

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**Efecto del resveratrol en las vías de regulación de
la oncoproteína Lin28A en células NCCIT**

T E S I S

P R E S E N T A:

M en C. SANDRA PAOLA COTINO NÁJERA

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

En la especialidad de

Genética y Biología Molecular

Director de Tesis: **Dr. Juan Bautista Patricio Gariglio Vidal**

Co-Director: **Dr. José De La Luz Díaz Chávez**

Ciudad de México

Noviembre, 2024

ASESORES

DRA. ROSA MARÍA BERMÚDEZ CRUZ

Investigador Cinvestav 3C

Departamento de Genética y Biología Molecular

CINVESTAV, Zacatenco

roberm@cinvestav.mx

DR. JAIME GARCIA MENA

Investigador Cinvestav 3C

Departamento de Genética y Biología Molecular

CINVESTAV, Zacatenco

jgmena@cinvestav.mx

DR. JOSÉ EFRAÍN GARRIDO GUERRERO

Investigador Cinvestav 3C

Departamento de Genética y Biología Molecular

CINVESTAV, Zacatenco

egarrido@cinvestav.mx

DR. JOSE MANUEL HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

Investigador Cinvestav 2B

Departamento de Genética y Biología Molecular

CINVESTAV, Zacatenco

jose.hernandezh@cinvestav.mx

La presente tesis fue elaborada y completada gracias al apoyo del

Programa Nacional de Becas de Posgrado

Del

Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías

(CONAHCYT)

No. de registro: 919442

Y al apoyo de titulación brindado por el CINVESTAV

Dedicada
a las personas más importantes de mi vida,
Mis padres.

Agradecimientos

Al **Dr. Patricio Gariglio Vidal**, por brindarme la oportunidad de realizar la tesis y trabajo de doctorado bajo su dirección, por su preocupación e interés en mi proyecto, por el tiempo dedicado a la revisión de mi trabajo, consejos y apoyo.

Al **Dr. José de la Luz Díaz Chávez**, por su apoyo íntegro, asesoría, consejos y por el tiempo dedicado a la revisión de mi trabajo. Le agradezco mucho porque sin su apoyo no hubiera logrado concluir este trabajo de investigación, gracias por confiar en mi capacidad y por financiar mis artículos publicados.

A mis asesores: **Dr. Efraín Garrido, Dra. Rosa Bermúdez, Dr. Jaime García Mena y Dr. José M. Hernández H.** Por sus asesorías, recomendaciones, observaciones y su valioso tiempo invertido en evaluaciones y en la revisión de la presente tesis.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al biólogo **Enrique García Villa**, por su apoyo incondicional y su valiosa asesoría a lo largo de este proyecto. Aprecio profundamente su disposición para proporcionarme todos los materiales y reactivos necesarios, así como sus consejos que han sido fundamentales en mi desarrollo. Además, valoro su amistad y las enseñanzas tanto teóricas como prácticas que me ha brindado. Gracias por los momentos compartidos y por todo lo que has hecho por mí.

A **Rodolfo Ocadiz Delgado, Lauro Macías González, Elizabeth Álvarez Ríos** por su apoyo incondicional tanto en cosas de material como administrativas.

Así como a **Gabriela Mora**, por gran trabajo y por facilitar todos los procesos administrativos.

A mis amigos y compañeros de laboratorio **Samantha Cruz y Raúl Loredo**, por su ayuda y colaboración en el desarrollo de artículos de investigación y en proyectos laborales, por todos los momentos compartidos, gracias.

A mis padres **Víctor Manuel Cotino S. y Blanca Esthela Nájera P.**, por siempre apoyarme en todo, por su amor y cariño incondicional, por confiar en mí y dejarme seguir mis sueños.

Nunca habrá palabras suficientes para agradecerles todo lo que han hecho y siguen haciendo por mí, sin duda debo cada uno de mis logros a ustedes, estoy feliz de tenerlos como padres, los amo.

A mi tía **Diana Nájera P.**, por su total apoyo y cariño, por confiar en mí, por ayudarme y motivarme siempre a pesar de la distancia.

A mi compañera de vida **Itzel Alejandra Galán J.**, porque tú me motivas a seguir con mis sueños, por siempre estar para mí en las buenas y en las malas, por cuidarme y preocuparte por mí, por nunca dejarme sola, llenarme de risas y amor. Porque espero que el camino que falta por recorrer sea de tu mano. Gracias por todo, ILY.

Índice:

Contenido	
Índice:	7
Índice de figuras:	8
Notación científica y glosario	9
Resumen:	13
Abstract:	14
Introducción:	15
1. Cáncer	15
2. Lin28	17
2.1 Lin28 y Let-7	18
2.2 Lin28 y cáncer	20
2.3 Mecanismos de estabilización de Lin28A	24
3. Resveratrol	33
3.1 El papel del resveratrol en cáncer	34
4. Antecedentes directos	38
5. Pregunta de investigación	41
6. Justificación	41
7. Hipótesis	42
8. Objetivos	43
9. Diseño experimental	44
Materiales y métodos:	45
10. Diagrama de trabajo	54
11. Resultados	55
12. Discusión	72
13. Conclusión	76
14. Perspectivas	77
Referencias	78

Índice de figuras:

	Pag.
Figura 1. Proceso de la carcinogénesis.	15
Figura 2. Dominios de las proteínas Lin28A y Lin28B humanas.	18
Figura 3. Inhibición del procesamiento de Let-7 por Lin28A/B.	20
Figura 4. Rol de Lin28 en el desarrollo y progresión del cáncer.	22
Figura 5. Circuito de regulación entre las vías NF- κ B y Lin28/Let-7.	23
Figura 6. Expresión de Lin28A en presencia y ausencia de Sp-1.	25
Figura 7. Expresión de Lin28A en presencia y ausencia de STAT3.	26
Figura 8. La fosforilación de Lin28A en S200 por la vía MAPK/ERK estabiliza e incrementa la vida media de la proteína de Lin28A.	27
Figura 9. Proceso de ubiquitinación y desubiquitinación.	29
Figura 10. Lin28A incrementa sus niveles en presencia de USP28 en células NCCIT.	29
Figura 11. Western blot del knockout de USP28 y la activación de ERK.	30
Figura 12. Papel de USP28 en la progresión del cáncer.	31
Figura 13. Mecanismos que promueven la expresión y estabilidad de Lin28A/B.	32
Figura 14. Estructura química de <i>trans</i> -resveratrol y <i>cis</i> -resveratrol.	33
Figura 15. Esquema que ilustra las diversas rutas de señalización blanco del resveratrol en el tratamiento del cáncer.	37
Figura 16. El Resveratrol disminuye significativamente la expresión del mRNA de Lin28A en las células NCCIT.	38
Figura 17. La exposición a una concentración de 150 μ M de resveratrol a tiempos prolongados disminuye el nivel de proteína de Lin28A en células NCCIT.	39
Figura 18. La exposición a una concentración de 150 μ M de resveratrol a tiempos prolongados disminuye a la proteína USP28 en células NCCIT.	40
Figura 19. Ensayo MTT con RSV para determinar IC50.	55
Figura 20. El RSV disminuye la expresión del mRNA de Lin28A en células NCCIT dependiente de la concentración y el tiempo.	56
Figura 21. El RSV disminuye la expresión del mRNA de SP1 en células NCCIT.	57
Figura 21.1 El RSV disminuye la expresión del mRNA de STAT3 en células NCCIT.	58

Figura 22. La proteína Lin28A es más estable que el mRNA y solo se ve afectada por las concentraciones más altas de RSV.	59
Figura 23. RSV disminuye la expresión del mRNA de USP28 a diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento en células NCCIT.	60
Figura 24. RSV a 150 μ M puede disminuir significativamente el nivel de la proteína Lin28A.	61
Figura 24.1. RSV a 150 μ M puede disminuir el nivel de la proteína USP28.	62
Figura 25. RSV induce la degradación proteosomal de Lin28A.	63
Figura 26. Silenciamiento de USP28 mediante transfección con siRNA contra USP28 (siUSP28).	64
Figura 26.1. La inhibición de USP28 con siRNAs específicos no es suficiente para disminuir totalmente la expresión de la proteína Lin28A.	65
Figura 27. RSV disminuye la fosforilación de Lin28A en serina 200=s200 (pLin28A) causada por MAPK/ERK.	66
Figura 28. Ensayo de MTT con inhibidor de MAPK/ERK (PD: PD0325901) para determinar IC50.	68
Figura 28.1. El inhibidor de MAPK/ERK disminuyó la fosforilación de Lin28A (s200) (pLin28A) similar al tratamiento con RSV.	68
Figura 29. Western Blots que muestran los niveles de proteína de Lin28A con distintos tratamientos.	69
Figura 29.1. Ensayo de estabilidad de la proteína Lin28A con cicloheximida.	70
Figura 30. RSV disminuye la proteína de Lin28A y USP28 en la línea celular T47D.	71
Figura 31. Modelo esquemático final del trabajo.	72
Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados para PCR cuantitativa en tiempo real.	49

Notación científica y glosario

BAD	BCL2-antagonist of cell death / Antagonista de muerte celular
BCL-2	B-cell lymphoma 2 / Célula B de Linfoma 2
BCSC	Breast cancer stem cells / CSC de mama
CCHC	Zinc finger domains / Dominios de dedos de zinc
CDC6	Cell division cycle 6 / Ciclo de división celular 6
CDKs	Cyclin-dependent kinases / cinasas dependientes de ciclinas
Chk1	Checkpoint kinase 1/ Serina/treonina-proteína quinasa específica

CHX	Cicloheximida
c-JUN	Transcription factor Jun
c-MYC	Proto-oncogen de la familia MYC (the master regulator of metabolic processes involved in cell proliferation)
CSC	Cancer stem cell / Células madre del cáncer
CSD	Cold-shock domain/ Dominio de choque frío
CYP1A1	Acrónimo para referirse a una enzima del citocromo P450
DICER1	Ribonucleasa miembro de la familia de las ARNasa III
DIS3L2	DIS3 mitotic control homolog-like 2 / Control mitótico DIS3 homólogo- 2
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid / ácido desoxirribonucleico
DROSHA	Drosha es una enzima ribonucleasa III de clase 2
DS	Desviación estándar
DUB	Desubiquitinasa
EGF	Epidermal growth factor / Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMT	Epithelial - mesenchymal transition / Transición epitelio mesenquimal
ERK 1/2	The extracellular signal-regulated kinase ½ / La quinasa regulada por señal extracelular 1/2
FBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1 / Fructosa-1,6-bisfosfatasa 1
FOXC1	Forkhead box C1 protein / Proteína C1 de la caja Forkhead
FOXM1	Forkhead box protein M1 / Proteína M1 de la caja Forkhead
FOXO3a	Forkhead box O3 / Caja de horquilla O3
GF	Growth factor / Factor de crecimiento
GSK-3β	Glycogen synthase kinase-3 beta / Glucógeno sintasa quinasa-3 beta
HaCaT	Queratinocitos inmortalizados de humano
HER2	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 / Receptor de proteína tirosina quinasa erbB-2
hECC	Células de carcinoma embrionario humano
HeLa	Células derivadas de cáncer cervico uterino
HIF-1α	Hypoxia Inducible Factor / Factor inducible de hipoxia
HK2	Hexokinase 2 / Hexoquinasa 2
HMGA2	High Mobility Group AT-Hook 2 / Grupo de alta movilidad AT-Hook 2
HT-29	Línea celular de cáncer de colon humano
IAP	Inhibitor of Apoptosis / Inhibidor de la apoptosis
IC50	Half-maximal inhibitory concentration / Concentración inhibitoria máxima media
IGF-2	Factor de crecimiento insulínico tipo 2
IKB	IkappaB kinase or IKK / Quinasa IkappaB o IKK
IL-6	Interleucina-6
iPSC	Induced pluripotent stem cells / Células madre pluripotentes inducidas
Kap1	KRAB domain-associated protein 1 / Proteína 1 asociada al dominio KRAB
kDa	Kilodalton
KRAS	Kirsten ras oncogene / Oncogén ras de Kirsten

