de expresión y los mecanismos moleculares de regulación, así como el funcionamiento de ISG15 en diversas alteraciones como el cáncer, neuropatologías e infecciones.

OBJETIVOS.

3.2 OBJETIVO GENERAL.

Recopilar analizar y discutir información del perfil de expresión, los mecanismos moleculares y función de ISG15 en diferentes procesos fisiopatológicos.

3.3 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Recopilar información sobre los mecanismos de regulación y acción de ISG15 y la ISGILACIÓN.
2. Analizar la literatura actual acerca de ISG15 y las vías de ISGILACIÓN en diversos procesos fisiopatológicos como cáncer, enfermedades del sistema nervioso central e infecciones.

3.4 ENFOQUE

La estrategia que se utiliza para desarrollar el trabajo monográfico de actualización se basa en una revisión exhaustiva y especializada de artículos con la finalidad de explicar la relevancia biológica de ISG15 en diversas alteraciones como el cáncer, neuropatologías e infecciones.

4. CAPÍTULO 1.

4.1 Generalidades de ISG15 y la ISGilación de proteínas

Históricamente ISG15 se identificó por primera vez en 1979 en células tratadas con interferón alfa/beta ($IFN\alpha/\beta$) y se nombró como "proteína de 15kDa"; en 1987 a partir del descubrimiento de que el proceso de transcripción de *ISG15* era inducido por $IFN-\beta$, se acuñó el término "gen estimulado por interferón". Actualmente se han comenzado a revelar los mecanismos más específicos de acción de la proteína del gen estimulada por interferón 15 (ISG15) y se han demostrado funciones variadas y aparentemente contrastantes. Estas funciones han introducido una complejidad en la comprensión de ISG15, lo que demuestra que no solo es intrínsecamente multifuncional, sino que también muestra diversidad funcional y estructural entre diferentes especies⁶.

Los interferones se clasifican dentro de la familia de pequeñas proteínas citocinas secretadas que ayudan a regular la respuesta inmunitaria (IFN)⁷. Se dividen en tres grupos, el primer grupo, conocido como interferones tipo I que comprende a los interferones alfa/beta ($IFN\alpha/\beta$), los IFN tipo II solo tienen un miembro que es el interferón-gamma ($IFN-\gamma$) (Fig.1) y el tercer conjunto formado por IFN lambda (Tabla.1)². En general, los IFN inducen la expresión de genes estimulados por interferones (ISG) que tienen funciones antivirales, inmunomoduladoras, antiproliferativas y proapoptóticas. Además, uno de los primeros efectos biológicos descritos de los IFN fue la regulación al alza de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), así como la regulación al alza de toda la maquinaria de procesamiento y presentación de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y clase II (MHC I y II), incluyendo el transportador asociado al procesamiento de antígenos y actividad del proteosoma⁸.

Mientras que los interferones alfa/beta (IFN α/β) fueron los primeros en descubrirse como inductores de *ISG15* (Fig.2), recientemente se demostró que el interferón gamma (IFN- γ) también es capaz de inducir la expresión de *ISG15*, pero de una manera dependiente del tipo celular. El receptor de IFN- γ está compuesto por dos cadenas el receptor 1 de interferón gamma (IFN γ R1) que se unen al ligando, asociadas a dos cadenas del receptor 2 de interferón gamma (IFN γ R2) (Fig. 1). El IFN γ R1 se expresa constitutivamente a niveles moderados en la superficie de casi todas las células, y el IFN γ R2 se expresa constitutivamente a niveles bajos, su expresión está fuertemente regulada, según el estado de diferenciación o activación celular. En particular, las células T adyuvantes de tipo 1 (Th1) son más resistentes a los efectos antiproliferativos del IFN- γ que las células T de tipo 2 (Th2). Esto se debe probablemente a los menores niveles de expresión de la subunidad IFN γ R2, que permite a las células Th1 seguir proliferando durante la señalización del IFN- γ . Por el contrario, las células Th2 que no producen IFN- γ expresan niveles más altos de la subunidad IFN γ R2, lo que las hace especialmente susceptibles a la presencia de IFN- γ que inhibe su proliferación⁸.

Inducción de ISG15 por IFN- γ : Tras la unión del Interferón gamma (IFN- γ), los dominios intracelulares del receptor 2 de interferón gamma (IFN γ R2) se oligomerizan con el receptor 1 de interferón gamma (IFN γ R1), y los componentes de señalización descendentes, la cinasa de Janus 1 (JAK1) y la cinasa de Janus 2 (JAK2) se transfosforilan, resultando en su activación y fosforilan el dominio intracelular del receptor (tirosina 440 en el IFN γ R1 humano), creando sitios de unión para proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción 1 (STAT1). A continuación, las JAKs fosforilan STAT1 en el extremo C-terminal en los residuos de tirosina 701 (Y701), lo que da lugar a la formación de complejos de homodímeros de STAT1, conocidos como factores gamma-activados (GAF), que se trasladan al núcleo y regulan la expresión génica mediante la unión a elementos de sitios gamma-activados (GAS) en los promotores de los genes estimulados por el interferón (ISG), después de haber inducido la señal las STATs se separan y salen del núcleo para volver a fosforilarse y continuar la vía (Fig. 1)⁸.

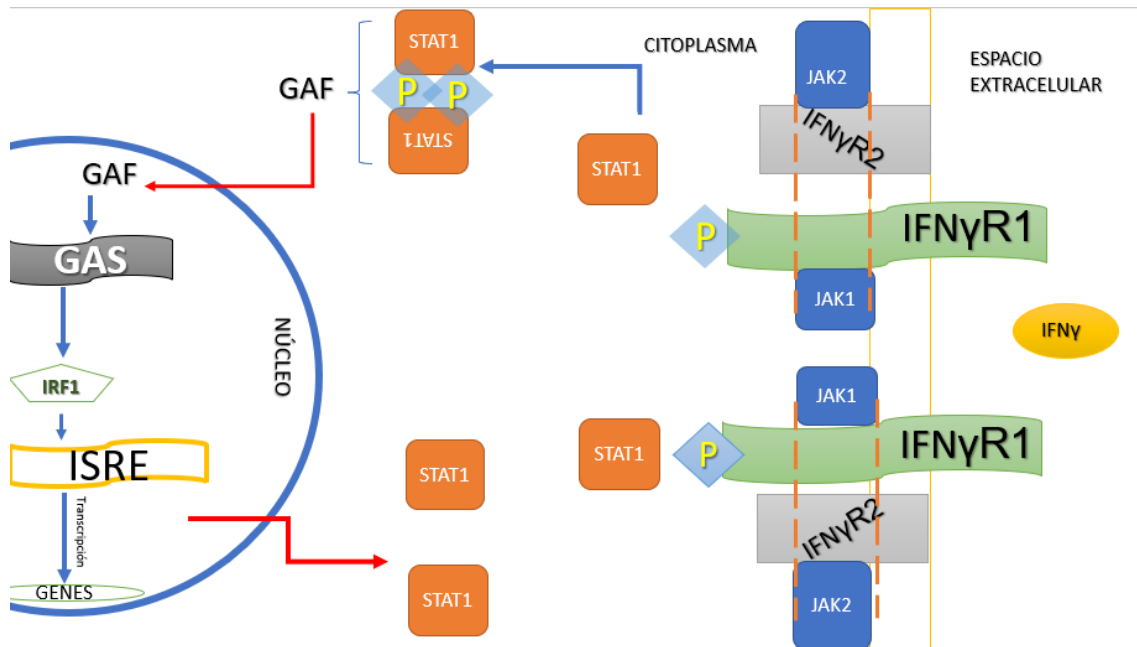


Figura 1: Vía de inducción del gen 15 estimulado por interferón (ISG15) IFN de tipo 2.

Uno de los reguladores negativos más importantes de la vía de señalización JAK/STAT son las proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS), cuya expresión aumenta en respuesta a la señalización del IFN- γ a través del factor regulador del interferón 1 (IRF1) que es un miembro de la familia de factores de transcripción reguladores del IFN. El IRF1 funciona como activador de la transcripción de los elementos de respuesta estimulados por el interferón (ISRE), lo que conduce a la transcripción de un gran número de genes de respuesta secundaria. SOCS bloquea la actividad de las cinasas de Janus (JAKs) mediante un bucle de retroalimentación negativa, pero también regula la señalización de otras citocinas río abajo. Los dominios que se unen a los péptidos ricos en fosfo-tirosina homólogo a Src 2 (SH2) de las proteínas SOCS se unen directamente a los residuos de tirosina fosforilados de las JAK activadas, bloqueando el reclutamiento de las proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción 1 (STATs), y la actividad de las JAKs. Además, los SOCS promueven interacciones que conducen a la ubiquitinación y a la degradación por el proteosoma de los componentes de la señalización JAK/STAT. SOCS1 incluso impide que las células T reguladoras produzcan IFN- γ mediante la supresión de STAT1. Las STATs también están implicadas en el desarrollo y la función del sistema inmunitario y desempeñan un papel en el mantenimiento de la vigilancia tumoral⁸.

El IFN- γ se sabe que desempeña una función fundamental en la vigilancia inmunitaria del cáncer, estimulando la inmunidad antitumoral y promoviendo el reconocimiento y la eliminación del tumor. Las respuestas celulares inducidas por el IFN- γ también pueden implicar una comunicación cruzada con los receptores IFN- α/β , amplificando la señalización del IFN- γ y sus efectos. La expresión constitutiva del IFN- γ endógeno contribuye a la homeostasis de las funciones de las células inmunitarias, al mantenimiento del nicho de células madre hematopoyéticas y a la formación de huesos⁸.

Tabla 1: Cuadro resumen de las tres familias de interferones

PROPIEDADES	TIPO I Interferón alfa (IFN- α) interferón beta (IFN- β)	TIPO II interferón gamma (IFN- γ)	TIPO III interferón lambda (IFN- λ)
Miembros	13 IFN- α , IFN- β , interferón épsilon (IFN- ϵ), interferón kappa (IFN- κ), interferón omega (IFN- ω)	IFN- γ	IFN- λ 1 IFN- λ 2 IFN- λ 3 IFN- λ 4
Células productoras de IFN	Células nucleadas	Células T, Células B, células asesinas naturales (NK) y células presentadoras de antígeno.	Células nucleadas, células epiteliales, algunas células dendríticas mieloides (mDCs) células dendríticas plasmacitoides (pDCs)
células que responden a los IFN	Todas las células nucleadas	Todas las células nucleadas	Células epiteliales del intestino, hígado, y riñón.
Estimuladas	patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPS)	citocinas (IL-12, IL-15, IL-18), Interferón tipo I (IFN I) y PAMPS	DAMPS y PAMPS
Receptor de IFN	Subunidades de receptor de interferón alfa 1 (IFNAR1), receptor de interferón alfa 2 (IFNAR2)	receptor 1 de interferón gamma (IFN γ R1), receptor 2 del interferón gamma (IFN γ R2)	receptor del interferón lambda 1 (IFN λ R1), subunidad beta del receptor de interleucina 10 (IL10R β)
Vía de transcripción	elementos de respuesta estimulados por el interferón (ISRE) (canonical),	GAS (canonical) ISRE (no canonical)	ISRE

	elementos de sitios gamma-activados (GAS) (non-canonical)		
Funciones	Antiviral, Antiproliferativa, regulación apoptótica e inmunorregulación	Antiviral, antiproliferativa, inmunomoduladora y antitumoral	Antiviral e inmunidad en mucosas
Moléculas de señalización	JAK1 y todas las STATs, tirosina cinasa 2 (TYK2)	cinasa de Janus 1 (JAK1), cinasa de Janus 2 (JAK2), STAT1 Y STAT3	JAK1, proteínas transductores de señales y activadoras de la transcripción 1 (STAT1), STAT2, TYK2 y factor regulador de interferón 9 (IRF9).

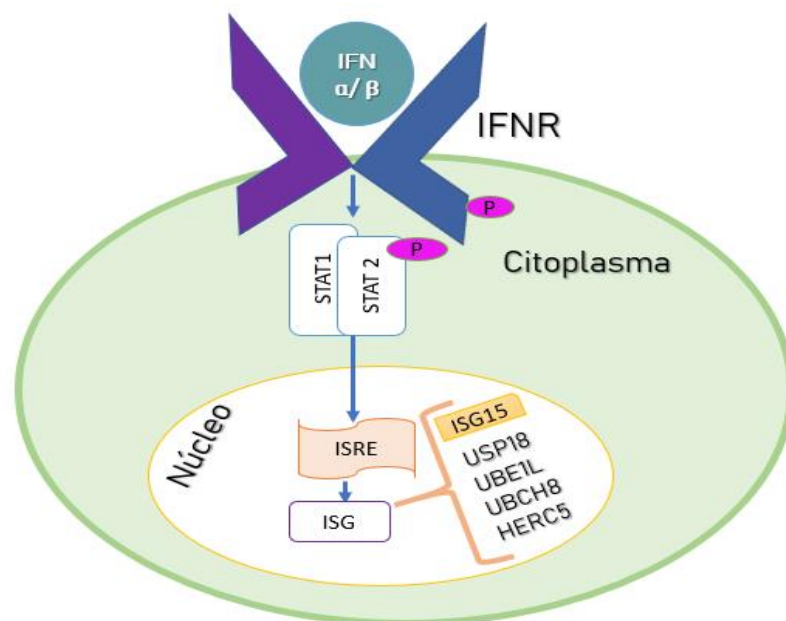


Figura 2: Vía de activación mediada por interferones $\alpha/\beta/\gamma$, induce la expresión del gen estimulado por interferón 15 (*ISG15*) y su sistema enzimático que consta de: una peptidasa específica de ubiquitina 18 (*USP18*) encargada de la desISGilación, una proteína similar a la enzima E1 activadora de ubiquitina (*UBE1L*), una enzima H8 conjugadora de ubiquitina (*UBCH8*), y por último una enzima dominio HECT y RLD que contiene la proteína ligasa de ubiquitina E3 (*HERC5*).

4.2 Características moleculares y estructurales de ISG15.

ISG15 se traduce a partir de una secuencia de ARN mensajero (ARNm) de 711 bases de longitud, que genera una proteína precursora de 165 aminoácidos (aa) y una masa de 17 kDa. Este precursor luego se procesa para eliminar ocho aa en la metionina C-terminal y en el extremo N-terminal. Dando como resultado, ISG15 en su forma madura de 15 kDa con 156 aa (Fig.3). Estructuralmente está formada de dos dominios similares a Ub (Figura 3.1) conectados por una "bisagra". Los dos dominios similares a la ubiquitina adoptan el pliegue "β--grasp fold" con cada dominio que contiene cuatro hojas β y una hélice α⁴.



Figura 3: La proteína del gen estimulada por interferón 15 (ISG15) es traducido a partir de un ARN mensajero (ARNm) de 711pb y produce una forma precursora, a partir de la cual se genera ISG15 madura.

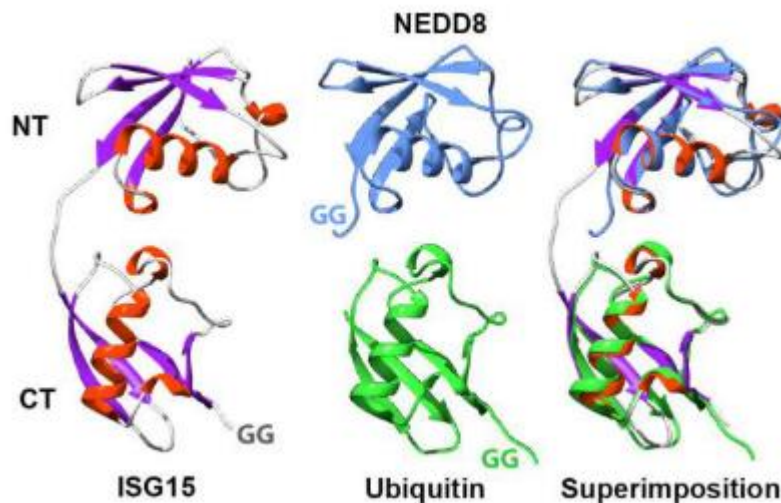


Imagen tomada de: Sandy, Z., da Costa, I. C., & Schmidt, C. K. (2020). More than meets the isg15: Emerging roles in the DNA damage response and beyond. *Biomolecules*, 10(11), 1–30. **Figura 3.1:** Comparación estructural entre ISG15 y Ub. NEDD8 se utiliza para mostrar el otro dominio de Ub. (CT) corresponde al carboxilo terminal y (NT) es el amino terminal. (G) Glicina.