KLF4	Factor 4 Kruppel-like / Factor 4 tipo Kruppel
LDHA	Lactate dehydrogenase A / lactato deshidrogenasa A
Let-7	microRNA supresor de tumor
Lin28	Proto-oncogen, RNA-binding protein / Proteína de unión a RNA
LSD1	Lysine-specific histone demethylase 1A / Desmetilasa de histonas específica de lisina 1A
MALAT1	Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 / Transcripción 1 de adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis
MAPK	Mitogen-activated protein kinase / Proteína quinasa activada por mitógeno
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama
MEK	Cinasa que fosforila y activa a la MAP quinasa
MG132	Inhibidor del proteosoma
miRNA	MicroRNA
MiR-98	MiR-98 inhibe la proliferación celular
MMP-7	Matrix metalloproteinase 7 / Metaloproteínasa de matriz 7
MOS	Proto-oncogene-encoded serine/threonine protein kinase plays a key cell cycle-regulatory role during meiosis.
mRNA	RNA mensajero
MSI1	Musashi RNA Binding Protein 1 / Proteína de unión al ARN de Musashi 1
NANOG	Transcriptional factor that helps embryonic stem cells (ESCs) maintain pluripotency (Proto- oncogene)
NCCIT	Línea celular de cáncer testicular
NF1	Gen neurofibromina 1
NF-kB	Nuclear factor kappa B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)
NICD1	Diffuse NOTCH1 intracellular domain / Dominio intracelular NOTCH1 difuso
NLS	Señal de localización nuclear
NoLS	Señal de localización nucleolar
Np63	The transcription factor Np63 / El factor de transcripción Np63
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4 / Factor de transcripción de unión al octamero 4
OTU	Dominio de tumor de ovario
Otx2	Orthodenticle homeobox 2 / Homeobox 2 de ortodentículo
p21	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1 o proteína 1 que interactúa con CDK
P27 o CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B / Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1B
p38	Proteína cinasa activada por mitógeno
p53	Proteína p53 / tumor suppressor gene
PBS	Phosphate-buffered saline / Solución salina tamponada con fosfato
pERK	Extracellular signal-regulated kinases activated (phosphorylated)
pLin28A	Phosphorylation of Lin28A on serine 200

Pre-miRNA	Precursor microRNA
Pri-miRNA	Primary microRNA
PI3K/AKT	Vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-cinasa
Pim-1	Pim-1 is a proto-oncogene
PKM2	Enzyme pyruvate kinase M2 / Pyruvate kinase M2 enzyme
PSC	Células madre pluripotentes
PTEN	Phosphatase and tension homolog / Homólogo de fosfatasa y tensión
Rad51	Gen Rad51 involucrado en la reparación de roturas de doble cadena de ADN
RAF	Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
Ras	Una superfamilia de GTPasas incluyendo: KRAS, HRAS y NRAS
RB1	Retinoblastoma gene
RBP	RNA-binding proteins
RNA	Ácido Ribonucleico
RSV	Resveratrol
SAPK1	Serine/Threonine-protein kinase SAPK1
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA / ARN interferente pequeño
Sis	Oncogén (v-Sis)
siUSP28	Silenciamiento de USP28 con ARN interferente pequeño
Smad 2/3	SMAD2 and SMAD3 proteins mediate the canonical TGF-β1 pathway
Snail	Snail family transcriptional repressor 1 / Caracol represora transcripcional 1
Sox2	También conocida como SRY-box 2 (de sus siglas en inglés Sex determining Region Y-box 2)
Sp1	Sp1 Transcription Factor
Src	Proto-oncogén tirosina-proteína quinasa Src
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 / Transductor de señal y activador de transcripción 3
TGF-β	Transforming growth factor beta / Factor de crecimiento transformante beta
TNF	Tumor necrosis factor (Factor de necrosis tumoral)
Trim71	Tripartite Motif Containing 71 / Motivo tripartito que contiene 71
TUTasa4 / TUT4	Enzima 3' terminal uridilil transferasa
USP28	Proteasa específica de ubiquitina 28
UTR	Untranslated región / Región no traducida
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor / Factor de crecimiento endotelial vascular
WNT	Wnt signaling pathways

Resumen:

Lin28A es un oncogén que se encuentra sobre expresado en varios tipos de cánceres (testicular, de ovario, colon, mama, pulmón y otros). El hecho de que sea un factor de pluripotencia y regule procesos celulares como diferenciación, metabolismo de glucosa y proliferación, favorece ampliamente el desarrollo de cáncer y se asocia a tumores menos diferenciados y más agresivos. Se ha reportado que la oncoproteína Lin28A es bastante estable y no es fácil reducir su expresión. Múltiples estudios, incluidos los nuestros, han demostrado los efectos anticancerígenos del compuesto polifenólico de origen natural resveratrol (RSV). En este trabajo nos centramos en evaluar los mecanismos por los cuales el RSV logra disminuir la estabilidad de la proteína Lin28A. Encontramos que el RSV logra reducir los niveles de la proteína Lin28A, a través de la degradación de USP28 y de la inhibición de la vía MAPK/ERK responsable de fosforilar y estabilizar a Lin28A. Adicionalmente, comprobamos que la degradación de la oncoproteína Lin28A inducida por RSV en la línea NCCIT es a través de la vía proteasomal.

Este trabajo se demostró nuevamente la capacidad anticancerígena del RSV al disminuir la estabilidad de la importante oncoproteína Lin28A.

Palabras clave: *Lin28A, Cáncer, NCCIT, Resveratrol, USP28 y MAPK/ERK.*

Abstract:

Lin28A is an oncogene overexpressed in various cancers, including testicular, ovarian, colon, breast, and lung cancer. As a pluripotency factor, it regulates crucial cellular processes such as differentiation, glucose metabolism, and proliferation, which collectively promote cancer development. Lin28A is often associated with less differentiated and more aggressive tumors. Furthermore, the Lin28A oncoprotein exhibits notable stability, making it challenging to reduce its expression. Consequently, researchers are exploring molecules or drugs that can inhibit its expression.

Several studies, including our own, have highlighted the anticancer effects of the naturally occurring polyphenolic compound resveratrol (RSV). This study investigates the mechanisms by which RSV decreases the stability of the Lin28A protein. We found that RSV reduces Lin28A protein levels by promoting the degradation of USP28 and inhibiting the MAPK/ERK pathway, which is responsible for phosphorylating and stabilizing Lin28A. Additionally, we determined that RSV-induced degradation of the Lin28A oncoprotein in the NCCIT cell line occurs through the proteasomal pathway.

This research further underscores the anticancer potential of RSV by demonstrating its ability to decrease the stability of the critical Lin28A oncoprotein.

Keywords: *Lin28A, Cancer, NCCIT, Resveratrol, USP28 and MAPK/ERK.*

Introducción:

1. Cáncer

El cáncer hace referencia a un amplio conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células anormales que se dividen, proliferan y se diseminan en cualquier parte del cuerpo, un proceso conocido como metástasis. En condiciones normales, las células se dividen y mueren según un ciclo programado. Sin embargo, las células cancerosas pierden esta capacidad de muerte y se dividen indefinidamente (*Figura 1*), un fenómeno que se conoce como carcinogénesis. Esta proliferación desmedida puede dar lugar a masas celulares denominadas “**tumores**” o “**neoplasias**”, que, al expandirse, pueden destruir y reemplazar los tejidos sanos (SEOM, 2019).

Carcinogénesis

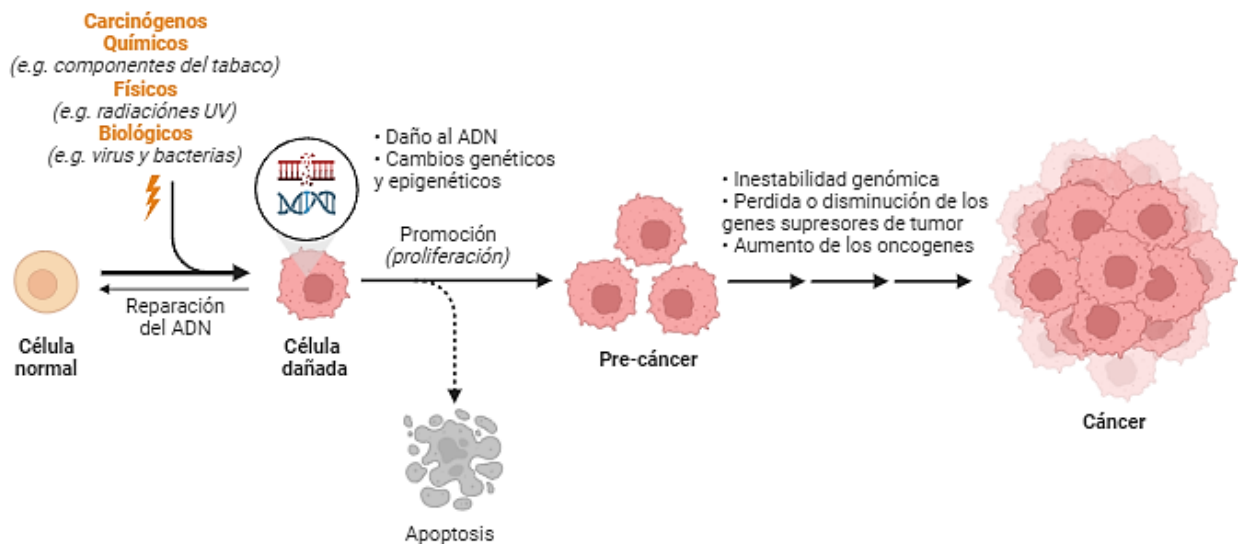


Figura 1 | Proceso de la carcinogénesis. Las células normales se dividen de manera controlada. Sin embargo, cuando una célula presenta mutaciones u otras alteraciones irreparables, inicia su propio programa de muerte celular para regular su desarrollo y crecimiento. Este mecanismo se conoce como “apoptosis”. Por el contrario, las células cancerosas desarrollan mutaciones o cambios a nivel genético y epigenético que no son reparados y pierden la capacidad para morir, multiplicándose de manera descontrolada.

Dentro de las características que diferencian a una célula normal de una cancerosa descritas por Hanahan en el 2022, se encuentran: autosuficiencia a las señales de

crecimiento, evasión de la apoptosis, proliferación ilimitada, evasión del sistema inmune, reprogramación del metabolismo energético, angiogénesis sostenida e invasión y metástasis; todas ellas teniendo detrás la inestabilidad genómica favoreciendo el desarrollo de estas características y por lo tanto del cáncer (Hanahan, 2022).

El desarrollo del cáncer suele ser el resultado de la interacción entre factores genéticos y agentes externos. Estos incluyen carcinógenos físicos, como la radiación ionizante y la radiación ultravioleta; carcinógenos químicos, que abarcan sustancias como el amianto, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) y el arsénico (contaminante del agua potable); y, por último, carcinógenos biológicos como determinadas bacterias (*Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*), virus (VPH, EVB, hepatitis B y C) y parásitos (*Schistosoma haematobium*, *Opisthorchis viverrini*) (De Martel et al., 2020; OMS, 2022).

Además, el cáncer es promovido por cambios genéticos y epigenéticos que descontrolan el funcionamiento adecuado de nuestras células, especialmente de aquellos involucrados en el crecimiento y división celular. Por ejemplo, el silenciamiento de genes implicados en el control del ciclo celular (supresores de tumor) y la sobre-expresión de otros involucrados en el proceso de carcinogénesis (oncogenes) (NCI, 2024).

Los genes supresores de tumores (p53, Let-7, NF1, RB1, etc.) son genes normalmente implicados en procesos como la regulación negativa del ciclo celular, reparación del ADN y apoptosis; estos genes deben verse abatidos para que el fenotipo tumoral progrese. A menudo, las mutaciones en estos genes son responsables de los síndromes tumorales hereditarios, ya que las mutaciones que afectan a las células madre cancerosas se transmiten a células descendientes gracias a su potencial proliferativo ilimitado (Gariglio, 2012; Y. Liu et al., 2015).