ISG15 es parte de una clase de proteínas que comparten una homología estructural con la Ub, conocida como proteína similar a la ubiquitina (Ubl), que también incluye a : el pequeño modificador similar a la ubiquitina (SUMO), Célula precursora neural expresada regulada negativamente en el desarrollo 8 (NEDD8) y el modificador proteico similar a la ubiquitina que se induce en vertebrados tras determinados estímulos inflamatorios (FAT10). Tanto las proteínas Ub como las Ubl son mediadores y reguladores clave de numerosos procesos celulares⁶.

El dominio C-terminal de ISG15 tiene la secuencia dada por los aminoácidos Lisina, Arginina, Lisina, Arginina, Glicina ,Glicina (LRLRGG), al igual que Ub, lo que permite su interacción con los residuos de lisina de las proteínas diana a través de la enzima E1 de activación o enzima E1 activadora de ubiquitina (UBE1L) la enzima E2 de conjugación o enzima H8 conjugadora de ubiquitina (UBCH8) y la enzima E3 de ligación que corresponde a la enzima Dominio HECT y RLD que contiene la proteína ligasa de ubiquitina E3 (HERC5), otra E3 ligasa es la Homóloga humano de Drosophila Ariadne (HHARI), y finalmente la proteína dedo responsiva al estrógeno (EFP) (Fig. 4). Estas tres enzimas se conocen como el sistema ISGilación. No obstante, el proceso es reversible mediante la enzima peptidasa específica de ubiquitina (USP18), la cual participa en la eliminación de la unión covalente de ISG15 a las proteínas ISGiladas por un proceso denominado desISGilación⁹.

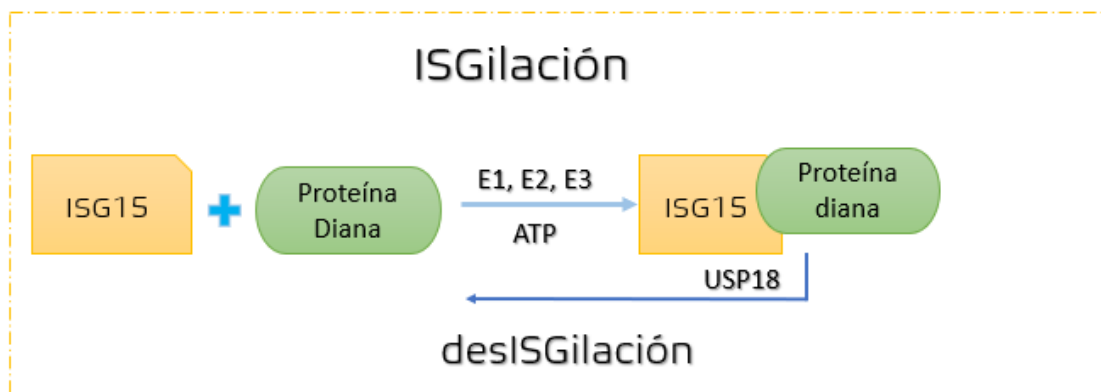


Figura 4: La unión de la proteína del gen estimulada por interferón 15 (ISG15) con su proteína diana mediante residuos de lisina (K) es dependiente energía en forma de Adenosín trifosfato (ATP) y requiere de la presencia de enzimas como la proteína similar a la enzima E1 activadora de ubiquitina (UBE1L), E2 enzima H8 conjugadora de ubiquitina (UBCH8) y una E3 que puede ser: Enzima Dominio HECT y RLD que contiene la proteína ligasa de ubiquitina E3 (HERC5), Homóloga humano de Drosophila Ariadne (HHARI), Proteína dedo responsiva al estrógeno (EFP); a esta modificación postraduccional se le denomina ISGilación, siendo un proceso reversible mediado por la enzima Peptidasa específica de ubiquitina 18 (USP18).

La ISGilación es una modificación postraduccional de proteínas que es dinámica y como la enzima dominio HECT y RLD que contiene la proteína ligasa de ubiquitina E3 (HERC5) es decir la E3 Ligasa del sistema de ISGilación se encuentra localizada en los polirribosomas, la ISGilación de proteínas que es dependiente de HERC5 se limita en gran medida a proteínas recién sintetizadas⁶. Además, la ISGilación altera las interacciones proteína-proteína, la estabilidad y la actividad de una proteína, por ejemplo, la ISGilación de proteínas recién sintetizadas pueden ser relevantes para la inmunidad innata para proteger las células contra patógenos y se ha propuesto que ISGilación puede modular el ensamblaje de proteínas para formar complejos multiproteicos⁴.

4.3 Mecanismo de ISGilación y desISGilación.

La modificación postraduccional ISGilación comienza con la enzima E1 de activación que cataliza la formación de un enlace tioéster con C-glicina terminal de ISG15 de una manera dependiente de Adenosín trifosfato (ATP) (Fig.5). A continuación, mediante transesterificación, ISG15 se transfiere a la enzima E2 de conjugación y finalmente, ISG15 se transfiere de la enzima E2 de conjugación a residuos de lisina de proteínas específicas a través de la enzima ligasa E3. En humanos, la enzima activadora corresponde a UBE1L(E1), UBCH8 es la enzima de conjugación (E2) y HERC5, HHARI y EFP cumplen la función de enzimas E3 ligasas. Curiosamente, en humanos HERC5 es la enzima ligasa E3, mientras que los ratones expresan la E3 ligasa HERC6. **Por el contrario, USP18 (UBP43) es una enzima capaz de eliminar ISG15 de las proteínas (Fig.5), generando ISG15 libre mediante un proceso conocido como desISGilación⁹.**

La ubiquitinación presenta al menos tres variantes: a) mono-Ub, b) multi-Ub y c) poli-Ub; y consta de una serie de pasos. En primer lugar, la activación de una molécula de Ub por la enzima E1 (de activación), seguido de la transferencia de la ubiquitina de E1 a la enzima E2 (de conjugación), y finalmente la ligación por enlace isopeptídico entre la glicina del carbono terminal de la Ub con la lisina de la proteína diana gracias a la acción de las enzimas E3 (de ligación). También se han descrito E3 ligasas capaces de Ubiquitinar otros residuos (además de la lisina) como serina, treonina o cisteína en el sustrato. Una vez que la Ub se ha unido a la proteína, se empiezan a agregar más moléculas de ubiquitina, dando como resultado la formación de una cadena poliUbiquitínica que le permite al proteosoma identificar y degradar la proteína. El proceso de ubiquitinación es reversible, y está mediado por enzimas desUbiquitinasas (DUBs), las cuales interactúan con el complejo E3-sustrato y lleva a cabo la eliminación de moléculas de ubiquitina¹⁰.

Existe una similitud estructural entre Ub e ISG15. Sin embargo, Ub se conserva de la levadura a los humanos, mientras que ISG15 es exclusivo de organismos vertebrados, poco conservado entre diferentes especies. Para el sistema Ubiquitinación, hay más de 600 miembros de la familia de ligasa E3 (que son responsables de dar especificidad al sustrato). Por el contrario, en la ISGilación hay tres ligasas E3 (HHARI, EFP, HERC5) ⁴, y aunado a esto hasta el momento únicamente se ha detectado la ISGilación como monoISGilación contrario a la Ubiquitinación que puede ser monoUbiquitinación, poliUbiquitinación (Cuadro 1)¹⁰. Además, en los seres humanos, hay aproximadamente 100 diferentes DUB que pueden romper la unión Ub de proteínas Ubiquitinadas. En contraste, solo se ha descrito una enzima con actividad de desISGilasa (USP18) ⁴.

Cuadro 1: Diferencias más relevantes entre los mecanismos de ISGilación y Ubiquitinación.

Parámetros	ISGilación	Ubiquitinación
Predominancia en especies	Exclusivo de organismos vertebrados.	Altamente conservado desde levaduras hasta los humanos.
Número de Ligasas (E3)	<ul style="list-style-type: none"> -(EFP): Proteína dedo responsiva al estrógeno. -(HERC5) Enzima Dominio HECT y RLD que contiene la proteína ligasa de ubiquitina E3. -(HHARI) Homóloga humano de <i>Drosophila</i> Ariadne. 	+600Especies

Número de Enzimas que revierten el proceso	-(USP18) Peptidasa específica de ubiquitina 18.	+100 diferentes Ubiquitininas
--	---	-------------------------------

A través de estudios in vitro, se sabe que ISG15 y Ub pueden formar combinaciones de cadenas, que no son señales de degradación. Los residuos de lisina 29 y 48 en Ub son los sustratos para ISG15, y se ha propuesto que ISG15 puede alterar la vinculación de Ub a sus proteínas diana para su posterior degradación, es decir, ISG15 conjugado ejerce su efecto biológico inhibiendo poliUbiquitilación de proteínas en algunos tipos celulares¹¹.

4.5 Las dos formas de la proteína ISG15: libre y conjugada.

El ISG15 intracelular existe en dos formas: libre y conjugado con proteínas diana. (Fig. 6) ¹¹. Actualmente se sabe que ISG15 en su forma libre se secreta a partir de linfocitos y monocitos⁴. Se ha sugerido que ISG15 libre actúa de forma similar a las citocinas proapoptóticas. Se ha demostrado que un receptor tipo integrina denominado antígeno 1 asociado a la función leucocitaria (LFA-1), en las células asesinas naturales (NK) puede reconocer extracelulares ISG15 libre para promover la secreción de IFN- γ , y desencadenar una vía de señalización en algunas células⁹. En monocitos humanos, ISG15 también induce la producción de citocinas antiinflamatorias (IL-10). Por lo tanto, ISG15 libre parece tener varias funciones inmunomoduladoras.

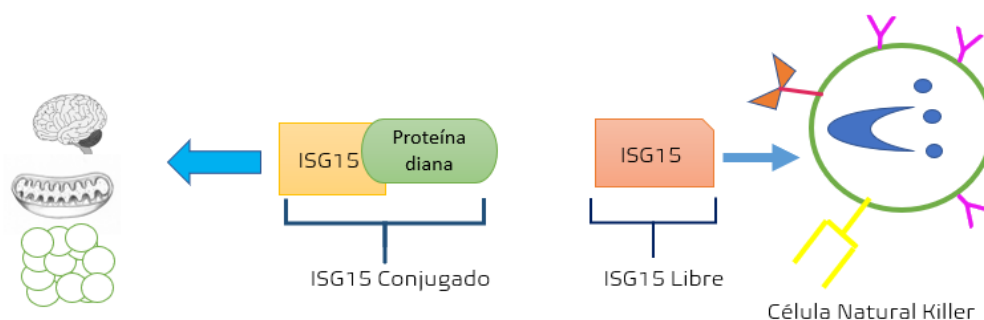


Figura 6: Las actividades de la proteína del gen estimulada por interferón 15 (ISG15) dependen de la forma en la que se encuentre. Como se puede ver en la imagen, ISG15 en su forma libre puede inducir la producción de interferones en las células asesinas naturales (NK). Cuando se encuentra conjugada a otras proteínas, afecta su estabilidad y sus interacciones. La ISG15 se ha observado que tiene importantes implicaciones en organelos como las mitocondrias, y en contextos específicos como, pueden ser, las células cancerosas o del cerebro.

Dentro de los procesos celulares en los que participa ISG15/ISGilación, se encuentra la proliferación, migración, apoptosis, y la autofagia, como se describe en los próximos capítulos. De todos ellos, la autofagia es proceso que parece estar implicado en varias alteraciones, por lo que es importante brevemente describirlo. La autofagia es un mecanismo de degradación de proteínas y organelos disfuncionales que ocurre en vacuolas especializadas de doble membrana denominadas autofagosomas y que requiere la participación de los lisosomas. Este proceso permite el auto abastecimiento celular de energía a través del reciclaje de diversos substratos energéticos. La autofagia se activa en respuesta a diversas formas de estrés energético, principalmente debido a la ausencia de nutrientes¹² por ejemplo en situaciones de ayuno; a nivel molecular la formación del autofagosoma inicial requiere que la proteína cinasa activada por monofosfato de adenina, que contribuye al balance energético celular (AMPK) este activado e interaccione con el complejo de la cinasa de Unc-51-like1, es requerido para el inicio de la autofagia (ULK1), en estas condiciones el regulador de procesos celulares (mTORC1) esta inhibido.

Por otro lado, la presencia de nutrientes y factores de crecimiento produce la activación de mTORC1, el cual inhibe a la autofagia al actuar secuestrando al complejo implicado en la formación del autofagosoma (ULK1-Atg13-FIP200) e impidiendo su interacción con AMPK¹⁰.

Además, las mitocondrias presentan una membrana externa (bicapa lipídica) permeable a iones, metabolitos y polipéptidos gracias a la presencia de unos canales aniónicos dependientes de voltaje, constituyen una red interconectada de alta plasticidad y dinámica¹⁰. Frente a un daño mitocondrial, se pierde el potencial de membrana mitocondrial y se induce el proceso denominado **mitofagia**. Las mitocondrias dañadas acumulan una proteína en la membrana externa mitocondrial denominada cinasa 1 inducida por PTEN (PINK1), la cual recluta a una ubiquitina-proteína ligasa E3 citosólica denominada (*PARK2/Parkin*) el gen *PARK2* codifica la ubiquitina-E3 ligasa citosólica Parkin, que media la ubiquitinación de proteínas mitocondriales (como, por ejemplo, mitofusina). Estas son reconocidas por otras proteínas adaptadoras (p62 y HDAC6) las cuales unen a la proteína asociada a

microtúbulos 1A/1B de cadena ligera (LC3) unido a fosfatidiletanolamina (PE) resultando en su forma lipidada e iniciando la degradación. Este proceso es selectivo, y no ocurre en mitocondrias “sanas”, ya que éstas son capaces de importar a la cinasa inducida por PTEN (PINK1) y degradarlo por la proteasa llamada proteína romboidea asociada a presenilinas (PARL), de una forma dependiente de potencial de membrana, inhibiendo así el proceso de mitofagia¹⁰. Más adelante, se describe una relación de ISG15 con procesos de autofagia/mitofagia en algunas alteraciones.

5. CAPÍTULO 2.

5.1 El papel de ISG15 en diferentes tipos de cáncer.

5.1.1 Generalidades del cáncer:

El cáncer parece ser una enfermedad tan antigua como lo es la vida en la tierra. Son testimonio de ello, los tumores encontrados en los huesos de fósiles de dinosaurios o en las momias humanas descubiertas en Egipto y Perú. El nombre, *cáncer*, se inspiró en la observación de los tumores de mama, que, al crecer, toman la forma de un cangrejo, según explica Galeno (131-203 d.C.) en su tratado “*Definitiones Medicae*”¹³.

El cáncer engloba una gran variedad de padecimientos que tienen como denominador común la proliferación celular incontrolada. Los más frecuentes son los llamados carcinomas, que constituyen cerca del 90% de los cánceres, y que se generan en los epitelios o capas celulares que recubren la superficie de nuestro cuerpo. Entre ellos, los más comunes son los que afectan al pulmón, al intestino grueso, a las mamas y al cuello uterino¹⁴.