Por otro lado, los proto-oncogenes (Lin28, c-MYC, Ras, Src, Sis, etc.) usualmente favorecen procesos como proliferación, supervivencia, angiogénesis, inflamación, alargamiento de telómeros y propagación. En condiciones normales, estos genes están fuertemente regulados para prevenir la proliferación descontrolada. Sin embargo, cuando se sobre-

expresan o sufren mutaciones, adquieren funciones que favorecen la progresión tumoral, convirtiéndose en oncogenes. Esto permite a las células crecer y sobrevivir en circunstancias inapropiadas, e incluso les otorga la capacidad de evadir el sistema inmunológico (Baltanas & Santos, 2023; Roetman et al., 2022).

2. Lin28

Lin28 es una proteína de unión al RNA (RBP) que regula importantes procesos celulares como desarrollo celular, metabolismo de glucosa, diferenciación, pluripotencia y troncalidad (Z. Lin et al., 2022; Zhang et al., 2016). Lin28 se encuentra ampliamente expresado durante el desarrollo temprano y en las células madre. Durante el proceso de diferenciación, la expresión de Lin28 va disminuyendo de manera gradual, de tal manera que se encuentra ausente en la mayoría de las células diferenciadas del adulto (D.-H. Yang & Moss, 2003). Lin28 se ha identificado como uno de los genes clave en la reprogramación de células somáticas de mamíferos a células pluripotentes y en la autorrenovación de las mismas (Hanna et al., 2009; Yu et al., 2007). Además, se sabe que la sobre-expresión de Lin28 en cáncer, se asocia con tumores más agresivos, menos diferenciados y resistentes a las terapias actuales; esto gracias a su capacidad de promover la proliferación, aumentar el metabolismo de glucosa, inducir la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y promover el desarrollo y mantenimiento de las células madre cancerosas (CSC) (Hamano et al., 2012; M. Li et al., 2019; Zhang et al., 2016).

Existen 2 parálogos del gen Lin28 en vertebrados Lin28A y Lin28B, los cuales comparten una alta homología en su secuencia de DNA (*Figura 2*) (Tsalikas & Romer-Seibert, 2015). El gen Lin28A se ubica en el locus 1p36.11 del cromosoma humano y codifica una proteína que tiene 209 aminoácidos (aa), mientras que Lin28B se ubica en el locus 6q21 y codifica una proteína de 250 aa (Zhou et al., 2013). Tanto Lin28A como Lin28B contienen un único dominio de choque frío (CSD) y un dominio de dedos de zinc que consta de CysCysHisCys (CCHC), que median la unión de Lin28A/B a sus RNA diana (Let-7, IGF-2, HIF-1 α , OCT4,

CDK2, HER2) (Hamano et al., 2012; Qiu et al., 2010; Shen et al., 2016; Viswanathan et al., 2009; Yamamoto et al., 2023).

Estudios recientes han demostrado que Lin28A y Lin28B pos-trascripcionalmente regulan a Let-7 a través de diferentes mecanismos, que están descritos más adelante (Piskounova et al., 2011); sin embargo, investigadores han especulado que comúnmente ambas proteínas se unen a los mismos sitios en los mRNA y comparten funciones similares.

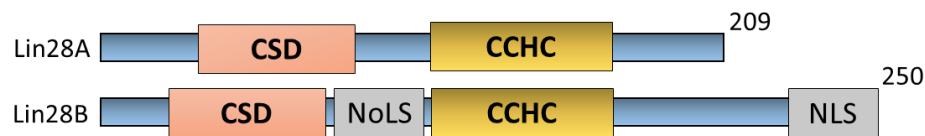


Figura 2 | Dominios de las proteínas Lin28A y Lin28B humanas. Lin28A y Lin28B comparten varios dominios comunes: el CSD (rosa) y CCHC (amarillo), mientras que Lin28B contiene tanto la señal de localización nucleolar putativa (NoLS) como la señal de localización nuclear (NLS) (gris). Los números denotan los aminoácidos (Xiong et al., 2017).

2.1 Lin28 y Let-7

Let-7 también se encuentra como un gen heterocrónico en *C. elegans* y desempeña un papel esencial en el desarrollo del embrión. La familia Let-7 contiene 12 miembros diferentes incluyendo Let-7a-1, -2, -3; Let-7b; Let-7c; Let-7d; Let-7e; Let-7f-1; Let-7f-2; Let-7g; Let-7i y miR-98 en humanos. Todos ellos pueden ser suprimidos por Lin28 a nivel postranscripcional. A diferencia de Lin28, la familia Let-7 apenas se expresa en las etapas embrionarias y aumenta al final del desarrollo embrionario (Hafner et al., 2013); el miRNA Let-7 se identifica como un supresor de tumores. Se ha reportado que los miembros de esta familia de genes tienen una función antitumoral, inicialmente, porque bloquean la progresión del ciclo celular y la transcripción mediante la regulación negativa de varios factores que participan en estos procesos (Büssing et al., 2008) tales como: c-MYC, las 3 proteínas de la familia Ras, Ciclina D1/2, CDK6, CDC34, CDC25a, Trim71 (un represor del inhibidor de CDK1A), HGMA2 y STAT3 (Morita et al., 2006; Viswanathan & Daley, 2010; T. Wang et al., 2015). Cuando Lin28 inhibe a Let-7 estos genes se activan, regulando

positivamente a varias vías; por ejemplo, MYC puede unirse al promotor de Lin28 y favorecer su transcripción, de esta manera también reprime al promotor de Let-7 en algunos subtipos celulares. Por otro lado, Ras activa a ERK (señalización MAPK) y a la vía de señalización PI3K/AKT, ERK activa directamente la transcripción de MYC, mientras que AKT promueve indirectamente la expresión del gen MYC mediante la activación de β -catenina, lo que sugiere que RAS inhibe a Let-7 al regular la expresión de Lin28 a través de MYC que a su vez es activada por MAPK/ERK y PI3k/AKT (T. Wang et al., 2015) (*Figura 4*).