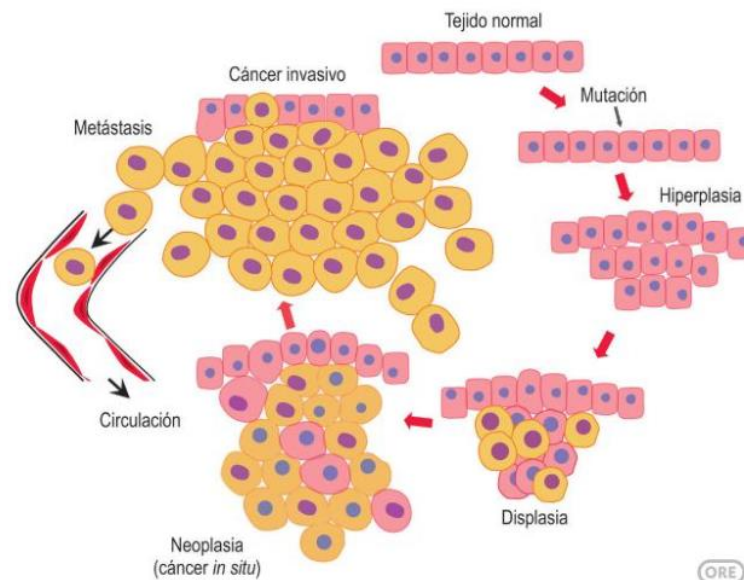


Imagen tomada de: Rojas Espinoza Oscar. Inmunología Del Cáncer. In *Inmunología (de memoria)*; Editorial Medica Panamericana: Ciudad de México, 2017

Figura 7: El cáncer inicia cuando una célula de un tejido sufre alguna mutación (o varias) en los genes que regulan su crecimiento. Los primeros cambios se manifiestan como una hipertrofia del tejido (hiperplasia) que luego exhibe cambios morfológicos en las células para dar origen a una displasia. Si los cambios siguen progresando, la displasia se transforma en una neoplasia primero, y en cáncer después, el cual puede llegar a ser invasivo y metastásico¹³.

Los tumores pueden ser benignos o malignos. Los tumores benignos se caracterizan por presentar un grado de proliferación limitado, tienen poca vascularización, permanecen localizados en su sitio de aparición y están rodeados por una capsula de tejido fibroso como las verrugas o papilomas; los tumores malignos, por el contrario, muestran alto grado de crecimiento, alta capacidad infiltrante porque producen proteasas que degradan la matriz extracelular algunas células se desprenden del tumor y alcanzan la circulación sanguínea, alta vascularización, no suelen estar encapsulados y por lo mismo pueden invadir otras partes del tejido e incluso otros tejidos (metástasis). Además, algunas publicaciones señalan una alta frecuencia de linfocitos T citotóxicos (TCD8+) en el tejido de las neoplasias benignas y bajo número de ellos en las neoplasias malignas. En los pacientes con cáncer se ha detectado un incremento del productor de los factores de necrosis tumoral alfa y beta. De esta forma, el desarrollo de una neoplasia o tumor maligno por lo general se denomina cáncer. Las neoplasias no siempre son tumores sólidos, algunas son de tipo diseminado o sistémico como las leucemias, que afectan a los leucocitos ¹³.

En cada célula hay diferentes genes de control por ejemplo los oncogenes se refieren a genes que promueven el crecimiento o división celular. Genes supresores de tumores son genes que inhiben el crecimiento. Como por ejemplo el gen retinoblastoma codifica una proteína que ayuda a regular el ciclo celular al funcionar como un freno de la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN). La inactivación de estos genes puede conducir el crecimiento inapropiado de las células al perderse este mecanismo de frenado. Los protooncogenes son genes normales que codifican para proteínas que impulsan de varias formas la actividad del ciclo celular. Cuando los protooncogenes mutan o pierden sus mecanismos de regulación se transforman en oncogenes y en este estado pueden favorecer la proliferación celular no regulada al producir un exceso de alguna proteína estimuladora del crecimiento que no debería estar produciéndose en ese momento¹³.

Los tumores cancerígenos a su vez se dividen de acuerdo con su localización:

Sarcomas: Tumores de tejido conectivo o de sostén que afectan cartílago, hueso y músculos además de vasos sanguíneos y linfáticos¹³.

Carcinomas: Son tumores de células epiteliales como por ejemplo el cáncer de mama, cáncer de piel¹³.

Adenomas: Son tumores benignos de origen glandular. Los hay en colon, glándulas adrenales, tiroides. Sin embargo, en algunos casos puede progresar a adenocarcinomas (malignos)¹³.

5.2 ISG15 en cáncer de mama

Hasta ahora se sabe que tanto ISG15 en su forma conjugada como libre participan en diferentes tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama que es la primera causa de muerte de mujeres y es el tipo de cáncer más frecuente. Se sabe que más del 85% de los casos de mujeres con cáncer de mama no están relacionados con mutaciones genéticas, más bien se ha visto que es una enfermedad multifactorial que se define como un conjunto de tejido mamario con alteraciones neoplásicas; a nivel molecular, los tumores mamarios son altamente heterogéneos, dando como resultado un limitado número de biomarcadores (Tabla 2) para su detección temprana y a su mismo se ve disminuida la cantidad de blancos farmacológicos (Tabla 3)⁹.

Tabla 2: Lista de biomarcadores para cáncer de mama

Biomarcador	Abreviatura	Definición
Receptor de estrógeno alfa	Er α	Es un receptor de hormonas nucleares, está involucrado en la regulación de la expresión de genes eucariotas y afecta la proliferación celular.
Receptor de Progesterona	PR	Proteína que se localiza en el interior de las células del tejido reproductor femenino, otros tejidos y en algunas células cancerosas. La hormona progesterona se une y estimula la proliferación celular.
Receptor para el factor de crecimiento epidermal humano 2	<i>ERBB2</i> (HER2)	El receptor tirosincinasa está involucrado en la regulación de la proliferación celular, motilidad y apoptosis, en los carcinomas de mama hay una sobreexpresión.

El receptor de estrógeno alfa (Er α) se expresa en más del 70% de los casos de cáncer de mama, y el 30% restante carece de expresión de este receptor; en consecuencia, estos tipos de cáncer se conocen como Er α + y Er α -, respectivamente. Er α es un receptor nuclear, activado principalmente por 17 β -estradiol (E2), que actúa como un regulador transcripcional pro-tumor en células de cáncer de mama. Por lo tanto, Er α es el objetivo terapéutico para la mayoría de los casos de cáncer de mama⁹.

Tabla 3: Lista de blancos terapéuticos y sus fármacos.

Blanco del tratamiento	Medicamento
Receptores de estrógenos selectivos. Degradadores (SERD)	Fulvestrant
Estrógenos selectivos moduladores del receptor gen (SERM)	Tamoxifeno
Inhibidores de la aromatasa, generan una inhibición de la producción de E2 hormona de los andrógenos	Letrozol, Anastrozol, y Exemestano

Los niveles de ISG15 libre y la ISGilación es específica del tipo celular, en el caso de cáncer de mama ambos parecen desempeñar un papel fundamental. Un estudio indicó que células de cáncer de mama humano con receptores de estrógeno, progesterona y glucocorticoides (MCF-7), tuvieron los niveles más altos de ISG15 en comparación con otros tipos de células, y un perfil específico de ISGilación, a diferencia de esto recientemente se detectaron bajos niveles de ISG15 libre pero numerosas marcas de ISGilación en células de cáncer de mama triple negativo (ER α -, PR-, HER2-) (Tabla 4). estos datos sugieren que las proteínas ISGiladas pueden ser distintas entre los tipos de cáncer de mama ER α + y ER α -. A través de ensayos de inmunofluorescencia, se ha demostrado que ISG15 se localiza en el citoplasma y el núcleo de las células del cáncer de mama (Tabla 5)⁹.

Tabla 4: Subtipos basados en la detección de Receptor de estrógeno alfa (ER α), Receptor de progesterona (PR), Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2) y la proteína nuclear de regulación de la proliferación celular (Ki67)⁹.

Subtipos de cáncer de mama	Características	Observaciones
Luminal A	ER α +, PR \geq 20%, HER2-, Ki67 <20%	Es el tipo más común de cáncer de mama cerca del 50% de los casos presentan estas características y responde a terapia endocrina.
Luminal B	ER α +, PR <20% y / o HER2 + y / o Ki67 \geq 20%	Aproximadamente el 20% de los casos corresponde a este subtipo y generalmente requiere quimioterapia.
Sobreexpresión de HER2	ER α -, PR-, HER2 +	Corresponde al 15% de los casos y se trata con una terapia anti-HER2.
Tipo basal	ER α -, PR -, HER2- (triple negativo)	Es considerado el cáncer de mama más agresivo y requiere de quimioterapia.

Tabla 5. Mediante Inmunoblot se observó la localización de la proteína del gen estimulada por interferón 15 (ISG15) en células de mama cancerígenas.

	Principal localización de ISG15 libre	Principal localización de marcas de ISGilación
Células de cáncer de mama humano con receptores de estrógeno, progesterona y glucocorticoides (MCF-7)	Núcleo	Núcleo
Células de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231)	Núcleo	Citoplasma

En el cáncer de mama, el IFN- γ parece mediar la apoptosis y la detención del ciclo celular. Además, IFN- γ puede generar señalización autocrina en células de cáncer de mama. El IFN- γ aumentó los patrones de ISGilación entre el núcleo y el citoplasma de células MCF-7 y MDA-MB-231 y mejoró los niveles de ISG15 libre intracelular, sin embargo, los genes inducidos por IFN- γ , incluido *ISG15*, también afectan la respuesta a la terapia endocrina con tamoxifeno⁹.

IFN- γ induce la ISGilación en el citoplasma de células de cáncer de mama y esto puede ser relevante para la reorganización del citoesqueleto de dichas células sin embargo pocas proteínas se han identificado como dianas de ISGilación en cáncer de mama como por ejemplo se sabe que la miosina IIA no muscular (NMIIA) y la proteína activadora de GTPasa que contiene el motivo IQ 1 (IQGAP1), dos proteínas citoplasmáticas (Tabla 6), son blancos de ISGilación inducidas por IFN- γ . Estos datos sugieren que la vía de IFN- γ podría activar la ISGilación de proteínas relacionados con los cambios citoesqueléticos, y estos cambios son importante para procesos, como la invasión implicada en la progresión del cáncer⁹.

Tabla 6: Proteínas modificadas por ISGilación en células derivadas de cáncer de mama⁹. Proteína activadora de GTPasa que contiene el motivo IQ 1 (IQGAP1) y en la miosina IIA no muscular (NMIIA).

Proteínas	Función
NMIIA	Se asocia con los filamentos de actina, generando el complejo de actino-miosina para la remodelación citoesquelética y la propagación celular, que está implicado en la motilidad celular.
IQGAP1	está asociado con remodelación citoesquelética.

En cuanto a la regulación de ISG15/ISGilación en cáncer de mama, se ha informado que la vía del oncogén homólogo a Kristen del gen ras de mamíferos (*Ki-Ras*) conduce a una disminución de los niveles de ISG15 libre e ISGilación de proteínas⁹. Además, la fibronectina (FN), una proteína de matriz extracelular puede inducir la expresión de *ISG15* y la *ISGilación*. Asimismo, una conexión entre ISGilación, IFN- γ puede existir en las células del cáncer de mama, modulando los cambios en las células morfológica celular (Fig. 7)⁹.

En estudios *in vitro* se ha observado que la expresión de *ISG15* parece tener una función pro-tumoral, esto se debe a que, *ISG15* mejora la migración de células de cáncer de mama⁹. Sin embargo, se demostró, que la inyección de *ISG5* libre en ratones atímicos, un aumento de la infiltración de células asesinas naturales en las secciones tumorales y un aumento de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) lo que demuestra una función antitumoral promovida por *ISG15* libre extracelular. En el cáncer de mama, la *ISG15* libre extracelular parece tener actividad antitumoral *in vivo*, mientras que la *ISGilación* se ha asociado *in vitro* con actividad pro-tumoral^{4,9}.

La sobreexpresión de *ISG15* está significativamente correlacionado con un pronóstico desfavorable de cáncer de mama, dado que la mayor expresión de *ISG15* se presentaba en tumores de tercer grado. Por ello se cree que *ISG15* podría ser un potencial biomarcador⁹. Además, un estudio determinó que la sensibilidad de las células de cáncer de mama a camptotecina (un inhibidor de la topoisomerasa del ADN) depende de la expresión de *ISG15*. La camptotecina y sus derivados se utilizan como tratamientos de segunda o tercera línea para el cáncer de mama resistente a la terapia endocrina⁹. Adicionalmente, *ISG15* está siendo considerado como un antígeno asociado a tumores para inmunoterapia contra el cáncer⁴.

5.3 ISG15 en cáncer de páncreas

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) es actualmente la cuarta causa más frecuente de muerte relacionada con el cáncer en todo el mundo, y se prevé que se convierta en el segundo cáncer más mortal para 2030. Los tumores pancreáticos son extremadamente heterogéneos, entre esta población heterogénea de células existe la llamada célula madre cancerosa (CSC), que no solo impulsa la heterogeneidad del tumor al dar lugar a todas las demás células cancerosas (es decir, no CSC) presentes dentro del tumor, sino que también es responsable de la recaída de la enfermedad postoperatoria. Por lo tanto, la eliminación de esta subpoblación de células tumorales de tipo madre puede representar la única estrategia exitosa para tratar el PDAC. Un número creciente de estudios sugiere que las alteraciones en la mitofagia pueden afectar severamente los fenotipos de las células (madre) y la plasticidad celular. Por lo tanto, las modificaciones postraduccionales pueden afectar la plasticidad celular o las transiciones del destino celular en múltiples niveles¹⁵.

ISG15 es secretado por macrófagos asociados a tumores (TAM) específicamente en adenocarcinoma de próstata ductal (APD) es decir, ISG15 libre extracelular aumenta el fenotipo de las células madre cancerosas y en respuesta a tratamientos con IFN- β también secretan ISG15 libre ⁴, sin embargo, la expresión y el papel de ISG15 e ISG15 endógenos en células madre cancerosas de páncreas (PaCSCs) no se ha analizado hasta la fecha¹⁵. La expresión de ISG15 es significativamente mayor en los tumores PDAC frente a tejido sano adyacente, al presentarse mayormente en los tumores basales se puede utilizar para predecir la supervivencia del tumor, ISG15 libre se correlaciona con la estadificación de la enfermedad ¹⁵.

Algunos tratamientos para cáncer son inmunomoduladores utilizan interleucinas 1 y 2 además de IFN tipo I. Además, estos interferones junto con IFN- γ pueden ser parte del microambiente tumoral y como se ha mencionado ISG15 es estimulado por dichos interferones, por lo que se cree tiene alguna función crítica en dicha patología ¹³. En general, ISG15 se detecta incrementado en diversos tipos de cáncer. A continuación, se describen algunos ejemplos (Tabla 7).

5.4 ISG15 en otros tipos de cáncer

Tabla 7: Lista de algunos tipos de cáncer en los que se ha determinado la relación de la proteína del gen estimulada por interferón 15 (ISG15).

Tipo de cáncer	Observaciones
Cáncer de pulmón y Carcinoma nasofaríngeo	Niveles de ISG15 elevados. Aumento de la expresión de Proteína similar a la enzima E1 activadora de ubiquitina (UBE1L), enzima H8 conjugadora de ubiquitina (UBCH8). Se cree que la progresión depende de ISG15 libre.
Cáncer de próstata	Andrógenos regulan negativamente la expresión de ISG15 sin embargo ISG15 y el sistema de ISG15 regulan positivamente la expresión del receptor de andrógenos promoviendo la proliferación celular.
Cáncer colorrectal	En las células deficientes de (<i>KLF9</i>) factor parecido a Kruppel 9: Altos niveles de ISG15 aumentan la progresión del cáncer Debido a su actividad anti apoptótica.
Carcinoma escamoso oral	La expresión de miR-138 disminuye los niveles de ARN mensajero (ARNm) para ISG15, disminuyendo la migración y proliferación celular. Se demostró que ISG15 libre interactúa con GTPasa pequeña de la familia Rac 1 y guanosin difosfato (Rac1-GDP) en carcinoma oral de células escamosas (COCE). Esta interacción ocurre en las protuberancias de la membrana, y ISG15 libre parece aumentar la actividad de Rac1 para inducir la migración celular. Este mecanismo fue asociado con la metástasis linfática de este tipo de cáncer, pero no con el crecimiento tumoral.
Carcinoma hepatocelular	También se ha propuesto que Las 3' regiones no traducidas regula procesos del ARNm (3'UTR), en el ARNm de <i>ISG15</i> puede estar regulado por el micro ARN 370 (miR-370), reduciendo el desarrollo de tumores en ratones inmunodeficientes.
como el cáncer de cervix, sangre y ovarios	La expresión de <i>ISG15</i> aumenta la apoptosis, reduce la proliferación y disminuye el desarrollo de tumores, lo que sugiere una actividad antitumoral para ISG15.
Tipo de cáncer	
Cáncer de cuello Uterino	ISG15 induce la apoptosis e inhibe la proliferación de células cancerígenas a través de mecanismos. Asociado la proteína tumoral (p53).
Cáncer de Ovario en estado avanzado	La expresión de ISG15 aumenta el número de linfocitos linfáticos CD8 + que infiltran el tumor disminuyendo la progresión del cáncer de ovario. La sobreexpresión de ISG15 se ha asociado con la ISG15 de cinasa regulada por señales extracelulares (ERK).

La expresión de ISG15 se ha encontrado en la mayoría de los tipos de cáncer incrementada y se sugiere su función pro-tumor. Sin embargo, en algunos tipos de cáncer se ha detectado que la disminución de la expresión de ISG15, promueve la proliferación, sugiriendo su actividad antitumor. (Tabla 8) ⁴.

Tabla 8: Modificación de la actividad del gen estimulado por interferón 15 (ISG15) en algunos tipos de cáncer.

Tipo de Cáncer	Actividad de ISG15
Cáncer de pecho	Protumor
Cáncer de próstata	Protumor
Melanoma	Protumor
Carcinoma hepatocelular	Protumor
Cáncer de pulmones	Protumor
Carcinoma nasofaríngeo	Protumor
Cáncer oral	Protumor
Adenocarcinoma pancreático ductal	Protumor
Cáncer de cérvix	Antitumor
Cáncer en la sangre	Antitumor
Cáncer de ovarios	Protumor

ISG15 libre y conjugado tienen un papel importante en el desarrollo del cáncer; sus funciones en tumorigénesis continúan siendo ambiguas porque ISG15 tiene actividades que son tanto pro-tumorales como antitumorales, y estos roles duales parecen estar asociados con el tipo de célula cancerosa particular y el contexto celular como se muestra en la tabla 8⁴.

6. CAPÍTULO 3.

6.1 ISG15 y la ISGilación en enfermedades neurodegenerativas.

6.1.1 El sistema nervioso central y periférico

El cuerpo humano consta de muchos sistemas y aparatos que le ayudan a realizar lo necesario para vivir, y todos ellos están controlados por el sistema nervioso. El sistema nervioso se divide en **sistema nervioso central (SNC)** y **sistema nervioso periférico SNP** (Tabla 9); el primero abarca la medula espinal, el cerebro, el cerebelo y el tronco cerebral; y el segundo comprende los nervios raquídeos, los craneales y también el sistema autónomo. Solo las interneuronas se encuentran localizadas en el SNC mientras, que las neuronas aferentes y eferentes pueden encontrarse indistintamente en el SNC o SNP. Los tejidos en el SNC se pueden dividir en sustancia gris (formada por cuerpos neuronales, dendritas y terminaciones axónicas no miélinicos) y sustancia blanca (contiene principalmente axones miélinicos. La red formada por las unidades celulares funcionales comprende las neuronas (Fig. 8) y otras células de sostén que no son capaces de conducir información pero que son indispensables para el correcto funcionamiento del sistema nervioso, es decir las células de la neuroglia y pocos cuerpos celulares ¹⁶.

Tabla 9: Células de la neuroglia. sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP).

Tipo celular	Función
Astrocitos	Son las células de la neuroglia más abundantes del SNC. Son células grandes y estrelladas que ayudan a mantener un medio óptimo para las neuronas. También forman parte de la barrera hematoencefálica (BHE).
Células de la microglía	Son de pequeño tamaño y poseen actividad fagocítica.
Células endimarias	Revisten los ventrículos del cerebro y medula espinal y participan en la formación del líquido cefalorraquídeo.
Células satélites	Sostienen cuerpos de células neuronales dentro de los ganglios del SNP.
Oligodendrocitos	Son células que mantienen unidas las fibras nerviosas y constituyen la vaina de mielina que rodean las fibras nerviosas del SNC.
Células de Schwann	Se localizan en el SNP y forman las vainas de mielina alrededor de los axones.

La **medula espinal** está en constante interacción con el SNP y tiene gran relevancia en las funciones tanto sensoriales como motoras, porque recibe la información sensorial que le transmite desde el tronco y las extremidades, la procesa y canaliza al encéfalo. Está formada por sustancia gris y sustancia blanca¹⁶.

El **tronco del encéfalo** está formado por tres divisiones caudales del encéfalo: bulbo raquídeo, el puente o protuberancia y el mesencéfalo; recibe información somática del tronco y las extremidades por las vías que ascienden desde la medula espinal además es fundamental para el control motor. Controla la inervación motora de la cabeza a través de los nervios craneales. Es el centro por el que los hemisferios cerebrales se comunican con el cerebelo lleva a cabo funciones sensoriales y motoras. Las tres divisiones bulbo raquídeo, puente y mesencéfalo tienen dos componentes comunes. El líquido **cefalorraquídeo** junto con las meninges constituye un sistema protector de los centros nerviosos, recubre el cerebro y la medula y está aislado del espacio extracelular. Sirve protegiéndolos de los golpes potencialmente lesivos y contra los cambios agudos de la presión venosa¹⁶.

Encéfalo. anatómicamente el encéfalo consta de seis partes: cerebro (incluyendo la corteza y el cuerpo calloso), diencefalo (incluyendo el tálamo, el hipotálamo y la glándula pineal), cerebelo, bulbo raquídeo, protuberancia y mesencéfalo¹⁶.

El tálamo recibe aferencias nerviosas principalmente de tractos de ojos y el oído, el hipotálamo controla la homeostasis. El cerebro está situado en la parte superior del encéfalo, es la estructura más grande y ocupa casi toda la cavidad craneal¹⁶.

El cerebelo realiza, principalmente funciones relacionadas con el control de los músculos esqueléticos y la coordinación del movimiento¹⁶.

El soporte estructural de la función del sistema nervioso son las neuronas, conexionadas en las sinapsis mediante neurotransmisores. El soma de las neuronas contiene el núcleo celular y un citoplasma con diversos orgánulos, además de participar en la comunicación celular, las neuronas son células secretoras que poseen unas vesículas, denominadas vesículas sinápticas donde se almacenan los neurotransmisores. Las dendritas son las encargadas de recibir los estímulos, mientras que los axones son las estructuras encargadas de conducir el impulso lejos del cuerpo celular. En las terminaciones axónicas se localizan los botones sinápticos que contienen numerosas vesículas (Fig. 8), que pueden ser activadores, inhibidores o

neuromoduladores. Los mecanismos y las causas de las lesiones y alteraciones del sistema nervioso no son específicos pues se trata de agresiones por agentes físicos, tóxicos, isquemia, tumores o inflamación, entre otros. Los impulsos corticales tienen que atravesar las vías piramidales (primera neurona o motoneurona superior) y terminal común (segunda neurona o motoneurona inferior para llegar a los músculos efectores)¹⁶.

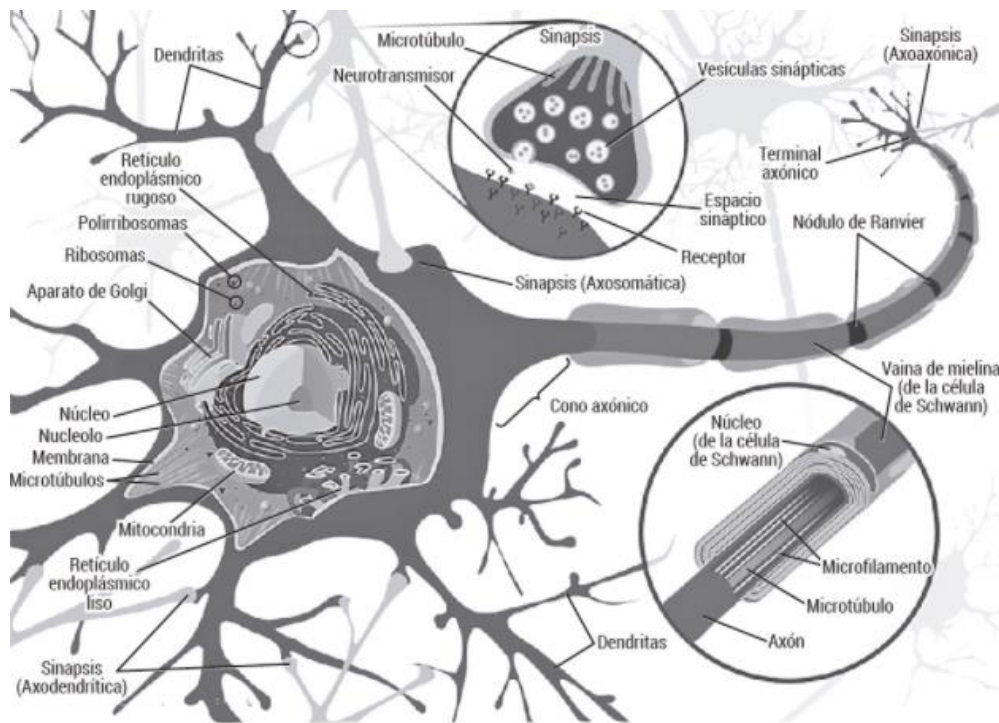


Imagen tomada de: Seco, J. Parte IV: Fisiología Del Sistema Nervioso. In *Sistema Nervioso*; Editorial Medica Panamericana: México, 2020.

Figura 8: Partes de una neurona, están especializadas en recibir información, tomar decisiones en función a la información recibida y transmitir señales a otras neuronas o células efectoras. Aunque solo representan el 10% son las unidades funcionales del sistema nervioso. Desde el punto de vista estructural, las partes de una neurona son cuerpo celular o soma, axón y dendritas¹⁶.

En función del número de prolongaciones que presentan las neuronas se establece la siguiente clasificación: Neuronas multipolares, bipolares, unipolares y anaxónicas. Las neuronas multipolares poseen un único axón y varían dendritas. Las neuronas bipolares presentan un único axón y una dendrita, las unipolares o pseudounipolares tiene una única prolongación que parte del cuerpo celular. Finalmente, las neuronas anaxónicas no poseen un axón aparente. En función a la información que transmiten se dividen en aferentes y eferentes¹⁶.

La *neuroplasticidad* es la capacidad que tiene el tejido neuronal de reorganizar y modificar los mecanismos biológicos, bioquímicos y fisiológicos implicados en la comunicación intercelular para adaptarse a los estímulos recibidos. Esta característica conlleva a modificaciones del tejido neural que incluyen la regeneración axonal, la colateralización, la neurogénesis, la sinaptogénesis y la reorganización funcional entre muchos otros¹⁷.

6.2 Generalidades de las enfermedades neurológicas

Los trastornos neurológicos ocupan el primer lugar entre las enfermedades más incapacitantes y, con el envejecimiento poblacional se pronostica incrementen su incidencia en los próximos años. Uno de los principales paradigmas en el tratamiento de las enfermedades neurológicas es la baja tasa de reparación del sistema nervioso central. Los tratamientos actuales están limitados a mitigar los síntomas, pero no revertir la enfermedad. Los tratamientos convencionales se basan, por un lado, en cirugías costosas, altamente invasivas y no siempre efectivas. Por otro lado, la administración de fármacos está limitada por las características fisicoquímicas del principio activo que pueden impedirles atravesar la BHE¹⁸.

Las lesiones en el cerebelo producen alteraciones en la coordinación muscular, que se le conoce con el nombre de ataxia cerebelosa, existen tres tipos la sensitiva, cerebelosa y vestibular. Además, si hay reducción del número de neuronas puede deberse a lesiones isquémicas, inflamatorias o degenerativas¹⁷.

Las enfermedades cerebrovasculares están causadas por un bloqueo en la circulación cerebral que provoca un trastorno transitorio o definitivo en una o varias partes del encéfalo con implicaciones considerables en el pronóstico funcional se clasifican en dos grupos isquémicos y hemorrágicos. Cuando hay una disminución súbita del flujo sanguíneo por una oclusión arterial se denomina isquemia y cuando hay una extravasación de sangre desde el espacio intravascular al interior del tejido cerebral se denomina hemorrágico¹⁷.

Adicionalmente, es importante destacar que la prevalencia global de la demencia en sujetos mayores de 65 años es de aproximadamente el 8%. Su incidencia aumenta con la edad y se duplica cada 5 años partir de los 65 años. La demencia ocasiona un deterioro en la capacidad intelectual y en la autonomía de la persona afectada, debido al envejecimiento de la población la carga global de la demencia ha aumentado y actualmente representa un gran problema sanitario. Las demencias degenerativas primarias son caracterizadas por la pérdida neuronal y sináptica y por el depósito de agregados proteicos insolubles intracelulares y extracelulares. Dentro de las enfermedades degenerativas se encuentra el Alzheimer, y la enfermedad de Parkinson¹⁷.

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo multisistémico progresivo e incurable. La lesión primordial es una pérdida neuronal de la parte compacta de la sustancia negra del tronco cerebral que genera un déficit dopaminérgico. Su principal manifestación es el trastorno del movimiento. La edad media de inicio es de 55 años. Afecta casi por igual a ambos sexos, en una proporción de 1,2 varones por cada mujer¹⁷.

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es un trastorno neurodegenerativo, de etiología indeterminada, caracterizado por la afectación primordial de la población de neuronas motoras. Es un trastorno progresivo que provoca debilidad, discapacidad y finalmente, el fallecimiento de los pacientes, con una mediana de supervivencia de entre 3 a 5 años. La diferencia con otros trastornos neurodegenerativos es la afectación clínico-patológica de tres sistemas particulares: las redes de neuronas motoras inferiores, las redes de neuronas motoras superiores y en determinados casos, sus conexiones frontotemporales. La afectación de las motoneuronas inferiores determina debilidad, atrofia y fasciculaciones en los músculos afectados, La pérdida de motoneuronas superiores determina reflejos musculares hiperactivos, lo que genera músculos atrofiados y débiles¹⁷.

6.3 ISG15 en alteraciones neurológicas.

La ISG15 emerge como un factor asociado con varios trastornos neurológicos, incluido el accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática (TCE), calcificación de los ganglios basales y ataxia-telangiectasia como se describe a continuación.

6.4 ISG15 en Ataxia Telangiectasia.

La ataxia-telangiectasia (AT) es un trastorno neurodegenerativo que ocurre en la etapa de la infancia con una incidencia de 1 de cada 40.000 niños en los EE. UU. y anualmente 1 de cada 200.000 en todo el mundo. Es un raro trastorno hereditario autosómico recesivo que afecta principalmente al sistema nervioso e inmunológico. Se sabe que los pacientes con AT también tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer además las personas afectadas son muy sensibles a la radiación, incluyendo radiografías médicas. Ataxia se refiere a una falta de coordinación en movimientos, como caminar, y la telangiectasia es el agrandamiento de los capilares justo debajo de la superficie de la piel, esto último es un signo característico en los pacientes con AT. Esta característica se ha atribuido a que el (gen *Atm*) ataxia telangiectasia mutada es “defectuoso” en AT pacientes¹¹.

La proteína (ATM) es una cinasa crítica para el mecanismo de reparación del ADN y para mantener la homeostasis celular ¹⁹. Cuando ATM es activada fosforila varias proteínas clave que inician la activación de los puntos de control de daños en el ADN, como la detención del ciclo celular y reparación del ADN para favorecer la supervivencia celular. Por lo tanto, un defecto en el gen que genera esta proteína tiene graves consecuencias en las células con daño en el ADN, especialmente en el caso de células diferenciadas, como las neuronas. Por ello si hay un defecto en la vía de reparación del ADN se ha relacionado con el daño progresivo neurológico¹¹.