A continuación, se explicará el proceso de inhibición de Let-7 por Lin28 de una manera más detallada: Lin28A y Lin28B se unen al elemento rico en G (GGAG, GAAG o AGGG) ubicado en la región 3' UTR del mRNA de Let-7. Lin28B secuestra los transcritos primarios de Let-7 (pri-Let-7) en el nucléolo evitando su procesamiento por Drosha/DGCR8 (*Figura 3*). De manera similar, Lin28A puede bloquear el procesamiento del pri-Let-7 en el núcleo esto gracias a la proteína de unión a RNA MSI1, la cual, promueve la localización de Lin28A en el núcleo. Como se muestra en la *Figura 3*, la localización subcelular de Lin28A y Lin28B puede diferir, ya que Lin28B se localiza principalmente en el núcleo y nucléolo debido a que presenta una señal de localización nuclear y nucleolar; sin embargo, ambos pueden desplazarse del núcleo al citosol (Piskounova et al., 2011; Tsalikas & Romer-Seibert, 2015). En el citosol Lin28A y Lin28B provocan la uridilación de Let-7, lo que bloquea el procesamiento por DROSHA y DICER al unirse a la secuencia de reconocimiento de éstas ubicado en el bucle terminal del pre-miRNA (*Figura 3*) (Piskounova et al., 2011). El proceso de uridilación se realiza mediante la polimerasa TUTasa4 (TUT4) y en menor medida por TUT7, las cuales son reclutadas por Lin28A/B promoviendo la agregación de una cola de oligouridina a los transcritos (Balzeau et al., 2017); más tarde, la exoribonucleasa DIS3L2 se dirige específicamente a la cola uridilada e inicia la degradación del pre-Let-7 en dirección 3'a 5' (Ustianenko et al., 2013).

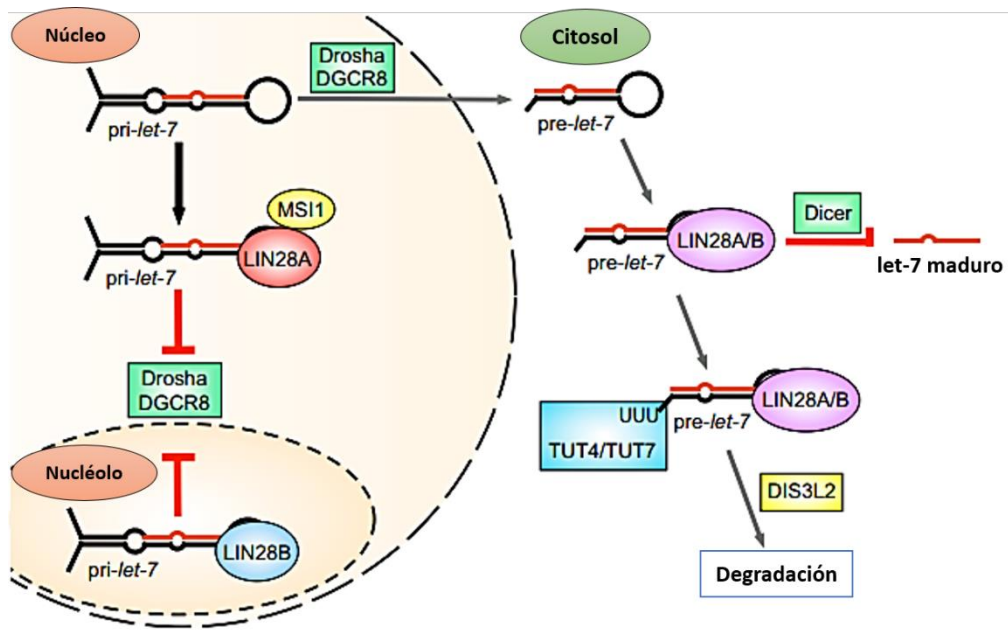


Figura 3 | Inhibición del procesamiento de Let-7 por Lin28A/B. El microprocesador Drosha/DGCR8 procesa al transcrito primario (pri-Let-7) producido por el gen Let-7 en el núcleo. Luego, el precursor generado Let-7 (pre-Let-7) se transporta al citosol y se procesa mediante las proteínas Dicer y Argonata (AGO) para generar el Let-7 maduro. La biogénesis de pri-Let-7 está bloqueada tanto por Lin28A en el núcleo como por Lin28B en el nucléolo. La biogénesis de pre-Let-7 y Let-7 maduro están bloqueadas por Lin28A/B en el citosol. Las flechas de línea continua se refieren a la inducción y la promoción, mientras que las rojas cabeza de martillo refieren a la inhibición (Tzialikas & Romer-Seibert, 2015).

2.2 Lin28 y cáncer

Se ha encontrado sobre-expresado Lin28A/B en cáncer de testículo (Murray et al., 2013), hepatocelular (You et al., 2014), riñón (Nguyen et al., 2014), gástrico (X. Wang, Hu, et al., 2018), vejiga (Shi et al., 2021), ovario (X. Lin et al., 2018), mama (Qi et al., 2022; Shen et al., 2016; Xiong et al., 2017) y pulmón (Qi et al., 2022).

Lin28A y Lin28B suelen excluirse mutuamente en algunos tipos de cáncer. Por ejemplo, se ha visto la expresión sólo de Lin28B en líneas celulares de cáncer como: neuroblastoma (Kelly, SH-SY5Y, CHP-212) (Missios et al., 2021), cáncer de mama (293T, MDA-MB-231) y TNBC-cáncer de mama triple negativo (Qi et al., 2022; Xia & Wang, 2022), Leucemia como la MLL-leucemia mielomonocítica o JMML-leucemia mielomonocítica juvenil (OCI-M2, K-

562) (L. Chen et al., 2016; Helmsmoortel et al., 2016; «The Human Protein Atlas», 2020a). Y la expresión de Lin28A en las líneas celulares de: cáncer papilar de tiroide (ML-1, CAL-62, B-CPAP) (Jin et al., 2020), hepatocelular (Huh-7, Huh-6) (I.-T. Chen et al., 2022), cáncer de próstata (LNCaP, VCaP, Du145) («The Human Protein Atlas», 2020b). Sin embargo, en una minoría de cánceres se expresan ambos parálogos como en cáncer colorectal (OUMS-23) (Pretzsch et al., 2021), mamario (T47D) (J. Yang et al., 2015), cáncer de tiroides (TT) y tumores de células germinales como cáncer de ovario (PA-1, A2780) (Lu et al., 2009) y cáncer de testículo (SuSa) (Krsnik et al., 2022). Aunque en algunos casos uno se llega a expresar en mayor proporción que el otro (Cao et al., 2011; Z. Lin et al., 2022; Xue et al., 2011).