Se cree que alteraciones en las vías de ubiquitina y autofagia contribuyen a la neurodegeneración porque se ha informado la presencia de depósitos de proteínas plegadas en regiones cerebrales en enfermedades como Alzheimer, Parkinson, y enfermedad de Huntington. En la mayoría de los casos, los depósitos proteicos estaban compuestos de ubiquitina conjugadas, lo que sugiere un fracaso en su degradación a través de la vía proteosoma ubiquitina/26S pues es la principal maquinaria proteolítica celular responsable de la destrucción selectiva de proteínas en los mamíferos, no obstante, también hay proteínas ubiquitinadas que son eliminadas por autofagia. Una reducción de la degradación de proteínas en las células AT se asocia con expresión elevada de *ISG15* pues *ISG15* conjugado ejerce su efecto biológico inhibiendo poliUbiquitinación de proteínas celulares es decir *ISG15* inhibe la ruta de ubiquitina. También se ha encontrado depósitos de *ISG15*/Ubiquitina en tejidos cerebrales en humanos post-mortem por lo tanto esto apunta hacia la posibilidad de que, *ISG15* contribuye a la atrofia neuronal en AT¹¹.

La mitofagia es defectuosa en varias enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de AT. Se cree que si hay formación de cadenas mixtas de *ISG15*-Ub formadas por proteínas de membrana externa mitocondrial (Mfns) estas no son funcionales, siendo incapaces de segregar mitocondrias y/o transmitir señales a los mediadores de la autofagia, en consecuencia, se inhibe la mitofagia en células AT²⁰. Se ha encontrado que al suprimir la vía *ISG15* se reduce el estrés oxidativo y nivel de mitocondrias “enfermas”, lo que sugiere restauración de mitofagia en las células AT. *ISG15* también esta constitutivamente elevada y la mitofagia es defectuosa en ELA²⁰.

Las mitocondrias defectuosas/despolarizadas se acumulan en las células AT, y se ha encontrado que las mitocondrias parcialmente despolarizadas que aún conservan algo de polaridad, se generan durante el proceso de fisión normal. Si estas mitocondrias despolarizadas se polarizan, y entran en la red mitocondrial sana. Si no, se eliminan *mediante* mitofagia. Por lo tanto, al haber niveles constitutivamente elevados de *ISG15* puede ser un mecanismo bioquímico unificador común subyacente de mitofagia defectuosa en AT y ELA, lo que sugiere el papel potencial de los inhibidores de *ISG15* para el tratamiento de estos desordenes²⁰.

6.5 ISG15 y su repercusión en el desarrollo dendrítico.

La ramificación dendrítica y la densidad de la columna es imprescindible para que las neuronas lleven a cabo funciones cognitivas especializadas, y la pérdida de ramificación dendrítica o densidad se ha observado ampliamente en trastornos del neurodesarrollo. En estudios recientes se ha descrito que ISG15 está involucrado en la inflamación y el desarrollo de dendritas neuronales. En un estudio se observó que la activación inmunitaria materna (MIA) inducida por infecciones durante el embarazo aumentan el riesgo de desarrollar varios trastornos psiquiátricos en la descendencia, como depresión, esquizofrenia y trastorno del espectro autista; dado que se inducían comportamientos similares a la depresión y que la descendencia presentaba deficiencias dendríticas además de que el nivel de ISG15 aumentaba en su cerebro y había una sobreexpresión de ISG15 en la corteza prefrontal de ratones recién nacidos a nivel celular, ISG15 fue en gran parte expresado en el soma neuronal y dendritas por ello se suprimió la señalización NEDD4/Rap2A. La proteína E3 ligasa de Ubiquitina (NEDD4) se expresa abundantemente en las neuronas de mamíferos, es un modulador crucial para la ramificación de axones y dendritas. En cambio, altos niveles del miembro de la familia de oncogenes RAS (Rap2A) impide el desarrollo de las dendritas e induce conductas depresivas en la descendencia. NEDD4 media la ubiquitinación y degradación de Rap2A. La alteración de la función de NEDD4 inhibe gravemente la ramificación del axón en las células ganglionares retinianas de *Xenopus*, y la eliminación de NEDD4 altera el desarrollo de dendrítico en neuronas dicho deterioro de la dendrita ha sido considerado como una base estructural de la depresión. Estos datos proporcionados evidencian la posible implicación de ISG15 en el neurodesarrollo²¹.

Como ISG15 participa activamente en inflamación, las citocinas como IL-1, IL-2, IL-6, el factor de necrosis tumoral Alpha (TNF α), IFN β e IFN α inducidos por MIA aumentaron el nivel de ISG15, inhibiendo el desarrollo dendrítico de las neuronas. Por lo tanto, ISG15 juega un papel vital en los déficits de crecimiento de neuritas inducidos por MIA y comportamientos anormales en la descendencia²¹.

6.6 ISG15 un potencial biomarcador de lesiones neuronales.

ISG15 puede ser un biomarcador adecuado para detectar lesiones neuronales en el SNC dado que se ha observado un aumento drástico de ISG15 en el cerebro de ratones sometidos a isquemia global y TCE²².

El gen *ISG15* se regula positivamente después de la isquemia cerebral y se ha demostrado su actividad como neuroprotector en este contexto²³. Particularmente, los niveles de proteína ISG15 están dramáticamente elevados en astrocitos dentro de áreas específicas donde las neuronas motoras espinales se están degenerando. Por lo tanto, ISG15 podría ser un biomarcador fiable para detectar cambios patológicos tempranos en la médula espinal²².

Además, la ISGilación de proteínas aparece como un mecanismo endógeno neuroprotector reduciendo el daño cerebral en respuesta a estímulos patógenos. En ratones que carecen de la proteasa específica de ubiquitina (USP18) que es responsable de la desISGilación, muestran una disfunción neurológica grave acompañado de una alteración de la BHE. Además, los ratones knockout para ISG15 y UBE1L presentaron una mayor susceptibilidad a las infecciones virales y daño cerebral¹⁹.

6.7 La ISGilación en el edema cerebral

El edema cerebral tiene una tasa de mortalidad de hasta el 90% y, por lo general, los pacientes mueren en 6 días en comparación con aquellos niños que no desarrollan edema cerebral. El edema cerebral difuso se desarrolla con más frecuencia en niños que en adultos después de una lesión cerebral una TCE, sin embargo, en los adultos es más probable que desarrollen un edema secundario que resulte en un mal pronóstico. El citoesqueleto es una de las estructuras que se ha visto implicada en la alteración de la BHE y el desarrollo de edema cerebral que acompañan a la isquemia²³. Se ha demostrado que la ISGilación aumenta después de una TCE en ratones. La integridad de la BHE se investigó mediante extravasación de azul de Evans (EB). Se ha demostrado que ISG15 modifica postraduccionalmente la actina, convertirla de actina F²³.

El papel preciso de la ISGilación de proteínas en la fisiopatología del cerebro sigue sin una respuesta completa. La ISGilación parece crítica en la regulación del daño cerebral isquémico y la prevención de tal ISGilación exacerba el daño cerebral. Por lo tanto, la identificación de las proteínas ISGiladas puede ayudar a desarrollar mejores estrategias terapéuticas¹⁹. Además, aunque no se conoce directamente la relación de ISG15 con enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento como enfermedades de Alzheimer o Parkinson, la alteración en vías degradativas del proteosoma y autofágicas, sugieren una conexión molecular con la proteína ISG15 que aún es necesario investigar.

7. CAPÍTULO 4

7.1 El impacto de ISG15 en infecciones virales.

Cuando se presenta una infección las primeras líneas de defensa contra los patógenos virales es la respuesta inmune innata que puede actuar restringiendo la replicación del virus poco después de la infección. Las células inmunes, tales como neutrófilos y macrófagos, así como IFN son elementos críticos de la inmunidad innata²⁴.

Se ha investigado a ISG15 ampliamente en cuanto a sus posibles efectos al combatir infecciones virales y bacterianas. Existe una creciente evidencia de que ISG15 no conjugado puede regular la replicación viral y las respuestas del huésped a través de interacciones de proteínas no covalentes y su acción como citocina: la ISGilación de proteínas virales puede inhibir directamente sus funciones²⁵.

La evidencia genética humana de pacientes que no expresan ISG15 ha revelado la importancia de ISG15 en la regulación de la respuesta al interferón tipo I. Los pacientes nulos para ISG15 muestran autoinflamación por interferón tipo I y ningún aumento aparente de la susceptibilidad a la infección viral. En contraste, los ratones deficientes en la expresión de ISG15 son más susceptibles a infecciones virales, lo que indica diversidad funcional entre las especies²⁶.

7.2 ISG15 puede inducir un estado antiviral.

La regulación al alza de los ISG mediada por IFN da como resultado un estado antiviral, lo que reduce la propagación viral. La expresión de ISG15 aumenta tras la estimulación con IFN (Fig. 9). El IFN de tipo I se induce cuando los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), incluido el ARN viral bicatenario (dsARN), se detectan en el citoplasma mediante la proteína del gen 1 inducible por ácido retinoico (RIG-I). Al unirse a dsARN, los receptores RIG-I-like (RLR) experimentan un cambio conformacional que permite la ubiquitinación de sus dominios de reclutamiento de caspasas (CARD). Las CARD Ubiquitinadas son reclutadas en las mitocondrias por la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS) donde inician una cascada de señalización que conduce a la translocación nuclear del factor regulador de interferón 3 (IRF3). Estos factores de transcripción son activadores importantes de los promotores de IFN de tipo I, lo que da como resultado un aumento de la producción de IFN- α e IFN- β . IRF3 puede activar directamente la transcripción

de varios ISG, incluido ISG15. Los IFN de tipo I se secretan y posteriormente se unen al receptor de IFN- α / β (IFNAR) en las membranas celulares de la célula infectada y las células vecinas, activando el sistema de JAK/STAT, que resulta en la fosforilación de las proteínas transductores de señales y activadoras de la transcripción (STAT), que a su vez forman un complejo con el regulador de interferón 9 (IRF9) llamado factor 3 del gen estimulado por IFN (ISGF3). ISGF3 se une a ISRE dentro de los promotores de ISG, aumentando la transcripción y expresión de cientos de ISG, incluidos ISG15 y sus enzimas conjugadoras UBE1L, UBCH8, EFP y HERC5, así como USP18²⁵.

La USP18 también se une a la segunda cadena del complejo del receptor 2 de interferón α / β (IFNAR2), compitiendo con la cinasa Janus 1 (JAK1) por la unión al receptor y, por lo tanto, funciona como un regulador negativo de señalización de interferón tipo I en humanos y ratones ²⁶. A pesar del hecho de que ISG15 generalmente se considera una proteína antiviral, también se ha descrito que ISG15 regula negativamente la señalización de IFN de tipo I, en varios lugares de esta vía. La señalización de IFN de tipo I es crítica para la respuesta inmune innata antivirales, pero la señalización de IFN excesiva puede resultar en patogénesis autoinflamatoria²⁴.

En humanos la ausencia de ISG15 provoca que la USP18 humana se degrade, y esto permite la unión continua de la cinasa de Janus 1 (JAK1) al complejo IFNAR2 y la prolongación de la señalización del interferón tipo 1 por lo tanto se activa la expresión de ISG. Por el contrario, la ISG15 de ratón no altera la estabilidad de la USP18 de ratón y su capacidad de suprimir la señalización del IFNAR, aunque la razón precisa de esta diferencia aún no está clara. Esto puede dar cuenta de parte de la diferencia en ISG15 función entre especies ²⁴.

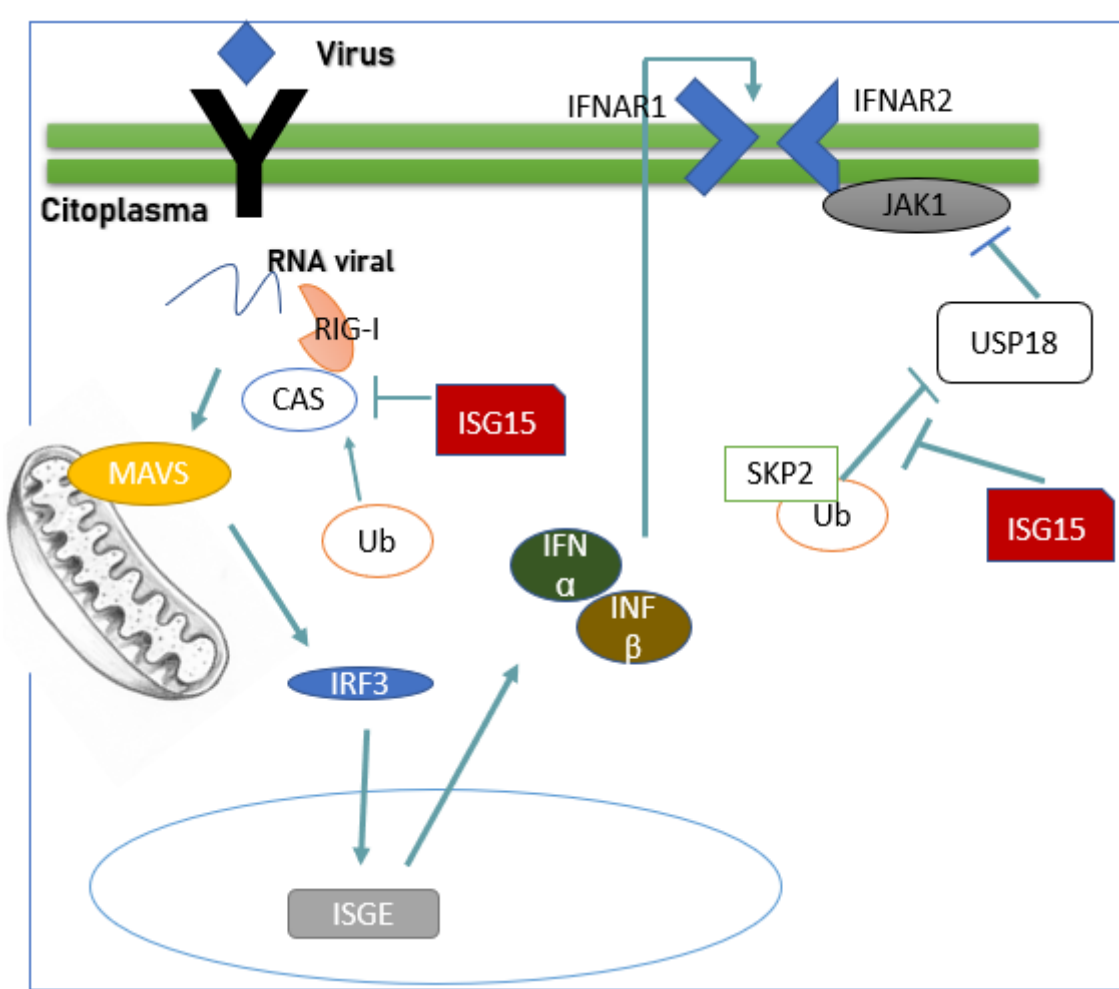


Figura 9: El papel de la proteína del gen estimulada por interferón 15 (ISG15) en este sistema de regulación de retroalimentación negativa parece ser específica para seres humanos. La ISG15 inhibe esta vía marcándolo para degradación proteosómica. Además, la proteína del gen estimulada por interferón 15 (ISG15) estabiliza la interacción entre el receptor 2 del interferón alfa (IFNAR2) y la peptidasa específica de ubiquitina 18 (USP18), inhibiendo la ubiquitinación de USP18 mediada por la proteína 2 asociada a cinasa de fase S que es importante para llevar a cabo la Ubiquitinación (SKP2). Esto evita la degradación proteosómica de USP18, resultando en una disminución de la expresión de los genes estimulados por interferón (ISG) y una moderación de la respuesta del interferón (IFN).

Al principio, se planteó la hipótesis de que ISG15 regularía la respuesta antiviral del huésped. Esto se debió a la rápida regulación positiva de ISG15 y miembros de la cascada de conjugación por interferones de tipo I. Durante la infección por virus de la Influenza tipo B, los ratones que carecen de ISG15 o UBE1L presentaron un aumento del virus en sus pulmones en comparación con los ratones de tipo silvestre, y las células derivadas de estos ratones apoyaron el aumento de la replicación viral, lo que respalda la hipótesis de que la ISGilación restringe la replicación viral no obstante no son susceptibles a todos los virus. En humanos que no expresan ISG15 se presenta autoinflamación por interferón tipo I, pero ningún aumento aparente a la susceptibilidad a infecciones virales lo que indica que ISG15 puede tener funciones divergentes entre diferentes especies²⁶.

En estudios recientes se ha demostrado que la ISGilación de proteínas del huésped y virales pueden interrumpir la replicación viral como se menciona a continuación.

7.3 ISGilación de proteínas virales

Se cree que la ISGilación, de proteínas virales es guiada por la localización de E3 proteína ligasa de ISG15 pues HERC5 se encuentra en polirribosomas, específicamente se asocia con la subunidad ribosómica 60S, que contiene el túnel de salida, y permite la ISGilación preferencial de proteínas recién sintetizadas (Fig.10)²⁴. Aunque no se ha informado de una caracterización extensa de la ISGilación de proteínas durante diferentes infecciones virales, se han identificado varias proteínas virales como sustratos para la conjugación de ISG15. La ISGilación de proteínas virales puede interrumpir su interacción con las vías del huésped que se requieren para la replicación, interrumpir la oligomerización de proteínas virales, o la función de la proteína viral, lo que resulta en una replicación viral reducida o la alteración de la respuesta inmune del huésped²⁶.

ISG15 puede obstaculizar la replicación viral al interferir con la traducción endógena y la maquinaria de exocitosis que los virus secuestran para replicarse. El factor de inicio eucariote 4E (eIF4E) facilita el inicio de la traducción. La proteína homóloga de eIF4E (4EHP) se une a la caperuza 7-metil-guanosín-trifosfato (5'CAP) del ARN mensajero (ARNm) tanto celulares como virales, impidiendo la traducción al competir con eIF4E (Fig. 11). La ISGilación de 4EHP mejora el efecto inhibitorio sobre la traducción, probablemente debido a una estabilización de la interacción entre la proteína homóloga de eIF4E y la caperuza 7-metil-guanosín-trifosfato (4EHP-CAP). Se ha propuesto que ISG15 puede conjugar selectivamente ARNm virales protegidos con 4EHP como un mecanismo de inhibición selectiva de la traducción del ácido ribonucleico (ARN) viral. Los objetivos potenciales incluyen virus como el dengue, del Nilo Occidental, fiebre amarilla, Kunjin, y los virus de la encefalitis japonesa, que contienen tapas ARN de sentido positivo²⁴.

La proteína cinasa R (PKR), es una proteína inducida por interferón que se une al dsARN y, una vez activada, puede fosforilar a la proteína de factor de iniciación de la traducción eucariótica (eIF2 α) e inhibir la traducción del ARNm celular. PKR está ISGilado en lisinas 69 y 159 después de la estimulación con interferón o lipopolisacáridos (LPS); la PKR ISGilada exhibió una activación constitutiva independiente del ARN que resultó en una disminución de la síntesis de proteínas. Sin embargo, no está claro si la ISGilación de PKR da como resultado un antagonismo directo de la replicación del virus²⁶.

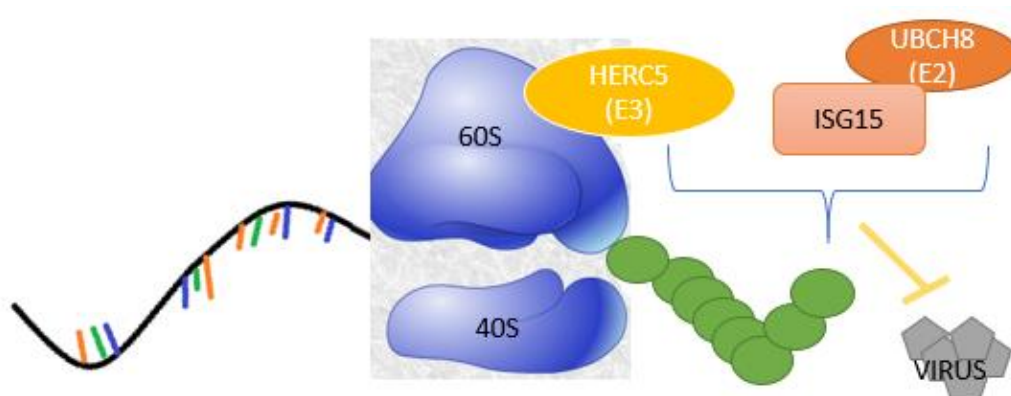


Figura 10: La Enzima Dominio HECT y RLD que contiene la proteína ligasa de ubiquitina E3 (HERC5) se encuentra mayoritariamente en la subunidad 60S ribosomal, por ello se considera que en una infección viral tiene preferencia por las proteínas recién sintetizadas, y estas al ser ISGiladas pueden disminuir la replicación y por lo tanto la infectividad del virus. La (UBCH8) enzima H8 conjugadora de ubiquitina es necesaria para que se lleve a cabo la ISGilación pues se une con HERC5.

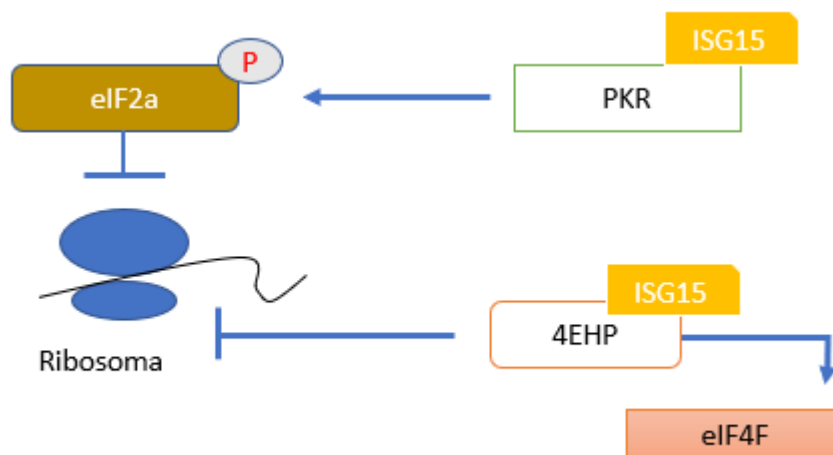


Figura 11: Si la proteína homóloga 4E (4EHP) es ISGilada por la proteína del gen estimulada por interferón 15 (ISG15), esto aumenta su afinidad a 7-metilguanosina de la tapa del ARN mensajero (ARNm) de unión, desplazando al factor de iniciación de traslación eucariótico (EIF4F), generando una inhibición de la traducción de proteínas a su vez la ISGilación de la proteína cinasa R (PKR) promueve la fosforilación y activación del supresor de la traducción eIF2 α . PKR fosforila la proteína de factor de iniciación de la traducción eucariótica (eIF2 α) en respuesta al ARN de doble cadena (dsARN) y al estrés celular, incluidas las infecciones virales²⁶.

Otro objetivo de la ISGilación viral es la proteína UL26 que está presente en el virión (pUL26) del citomegalovirus humano (HCMV). El pUL26 activo suprime la señalización del factor de transcripción nuclear kappa (NF- κ B), pero la conjugación de ISG15 inhibe esta actividad y da como resultado una disminución de la replicación del HCMV ²⁴.

7.4 Otros mecanismos antivirales dependientes de ISG15

7.4.1 La ISGilación interfiere con la oligomerización de proteínas virales.

Muchas proteínas virales dependen de la formación de oligómeros o complejos para realizar sus funciones. La ISGilación de estas proteínas virales como una estrategia antiviral es particularmente efectivo. ISG15 conjugado causa un impedimento estérico, evitando una mayor oligomerización una vez que se incorpora una proteína ISGilada. Por lo tanto, un porcentaje relativamente pequeño de ISGilación de las proteínas virales puede lograr un efecto inhibidor dominante ²⁴.

Un ejemplo de cuando se afecta la oligomerización esta dado por la nucleoproteína (NP) del virus de la influenza B (IBV), que es un componente de la ribonucleoproteína (RNP) del IBV y es fundamental para sintetizar el ARN viral. El NP de IBV ISGilado actúa como un inhibidor negativo dominante de la oligomerización de NP (Fig.12), lo que restringe la síntesis de ARN viral y reduce la replicación del IBV. Otro ejemplo es la proteína L1 de la cápside del virus del papiloma humano (VPH) también puede ISGilarse y luego incorporarse en partículas virales. Tanto el número como la infectividad de las partículas disminuyen debido a alteraciones geométricas de la cápside ²⁶.

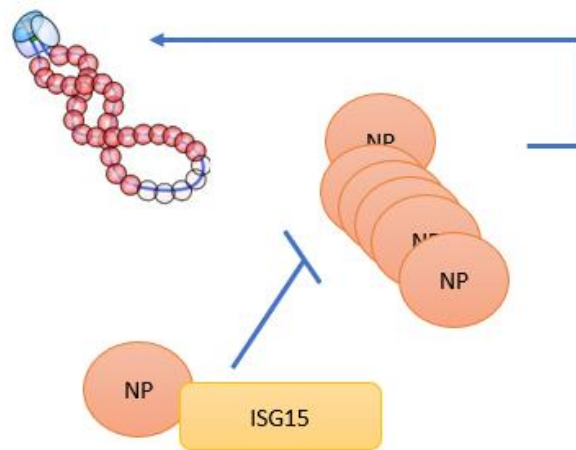


Figura 12: Cuando la nucleoproteína cuya principal función es empaquetar el ARN viral (NP) es ISGilada por la proteína del gen estimulada por interferón 15 (ISG15) provoca un impedimento estérico por lo que no se puede llevar a cabo la oligomerización dando como consecuencia una disminución de la infectividad viral.

7.4.2 ISG15 Inhibe la salida del virus.

ISG15 interfiere con la gemación de partículas al inhibir las enzimas endógenas necesarias para este proceso²⁴. En estos ejemplos, no es la ISGilación de proteínas virales sino más bien la modificación de las proteínas del huésped que se requieren para la liberación viral lo que se ve afectado. Se demostró que ISG15 inhibe la gemación y la liberación de partículas similares al virus del Ébola (VLP) y el virus de la leucosis del sarcoma aviar (ASLV). La liberación de las VLP del Ébola requiere la ubiquitinación de la proteína de matriz viral (VP40), que está mediada por la proteína ligasa de ubiquitina del hospedador NEDD4. Cuando se expresó ISG15 con VP40, inhibió la liberación de VLP del Ébola puesto que ISG15 inhibió la actividad de NEDD4 y bloqueó la ubiquitinación de VP40 (Fig.13) al bloquear la interacción entre NEDD4 y las enzimas conjugadoras de ubiquitina E2, evitando que la ubiquitina se transfiriera a NEDD4²⁶.

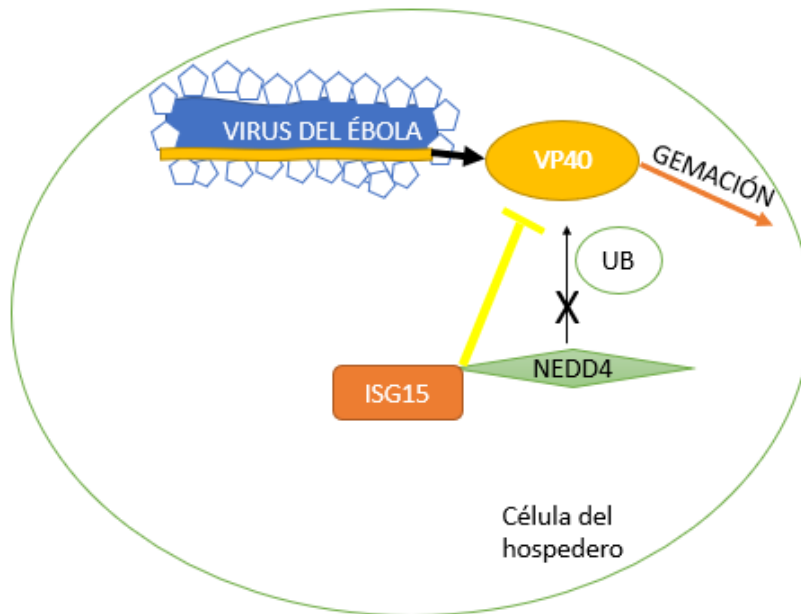


Figura 13: En la célula del hospedero la conjugación de la proteína del gen estimulada por interferón 15 (ISG15) con la proteína E3 ligasa de Ubiquitina (NEDD4) inhibe su interacción con (VP40) proteína de matriz en el virus del ébola que media la gemación para seguir infectando más células.

7.4.3 Interferencia de ISG15 con la entrada de virus.

Además de activar las células inmunes y las vías extracelulares, ISG15 puede interferir con la infección viral en sus primeras etapas. ISG15 interfiere con la entrada de norovirus. ISG15 es un inhibidor conocido de la replicación de norovirus y esta inhibición ocurre antes de la transcripción del virus. Se ha propuesto que ISG15 reduce la infección por el virus del Zika (ZIKV) al evitar también la entrada del virus. La presencia de ISG15 extracelular libre reduce los títulos virales intracelulares durante la infección por ZIKV²⁴.

7.5 Propiedades inmunomoduladoras de ISG15 como una citocina

ISG15 también existe como proteína no conjugada. In vivo, se ha detectado ISG15 en el suero de pacientes tratados con interferón y en ratones infectados por virus. Se ha propuesto que ISG15 extracelular funciona como una citocina con varias actividades inmunomoduladoras, incluida la inducción de la proliferación de células NK, la estimulación de la producción de IFN γ y la inducción de la maduración de células dendríticas, y funcionar como un factor quimiotáctico para los neutrófilos.

Recientemente, se identificó el antígeno 1 asociado a la función leucocitaria (LFA-1) como un receptor de superficie celular para ISG15, y su unión a este receptor mediaba la liberación de IFN γ e IL-10 de células pretratadas con IL-12. Queda por dilucidar si LFA-1 también contribuye a otras actividades que se han atribuido a ISG15. También se ha demostrado que la forma no conjugada de ISG15 contrarresta la respuesta inflamatoria durante la infección viral ²⁶.

Además de contribuir a las respuestas inmunitarias intracelulares, ISG15 también juega un papel importante en la respuesta inmunitaria extracelular. ISG15 puede iniciar la producción y secreción de una amplia variedad de factores antivirales y antibacterianos, como los IFN de tipo III, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el óxido nítrico (NO), además de actuar como una citocina extracelular en sí misma. En presencia de ISG15 los macrófagos M1 presentan una mayor producción de factores antivirales como ROS y NO. Además, los macrófagos estimulados con ISG15 muestran una mayor autofagia y mitofagia de las células y orgánulos infectados. Actualmente se desconoce el mecanismo por el cual ISG15 induce la polarización M1 en macrófagos. Debido a que ISG15 está altamente concentrado en sitios de infección y células apoptóticas, es eficaz para reclutar neutrófilos en áreas de necesidad ²⁴.

En conjunto, estos ejemplos muestran la capacidad de la ISGilación de proteínas virales para reducir la eficiencia y la calidad de la producción de progenie viral y para limitar la capacidad de las proteínas virales para regular la respuesta inmune del huésped.

7.6 Estrategias de evasión viral para eludir ISG15

Varios virus han desarrollado métodos para contrarrestar el efecto antiviral de ISG15, incluyendo la desISGilación, secuestro de proteínas ISGiladas, e interfiriendo con la síntesis de ISG15 (Fig.14)²⁴.

Virus de la influenza B: La proteína no estructural (NS1) del virus de la influenza B (NS1 / B) fue la primera proteína viral identificada con actividad de evasión inmune contra la vía ISG15. Inicialmente, se encontró que NS1 / B solo se une a ISG15 humano y de primates e inhibe su interacción con la enzima E1 UBE1L, inhibiendo así la ISGilación inducida por IFN β . Sin embargo, estudios recientes en los que se diseñó un IBV recombinante para codificar una proteína NS1 / B que es defectuosa en la unión de ISG15 revelaron que NS1 / B no inhibe la ISGilación en células infectadas con IBV. En cambio, NS1 / B se une y secuestra proteínas virales ISGiladas, particularmente NP viral (Fig. 12). Esto evita la incorporación de NP ISGiladas en las ribonucleoproteínas virales (vRNP), inhibiendo la síntesis de ARN viral²⁶.