Estudios han demostrado que Lin28 puede activar la expresión de oncogenes como MYC, RAS y HMGA2 (por sus siglas en inglés high mobility group AT-hook 2 o grupo A2 de alta movilidad del gen embrionario), mediante la represión de Let-7 (Zhang et al., 2016). La desregulación de MYC por ejemplo, promueve el desarrollo del cáncer al inducir la proliferación celular y la angiogénesis, al catalizar la replicación del ADN e inhibir la diferenciación (*Figura 4*) (L. Chen et al., 2016). Por otro lado, MYC también puede aumentar la expresión de Lin28 a nivel transcripcional, formando un circuito de retroalimentación positiva entre Lin28 y MYC (Chang et al., 2009; Missios et al., 2021). En cambio, RAS tiene la capacidad de inhibir a Let-7 a través de Lin28 mediante la activación de MYC por la vía de las MAPK o a través de PI3K/AKT/ β -catenina (*Figura 4*) (T. Wang et al., 2015). El oncogén RAS interactúa con el metabolismo celular, regulando positivamente los procesos autofágicos, lo que resulta en el mantenimiento de las mitocondrias, un aumento en la glucólisis y aumento de la viabilidad celular, lo que induce el crecimiento del tumor *in vivo* (L. Guo et al., 2013, 2019).

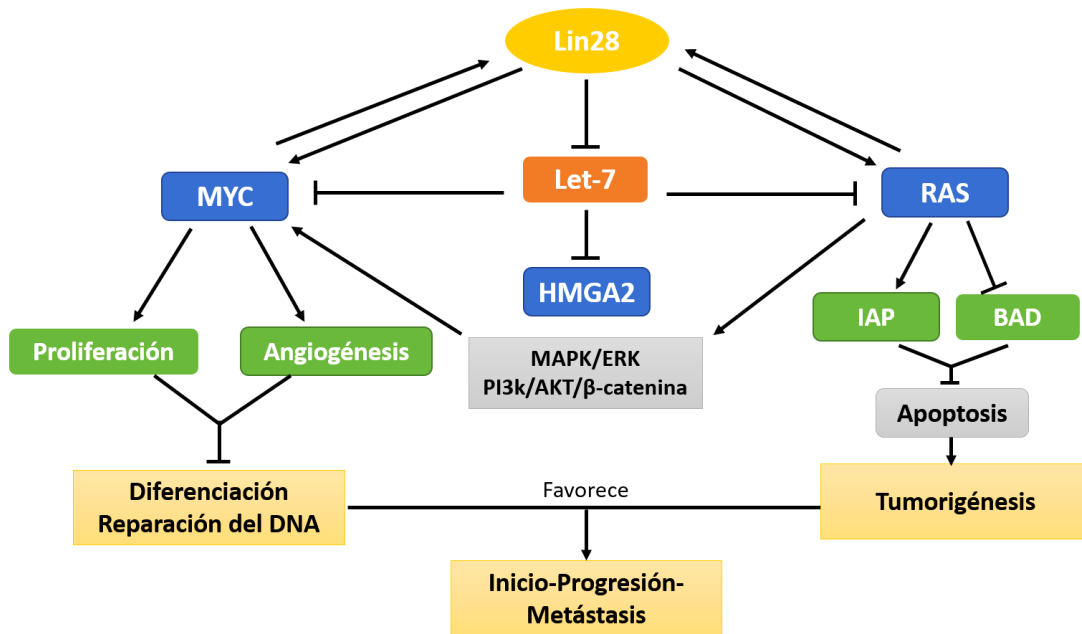


Figura 4| Rol de Lin28 en el desarrollo y progresión del cáncer. Las flechas con cabeza de martillo hacen referencia a la inhibición, mientras que las flechas en punta a la activación y promoción del cáncer.

Lin28A/B también juega un papel importante en la estimulación de la inflamación y tumorigénesis. La inflamación crónica e inflamación provocada por el tumor se correlacionan con el inicio, la progresión y la metástasis de los cánceres. Este efecto está mediado por muchas quimiocinas, citoquinas y factores de transcripción, como el NF-κB y STAT3 (el transductor de señales y activador del factor de transcripción 3) (Grivennikov & Karin, 2010). Iliopoulos y sus colegas en el 2009, demostraron un circuito de retroalimentación positiva entre la inflamación y la transformación celular en relación con Lin28 y Let-7. Mencionan que después de la activación transitoria de una señal inflamatoria mediada por la oncoproteína Src, la expresión de NF-κB aumenta, provocando una mayor expresión de Lin28 mediante la unión directa de NF-κB a su promotor (Iliopoulos et al., 2009). La disminución de los niveles de Let-7 en consecuencia, promueve el aumento de IL-6 y RAS favoreciendo la transformación celular (Figura 5). La disminución de Let-7 también logra aliviar la represión de IκBβ e IKK quienes reprimen la

vía de señalización NF-κB formando un circuito de retroalimentación positiva entre Lin28 y NF-κB (Mills et al., 2020).