Virus vaccinio E3. La proteína (E3L) desempeña una función en la inhibición de múltiples respuestas antivirales activadas por dsRNA; el virus vaccinio inhibe la conjugación de ISG15 para promover la replicación viral. La proteína E3 del virus Vaccinia también secuestra ISG15 libre para evitar la propagación de señales antivirales. En ensayos in vitro, la proteína E3L del virus vaccinia se une a ISG15 de ratón y humano y antagoniza la ISGilación ²⁶.

DesISGilación mediada por proteasas. Varios virus, especialmente miembros del orden Nidovirales, que incluye los coronavirus, codifican enzimas capaces de desconjugar ubiquitina e ISG15 de las proteínas diana para antagonizar las respuestas del huésped. El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PPRSV) y el virus de la arteritis equina (EAV) codifican una proteína L que contiene proteasas que contienen el gen del tumor de ovario (*OTU*). Se ha demostrado que estas proteínas reducen el conjunto total de conjugados de ubiquitina e ISG15 en una célula. Los coronavirus, incluido el síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), el síndrome respiratorio-coronavirus de Oriente Medio (MERS-CoV), la cepa 3 del virus de la hepatitis de ratón (MHV-3) y el coronavirus humano-NL63 (HCoV-NL63), codifican proteasas similares a papaína (PLpro) que también desUbiquitan y desISGilan proteínas diana ²⁶.

7.7 ISG15 y COVID19

El nuevo coronavirus SARS-CoV-2 es la causa del actual brote mundial de la enfermedad respiratoria por coronavirus 2019 (COVID-19). El COVID-19 suele presentar síntomas menos graves y una menor tasa de letalidad, pero se transmite más rápidamente en comparación con el SARS-CoV, que causó el brote de SARS en 2003. El genoma del SARS-CoV-2 comparte una alta identidad de secuencia con el SARS-CoV. Ambos virus dependen en gran medida de la actividad de proteasas virales: la proteasa principal (Mpro, también conocida como 3CLpro o proteína no estructural 5 (nsp5)) y la PLpro (con el dominio de la proteasa de nsp3) para generar un complejo funcional de funcional y permitir la propagación del virus³¹.

Para infectar a un hospedero se requiere que el virus replique su material genético, una enzima esencial de los coronavirus que es necesaria para procesar las poliproteínas virales para generar un complejo de replicasas funcional y permitir la propagación viral es la PLpro. PLpro también está implicada en la escisión de modificaciones postraduccionales proteicas en las proteínas del huésped como mecanismo de evasión contra las respuestas inmunitarias antivirales del huésped³¹. La PLpro tiene actividades de desUbiquitinación y de desISGilación, se ha propuesto que tengan efectos inmunomoduladores. La PLpro de SCoV2 inhibe la formación de oligómeros de la proteína asociada a la diferenciación del melanoma 5 (MDA5) dependientes de la ISGilación a través de su actividad enzimática³².

La proteasa similar a papaína del síndrome respiratorio agudo severo 2 (SCoV2-PLpro) y la proteasa similar a papaína del síndrome respiratorio agudo severo (SCoV-PLpro) comparten un 83% de identidad de secuencia, pero muestran diferentes preferencias de sustrato en el huésped; SCoV2-PLpro escinde preferentemente la proteína ISG15, mientras que SCoV-PLpro se dirige predominantemente a las cadenas de ubiquitina. La estructura de SCoV2-PLpro en complejo con ISG15 revela interacciones distintivas con el dominio amino-terminal similar a la ubiquitina de ISG15, destacando la alta afinidad y especificidad de estas interacciones. Además, tras la infección, SCoV2-PLpro contribuye a la escisión de ISG15 del factor 3 de respuesta al interferón (IRF3) y atenúa las respuestas al interferón de tipo I³¹.

En particular, la inhibición de SCoV2-PLpro con GRL-0617 (inhibidor no covalente de SCoV-PLpro) impide el efecto citopatogénico inducido por el virus, mantiene la vía antiviral del interferón y reduce la replicación viral en las células infectadas. Estos resultados ponen de relieve una posible estrategia terapéutica dual en la que la focalización de SCoV2-PLpro puede suprimir la infección por SARS-CoV-2 y promover la inmunidad antiviral³¹.

8. CAPITULO 4.1

8.1 ISG15/ISGilación en infecciones no virales.

Ratones deficientes en USP18 son más susceptibles a la infección por *Salmonella enterica* subespecie: *serovar Typhimurium*. Sin embargo, este fenotipo es debido a la falta de regulación de interferón de tipo I de señalización por USP18, en lugar de la falta de actividad del ISG15. Hasta la fecha, el papel de ISG15 en infecciones no virales es en gran parte vinculado a sus propiedades como un inmunomodulador. Si ISG15 inhibe directamente la replicación bacteriana o fúngica y la vía de conjugación sigue siendo desconocida²⁶.

Si bien los virus han desarrollado mecanismos de inhibición de ISG15, es posible que las bacterias también hayan desarrollado mecanismos para modular este sistema, sin embargo, aún no se ha investigado²⁷. Algunos datos relevantes que se conocen hasta ahora sobre la participación de ISG15 en infecciones bacterianas, se describe a continuación.

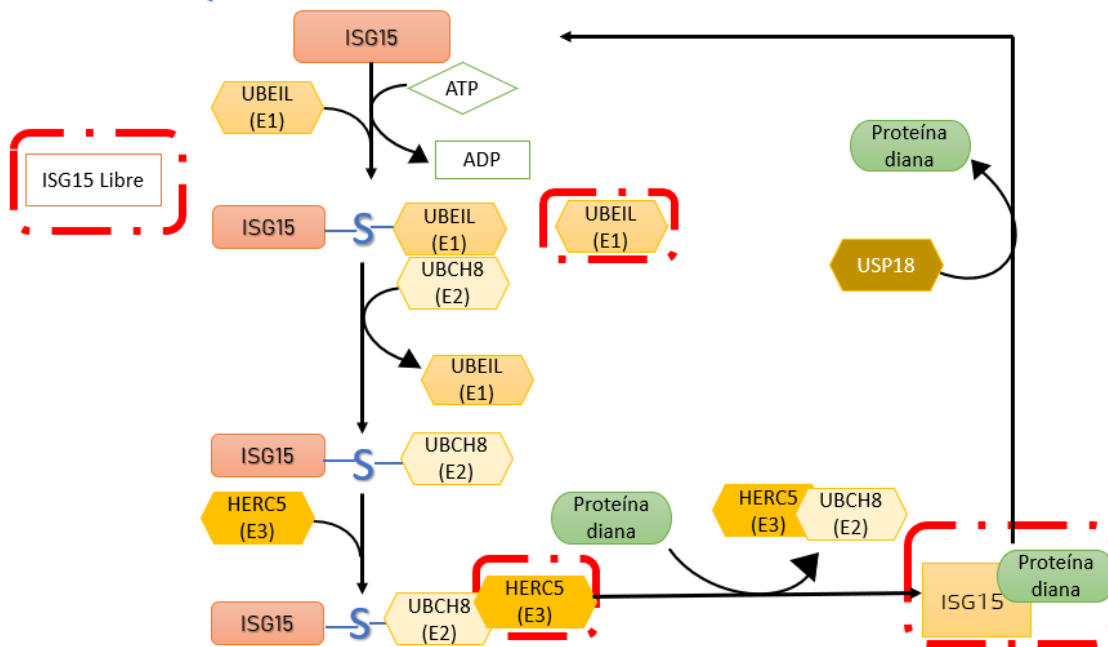


Figura 14: Dentro de los mecanismos de evasión que han desarrollado los virus se encuentra el secuestro de la enzima E1 de activación y desestabiliza la enzima de dominio HECT y RLD que contiene la proteína ligasa de ubiquitina E3 (HERC5), dado que sin estos elementos no se puede llevar a cabo la ISGilación, disminuye su interacción con proteínas virales y esto a su vez genera un incremento de la producción viral. También actúa secuestrando a ISG15 en su forma libre impidiendo que se una a sus proteínas blanco o que actúe como una molécula de señalización y secuestrando al producto de la vía. Proteína del gen estimulada por interferón 15 (ISG15), Proteína similar a la enzima E1 activadora de ubiquitina (UBEIL), Adenosín trifosfato (ATP), Adenosín difosfato (ADP), enzima conjugadora de ubiquitina (UBCH8), Peptidasa específica de ubiquitina 18 (USP18).

ISG15 y su importancia en la Tuberculosis

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* provoca 1,5 millones de muertes al año. La tuberculosis es una enfermedad compleja que consta de múltiples etapas que involucran patologías derivadas tanto del patógeno como de la respuesta inmune del huésped a la infección. La infección primaria por *M. tuberculosis* ocurre cuando las bacterias en aerosol son inhaladas y fagocitadas por macrófagos alveolares. La interacción de *M. tuberculosis* con macrófagos reclutados conduce a una respuesta proinflamatoria y al reclutamiento de células inflamatorias para formar un granuloma²⁷.

Los mecanismos por los cuales el IFN tipo I impacta en la infección por *M. tuberculosis* y si afecta predominantemente la replicación bacteriana y / o la inflamación no está bien definido, pero se cree que involucra uno o más de los genes estimulados por interferón (ISG). ISG15 e ISGilación se regulan positivamente en respuesta a la infección por *M. tuberculosis* de una manera en gran medida dependiente de IFN de tipo I. Se sugieren que la señalización a través del receptor de interferón alfa (IFNAR) tiene un efecto inmunosupresor durante la infección bacteriana. Sin embargo, la infección in vitro por *M. tuberculosis* de macrófagos derivados de la médula ósea ha demostrado que la señalización de IFN de tipo I es necesaria para la producción temprana de óxido nítrico sintasa inducible, una defensa importante contra *M. tuberculosis*. Además, en un ensayo clínico se descubrió que los IFN de tipo I tienen un efecto beneficioso contra la tuberculosis pulmonar. La señalización IFN de tipo I también cumple una función protectora en ausencia de señalización IFN γ . Estos informes destacan las funciones complejas del IFN tipo I y la dificultad de definir un papel claro para esta citocina durante la infección por *M. tuberculosis* a pesar de su importancia en la respuesta inmunitaria. En particular, el IFN- α y el IFN- β . también se administran para tratar enfermedades como las infecciones virales, algunos cánceres y la esclerosis múltiple. Dado que estos tratamientos pueden provocar la reactivación de *M. tuberculosis* latente, es imperativo comprender los efectos posteriores de estas citocinas sobre dicha infección y el resultado de la enfermedad²⁷.

Se ha demostrado que la expresión de *ISG15* puede ser inducida por varios estimulantes inmunes, tanto de forma dependiente como independiente de IFN de tipo I. Los ejemplos de inductores dependientes de IFN- β de la expresión de *ISG15* incluyen *Salmonella* muerta por calor, mientras que el polipéptido triacilado sintético que imita el extremo amino acilado de los LPS bacterianos (Pam3CSK4) y *M. tuberculosis* muerta por calor indujeron la expresión de *ISG15* independientemente del IFN tipo I²⁸.

Los efectos complicados y a veces contradictorios del IFN tipo I probablemente se deban en parte al hecho de que la señalización a través de IFNAR activa la transcripción de más de 100 ISG. Se ha demostrado que varios de estos ISG se regulan positivamente durante la infección por *M. tuberculosis*, sin embargo, las funciones de los ISG individuales durante las infecciones bacterianas siguen siendo en su mayoría desconocida. Esto demuestra que la respuesta del IFN tipo I a la infección por *M. tuberculosis* induce efectos protectores y dañinos para el huésped, y plantea la cuestión de si las actividades de ciertos ISG se equilibran de manera diferente en personas individuales para conducir a diferentes resultados de la enfermedad, posiblemente contribuyendo a la variabilidad en la reactivación²⁷.

8.2 Mutaciones en el gen 15

Actualmente se han identificado seis individuos con deficiencia de ISG15. Estos individuos con ISG15 deficiente presentaron susceptibilidad a las micobacterias ambientales, calcificaciones en los ganglios basales y, contrariamente a lo esperado, no hubo susceptibilidad a las infecciones virales, pero presentan susceptibilidad mendeliana a la enfermedad por micobacterias (MSMD). El síndrome de MSMD predispone a personas sanas a una enfermedad grave debido a una infección por micobacterias débilmente virulentas. El MSMD afecta aproximadamente a 1 de cada 50 000 personas expuestas a micobacterias ambientales o cepas de vacunas. Muchos niños en todo el mundo todavía están vacunados con Bacille Calmette-Guérin (BCG) vivo, que contiene una micobacteria débilmente virulenta diseñada para inducir inmunidad a la tuberculosis, particularmente en áreas en las que esta enfermedad es endémica ²⁹.

En los seres humanos, mutaciones bialélicas en ISG15 resulta en un deterioro de IFN- γ mediada por inmunidad, que conduce a un aumento de la predisposición a micobacterianas infecciones en la mayoría de los casos, por ejemplo: un paciente con ISG15 deficiencia por herencia autosómica recesiva presentó, lesiones ulcerosas en la piel y enfermedad de pulmón y en el cerebro se observaron calcificaciones en los ganglios basales. Después de una secuenciación de Sanger se obtuvo que la paciente es heterocigota para dos mutaciones en el gen ISG15. Los padres fueron cada uno heterocigoto para una de las variantes descritas. Sorprendentemente, y a pesar de las funciones antivirales de ISG15 descritas en ratones, los pacientes descritos hasta la fecha no presentan fenotipo de susceptibilidad viral. debe tenerse en cuenta que la importancia de la asociación entre el genotipo y el fenotipo observado podría ser limitada, ya que se han analizado pocos casos³⁰.

9. DISCUSIÓN:

Implicaciones generales de ISG15 y la ISGilación. En los últimos años se ha encontrado a ISG15/ISGilación como una proteína que tiene implicaciones en varias patologías, dentro de las cuales se encuentran algunas, enfermedades neurodegenerativas, cáncer e infecciones. Por ello es importante conocer las funciones de ISG15 en cada uno de los contextos pues podría ser de utilidad para entender los mecanismos y sus posibles tratamientos. Por ejemplo, la expresión de *ISG15* es inducida por interferón tipo I y tipo II, y participa en la respuesta antiviral, la reparación del ADN, la autofagia, en la diferenciación celular, y la proliferación³³. Sin embargo, los mecanismos no son del todo claros, y parecen depender del tipo y contexto celular.

La multifuncionalidad de ISG15 se atribuye en parte a que esta proteína puede encontrarse en las células de forma extracelular e intracelular. ISG15 se divide en su forma conjugada o libre, es decir unido a una proteína diana o no unido a proteínas diana. La función que ejerce ISG15 depende de la forma en la que se encuentre y del espacio celular en el que este, dichas funciones se han empezado a describir en los últimos años. Mientras que extracelularmente parece actuar como una citocina, intracelularmente actúa como un modificador de proteínas, además de encontrarse también en su forma libre.³³ La ISGilación, modula la estabilidad y actividad de las proteínas⁴, no obstante, también existe el proceso inverso en el cual la enzima responsable de llevar a cabo la desISGilación es USP18⁴. Al respecto, una de las limitantes que existen para entender la función e importancia de esta modificación postraducciona, es que se ha identificado un limitado número de proteínas blanco de ISGilación. Además, ISG15 requiere de residuos de lisina en su proteína blanco para llevar a cabo la ISGilación, pero a la fecha no se sabe si existe una secuencia consenso en sus proteínas blanco para ser sometidas a esta modificación²⁴.

Por otra parte, Ub es conservada desde la levadura hasta los humanos, pero ISG15 es expresado solo en organismos vertebrados⁴. Aunado a este hecho, hay menos E3 ligasas para ISG15, mientras que para Ub hay más de 600 enzimas. Estas diferencias, sugieren que la ISGilación es un sistema que pudo ser generado evolutivamente para modular y mantener adecuadamente diversos procesos moleculares necesarios en los vertebrados. Por ejemplo, ISG15 libre tiene funciones inmunomodulatorias ⁴, pues el receptor LFA-1 reconoce a ISG15 y transduce sus señales para estimular la secreción de IFN- γ e IL-10 de las células NK. Por lo tanto, la ISG15 libre que actúa como una citocina, debe tener una vía de señalización, cuyos componentes intracelulares no son conocidos por ahora ³³. Respecto a la ISGilación, esta modificación podría ser central en diversas patologías, considerando los marcados patrones de su desregulación que se han descrito. Adicionalmente, aunque son pocas las proteínas ISGiladas descritas, ellas se caracterizan por tener funciones cruciales para el mantenimiento de las células. Entre las proteínas ISGiladas se pueden citar a p53, β -catenina, filamina B, el antígeno nuclear de proliferación celular importante ya que se une a la ADN polimerasa durante la replicación (PCNA), beclin 1 que se considera tiene implicaciones en procesos como la tumorigenesis (BECN1) y Parkin, que participan en varios procesos celulares. Las proteínas ISGiladas presentan monoISGilación en uno, dos o varios residuos de lisina ³³. En consecuencia, es requerido la identificación de nuevos blancos de ISGilación y la determinación de su relevancia funcional.

ISG15/ISGilación en cáncer de mama. Se ha estudiado la expresión de ISG15 en pacientes con diferentes tipos de cáncer ¹⁴. Uno de los tipos de cáncer más mortales en el mundo es el cáncer de mama ², donde se ha demostrado que ISG15 se localiza en el citoplasma y el núcleo de las células⁹. Se ha encontrado en tumores de tercer grado una sobreexpresión de ISG15. Solo unas pocas proteínas han sido identificadas como objetivos de ISGilación, incluyendo la proteína de citoesqueleto como IQGAP1 y NMIIA, en células de cáncer de mama. Cabe destacar que se ha sugerido el uso de los interferones de tipo I y II para tratar esta enfermedad por sus funciones inmunomoduladoras ¹³.

Sin embargo, como se ha descrito, estos interferones estimulan la expresión de ISG15. El IFN- γ podría activar la ISGilación de proteínas relacionadas con los cambios citoesqueléticos y mejoraría la motilidad celular, lo cual podría explicar porque en estudios in vitro se ha observado que la expresión de ISG15 parece tener una función protumoral, y al disminuir la expresión de ISG15 también cae la migración celular. No obstante, los genes inducidos por el IFN- γ incluyen a otras proteínas no solo ISG15. ISG15 libre extracelular parece tener una actividad antitumoral in vivo, lo que sugiere que el ambiente tumoral es crítico para determinar la actividad de ISG15⁴.

Se necesitan más estudios para dilucidar el papel de ISG15 en un contexto de cáncer. Sin embargo, la relación entre la señalización de IFN- γ y el sistema de ISGilación ha surgido como un factor clave en la tumorigénesis³³.

ISG15/ISGilación en enfermedades neurológicas. Otra de las patologías en las que se ha encontrado que ISG15 tiene alguna implicación es en las enfermedades neurodegenerativas que se destacan por ser incapacitantes. Un ejemplo de esto es el caso de AT. Se han encontrado depósitos de ISG15/Ubiquitina en tejido cerebral de pacientes con AT lo que sugiere la posibilidad de que ISG15 contribuya a la atrofia neuronal¹¹. La mitofagia también es defectuosa en esta enfermedad, se cree que hay formación de cadenas de ISG15 con Mfns las señales mediadoras de la autofagia y la segregación de mitocondrias ya no es funcional por lo que la mitofagia es inhibida en las células con AT²⁰. Otra enfermedad es ELA, cuya característica es que se ven afectadas neuronas motoras¹⁷. Se encontró que ISG15 está elevado y que la mitofagia es defectuosa²⁰. Por lo tanto, para ambos padecimientos una alternativa de tratamiento podría ser buscar algún inhibidor de ISG15 para que con ello se restaurara la mitofagia y la autofagia.

Otras enfermedades neurodegenerativas son las demencias que ocasionan un deterioro en la capacidad intelectual y en la autonomía de quien la padece, como es el caso del Alzheimer y Parkinson, se ha informado la presencia de depósitos proteicos plegados en regiones cerebrales, lo que sugiere un fracaso en su vía de degradación Ub/26S y una afectación en la vía autofágica¹¹. En este contexto, ISG5 podría estar interviniendo en la ramificación dendrítica y en la densidad de estas. En el cerebro de ratones con deficiencias dendríticas se ha identificado una sobreexpresión en los niveles de ISG15 específicamente en la corteza prefrontal²¹, sugiriendo que ISG15 podría inhibir el desarrollo y el mantenimiento de las dendritas. Sin embargo, un aumento drástico de ISG15 en cerebro de ratones sometidos a isquemia global²² ha demostrado su actividad como neuroprotector²³. con ello podría servir como un biomarcador. Por lo tanto, ISG15 podría también tener una función dual en la neuroprotección del SNC.

ISG15/ISGilación en infecciones bacterianas y virales. La actividad de ISG15 en infecciones bacterianas no está bien definido, sin embargo, podría tener una función como un inmunomodulador. En un estado de infección por *M. tuberculosis* que ISG15 y la ISGilación están reguladas positivamente en gran medida mediada por IFN tipo I²⁷. De manera interesante, las personas que tiene el gen *ISG15* mutado y que su expresión es nula, tienen una mayor susceptibilidad a las infecciones por micobacterias y calcificaciones en los ganglios basales²⁹. Respecto a las infecciones por virus, se sabe que la ISGilación de proteínas virales disminuye la infectividad del virus. No obstante, algunos virus han desarrollado mecanismos de evasión que incluyen el secuestro de las enzimas necesarias para llevar a cabo la ISGilación²⁴. Al respecto, vale la pena mencionar, a SARS-CoV-2, el virus responsable de la pandemia mundial, que contiene en su genoma información para codificar una proteasa similar a la papaína PLpro, la cual contribuye a la desISGilación, contribuyendo la infectividad del virus³¹.

10. CONCLUSIONES:

- Las formas de ISG15 libre y conjugado participan de manera importante en patologías como cáncer, enfermedades neurodegenerativas y en infecciones.
- Las implicaciones de ISG15 y la ISGilación de proteínas en diferentes eventos fisiopatológicos son comunes.
- Los mecanismos moleculares de acción y de regulación en los contextos específicos en los que participa ISG15 son objeto de futuros estudios.
- El entender la base molecular de ISG15 y la ISGilación podría ser útil para generar nuevos blancos terapéuticos para enfermedades como el cáncer o del SNC, así como infecciones.
- La comprensión de los diversos procesos de ISGilación podría ayudar a establecer nuevos biomarcadores para diversas enfermedades.

PERSPECTIVAS:

- ISG15 es una proteína de la cual aún quedan varios mecanismos por describir que contribuyan a determinar proteínas blanco de ISGilación en el caso particular de cáncer y enfermedades neurodegenerativas podría ser útil como un biomarcador queda por comparar con los biomarcadores que actualmente se utilizan en dichas patologías, aunado a esto se tendría que evaluar la facilidad de detección en diferentes tipos de muestras.
- Falta por dilucidar si ISG15 también tiene una función antiviral en los individuos que son nulos para ISG15 y no presentaban mayor susceptibilidad a infecciones, es decir cuál es su respuesta ante el virus SARS-CoV2.

11. Referencias bibliográficas:

- (1) Zhang, D.; Zhang, D. E. Interferon-Stimulated Gene 15, and the Protein ISGylation System. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 2011, 31 (1), 119–130. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0110>.
- (2) Cruz-Ramos, E. MYHIIA Es Una Proteína Blanco de ISGilación En Células de Cáncer de Mama., 2018.
- (3) Sgorbissa, A.; Brancolini, C. IFNs, ISGylation and Cancer: Cui Prouddest? *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.07.003>.
- (4) Tecalco–Cruz, A. C. Molecular Pathways of Interferon–Stimulated Gene 15: Implications in Cancer. *Current Protein & Peptide Science* 2020, 21, 1–10. <https://doi.org/10.2174/1389203721999201208200747>.
- (5) D’Cunha, J.; Ramanujam, S.; Wagner, R. J.; Witt, P. L.; Knight, E.; Borden, E. C. In Vitro and in Vivo Secretion of Human ISG15, an IFN-Induced Immunomodulatory Cytokine. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 1996, 157 (9).
- (6) Pak, J. E.; Sharon, C.; Satkunarajah, M.; Auperin, T. C.; Cameron, C. M.; Kelvin, D. J.; Seetharaman, J.; Cochrane, A.; Plummer, F. A.; Berry, J. D.; Rini, J. M. ISG15: It’s Complicated Review John. 2020, No. January.
- (7) Iwasa, J.; Marshall, W. *Karp’s Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*; 2016.
- (8) Castro, F.; Cardoso, A. P.; Gonçalves, R. M.; Serre, K.; Oliveira, M. J. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in Immunology*. 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>.
- (9) Tecalco-Cruz, A. C.; Ramírez-Jarquín, J. O.; Cruz-Ramos, E. Regulation and Action of Interferon-Stimulated Gene 15 in Breast Cancer Cells. *Human Cell* 2020, 33 (4), 954–962. <https://doi.org/10.1007/s13577-020-00414-x>.
- (10) García, A. Mecanismos Moleculares de Regulación de La Vía MTORC1/P70S6K, Autofagia y Mitofagia: Papel de TSC2. 2017, 35–50.
- (11) Desai, S. D.; Reed, R. E.; Babu, S.; Lorio, E. A. ISG15 Deregulates Autophagy in Genotoxin-Treated Ataxia Telangiectasia Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2013, 288 (4), 2388–2402. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.403832>.
- (12) Lavandero, S.; Ramírez-Sagredo, A.; Aleman, L.; Villa, M.; Chávez, M. N.; García, L. Autofagia En El Sistema Cardiovascular: Pasado, Presente y Futuro. *Revista Chilena de Cardiología* 2016, 35, 1–14.
- (13) Rojas Espinoza Oscar. Inmunología Del Cáncer. In *Inmunología (de memoria)*; Editorial Medica Panamericana: Ciudad de México, 2017.
- (14) Cortinas Cristina. *Cáncer: Herencia y Ambiente*, Segunda ed.; La Ciencia para todos, 1998.

- (15) Alcalá, S.; Sancho, P.; Martinelli, P.; Navarro, D.; Pedrero, C.; Martín-Hijano, L.; Valle, S.; Earl, J.; Rodríguez-Serrano, M.; Ruiz-Cañas, L.; Rojas, K.; Carrato, A.; García-Bermejo, L.; Fernández-Moreno, M. Á.; Hermann, P. C.; Sainz, B. ISG15 and ISGylation Is Required for Pancreatic Cancer Stem Cell Mitophagy and Metabolic Plasticity. *Nature Communications* **2020**, *11* (1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16395-2>.
- (16) Seco, J. Parte IV: Fisiología Del Sistema Nervioso. In *Sistema Nervioso*; Editorial Medica Panamericana: México, 2020; pp 769–780.
- (17) Seco, J. Sección 2: Enfermedades Del Sistema Nervioso Central. In *Sistema Nervioso*; Editorial Medica Panamericana: México, 2020; pp 87–165.
- (18) Francisca, V. F. DESARROLLO DEL MChipVP6Au: HACIA EL RESTABLECIMIENTO DE LA FUNCIÓN CELULAR EN EL TRATAMIENTO DE LAS ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS., 2019.
- (19) Nakka, V. P.; Mohammed, A. Q. A Critical Role for ISGylation, Ubiquitination and, SUMOylation in Brain Damage: Implications for Neuroprotection. *Neurochemical Research* **2020**, *45* (9), 1975–1985. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03066-3>.
- (20) Juncker, M.; Kim, C.; Reed, R.; Haas, A.; Schwartzburg, J.; Desai, S. ISG15 Attenuates Post-Translational Modifications of Mitofusins and Congestion of Damaged Mitochondria in Ataxia Telangiectasia Cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **2021**, *1867* (6), 166102. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166102>.
- (21) Hu, Y.; Hong, X. Y.; Yang, X. F.; Ma, R. H.; Wang, X.; Zhang, J. F.; Feng, Q.; Li, X. G.; Sun, D. S.; Li, X.; Wan, H. L.; Li, T.; Wang, Q.; Ke, D.; Wang, J. Z.; Liu, G. P. Inflammation-Dependent ISG15 Upregulation Mediates MIA-Induced Dendrite Damages and Depression by Disrupting NEDD4/Rap2A Signaling. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **2019**, *1865* (6), 1477–1489. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.02.020>.
- (22) Floden, A; Combs, C. Interferon-Stimulated Gene 15 as a General Marker for Acute and Chronic Neuronal Injuries. *Bone* **2012**, *23* (1), 1–7.
- (23) Janet, L. Interferon Stimulated Gene 15 Upregulation Precedes the Development of Blood Brain Barrier Disruption and Cerebral Edema after Traumatic Brain Injury in Young Mice. **2018**, No. April 1–32.
- (24) Freitas, B. T.; Scholte, F. E. M.; Bergeron, É.; Pegan, S. D. How ISG15 Combats Viral Infection. *Virus Research* **2020**, *286* (February), 198036. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198036>.
- (25) Sandy, Z.; da Costa, I. C.; Schmidt, C. K. More than meets the Isg15: Emerging Roles in the DNA Damage Response and Beyond. *Biomolecules* **2020**, *10* (11), 1–30. <https://doi.org/10.3390/biom10111557>.
- (26) Perng, Y. C.; Lenschow, D. J. ISG15 in Antiviral Immunity and Beyond. *Nature Reviews Microbiology* **2018**, *16* (7), 423–439. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0020-5>.

- (27) Kimmey, J. M.; Campbell, J. A.; Weiss, L. A.; Monte, K. J.; Lenschow, D. J.; Stallings, C. L. The Impact of ISGylation during Mycobacterium Tuberculosis Infection in Mice. *Microbes and Infection* **2017**, *19* (4–5), 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.12.006>.
- (28) Caleb D. Swaim, Larissa A. Canadeo, Kristen J. Monte, Swati Khanna, Deborah J. Lenschow, J. M. H. Modulation of Extracellular ISG15 Signaling by Pathogens and Viral Effector Proteins. *Cellpress* **2020**, *7* (Jun), 19–21.
- (29) Hermann, M.; Bogunovic, D. ISG15: In Sickness and in Health. *Trends in Immunology* **2017**, *38* (2), 79–93. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.11.001>.
- (30) Buda, G.; Valdez, R. M.; Biagioli, G.; Olivieri, F. A.; Affranchino, N.; Bouso, C.; Lotersztein, V.; Bogunovic, D.; Bustamante, J.; Martí, M. A. Inflammatory Cutaneous Lesions and Pulmonary Manifestations in a New Patient with Autosomal Recessive ISG15 Deficiency Case Report. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* **2020**, *16* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13223-020-00473-7>.
- (31) Shin, D.; Mukherjee, R.; Grewe, D.; Bojkova, D.; Baek, K.; Bhattacharya, A.; Schulz, L.; Widera, M.; Mehdipour, A. R.; Tascher, G.; Geurink, P. P.; Wilhelm, A.; van der Heden van Noort, G. J.; Ovaa, H.; Müller, S.; Knobloch, K. P.; Rajalingam, K.; Schulman, B. A.; Cinatl, J.; Hummer, G.; Ciesek, S.; Dikic, I. Papain-like Protease Regulates SARS-CoV-2 Viral Spread and Innate Immunity. *Nature* **2020**, *587* (7835), 657–662. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2601-5>.
- (32) Liu, G.; Lee, J.-H.; Parker, Z. M.; Acharya, D.; Chiang, J. J.; van Gent, M.; Riedl, W.; Davis-Gardner, M. E.; Wies, E.; Chiang, C.; Gack, M. U. ISG15-Dependent Activation of the RNA Sensor MDA5 and Its Antagonism by the SARS-CoV-2 Papain-like Protease. *bioRxiv : the preprint server for biology* **2020**. <https://doi.org/10.1101/2020.10.26.356048>.
- (33) Ramírez-Jarquín, Josué O. Cervantes-Zepeda, Jesús. Alavez-Pérez, Noé Santiago. Tecalco-Cruz, A. C. ISG15: AN INTERFERON-STIMULATED GENE WITH CRITICAL FUNCTIONAL IMPLICATIONS IN CANCER; 2007; pp 1–30.