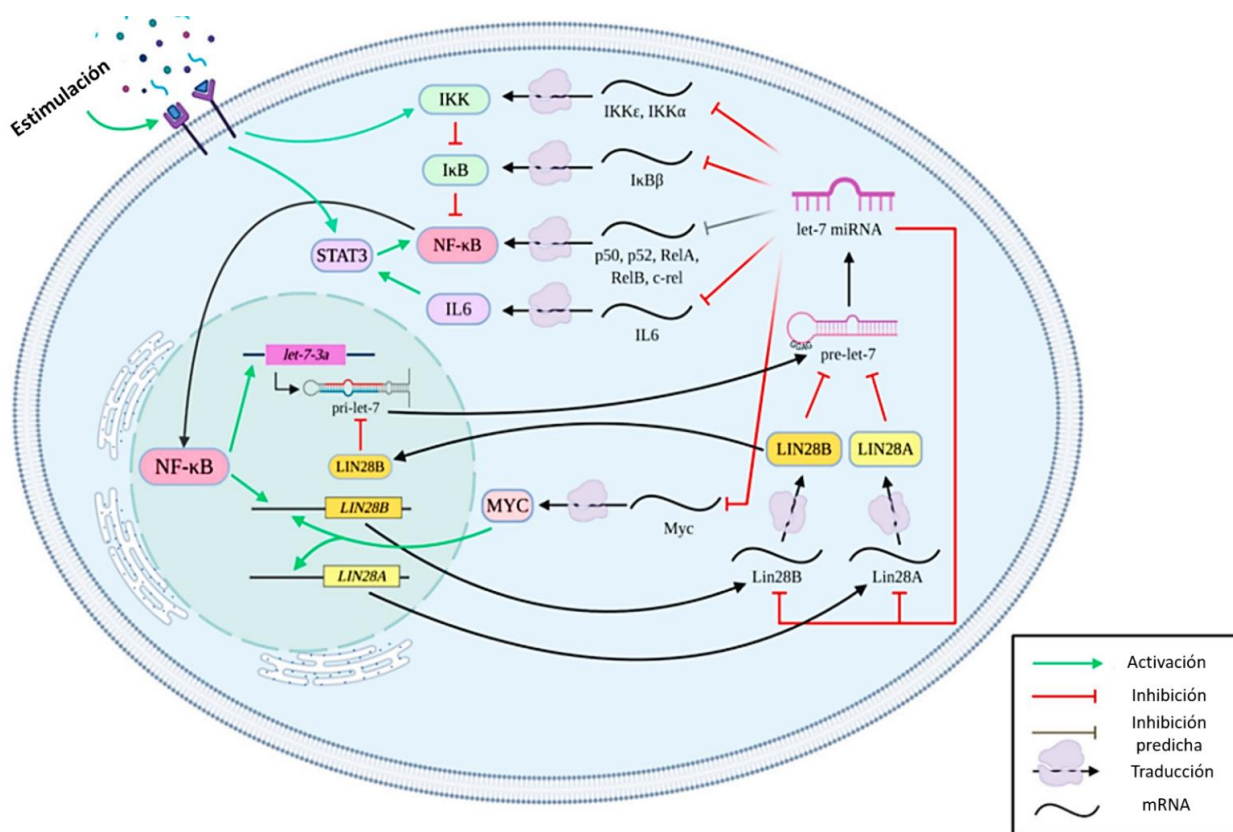


Figura 5| Circuito de regulación entre las vías NF-κB y Lin28/Let-7. Componentes de la vía de activación de NF-κB afectados por Let-7 y su regulación positiva dependiente de la expresión de Lin28 (Mills et al., 2020).

De manera interesante, muchos investigadores sugieren que las células madre cancerosas (CSC) son las responsables de iniciar la formación de tumores, al igual que las células madre normales son responsables del crecimiento y la reparación de tejidos sanos. Las CSC tienen la capacidad de realizar una replicación ilimitada y producir células cancerosas maduras que constituyen la mayor parte de los tumores. También tienen la capacidad de entrar a un estado de latencia, lo que ayuda a que los tumores reaparezcan incluso después del uso de terapias dirigidas. En este sentido, se ha visto que Lin28, en conjunto con los genes Oct4, Sox2 y Nanog, pueden reprogramar células somáticas humanas en células madre pluripotentes inducidas (iPSC) que comparten muchas características con

las células madre embrionarias humanas (Yu et al., 2007). Se cree que las células madre del cáncer surgen a través de mecanismos de reprogramación que son similares a la generación de las iPSC (Chien et al., 2015). Tal como lo reportan Graciela Ruiz y colaboradores en el 2019 donde prueban cómo los genes involucrados en la regulación transcripcional de la pluripotencia (OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC Y NANOG) se expresan en tumores de cáncer cérvico-uterino y pueden inducir la tumorigénesis en una línea celular no tumorigénica (HaCaT) al ser transfectada con los mismos genes (Ruíz et al., 2018).

Lin28 desempeña un papel importante en la expresión de varios microRNA que participan en el mantenimiento y diferenciación de las células madre. Además, múltiples estudios han demostrado que Lin28 se expresa altamente en varios tipos de cáncer, donde ayuda a mantener la población de células madre cancerosas. Y se ha visto, que cuando Lin28 es abatido en líneas celulares cancerosas, la cantidad de células madre cancerosas disminuye (Xu et al., 2021). Por el contrario, cuando se sobre-expresa Lin28, se producen más células madre cancerosas que son capaces de favorecer la formación de tumores (Z. Lin et al., 2022).

En un estudio se demostró un bucle de retroalimentación doble negativo formado por el lncRNA H19, Let-7 y Lin28A que es crítico en el mantenimiento de las CSC de mama (BCSC). Se demostró que la sobreexpresión de H19 funciona como un RNA endógeno competitivo para inhibir a Let-7, aumentando así los niveles de expresión de Lin28A y promoviendo el mantenimiento de las BCSC (Peng et al., 2017).

2.3 Mecanismos de estabilización de Lin28A

De modo interesante, se han reportado factores transcripcionales y otros mecanismos que ayudan a Lin28 a sobre expresarse e incluso a estabilizarse a nivel postraduccional. Para fines de este trabajo, me enfocaré principalmente en los mecanismos de estabilización de la proteína de Lin28A. Los factores transcripcionales que se unen a sitios específicos en el promotor de Lin28A y favorecen su expresión tanto a nivel de mRNA como de proteína son: Sp1 y STAT3. En el estudio realizado por You y colaboradores en

2014, se evidenció que Sp1 se une al promotor de Lin28A, lo que lleva a un aumento en su expresión. Además, el trabajo mostró que la expresión de Lin28A disminuía al transfectar las células con un siRNA dirigido a Sp1, tanto a nivel de mRNA como de proteína, en células HepG2-X y H7402-X (*Figura 6*) (You et al., 2014).

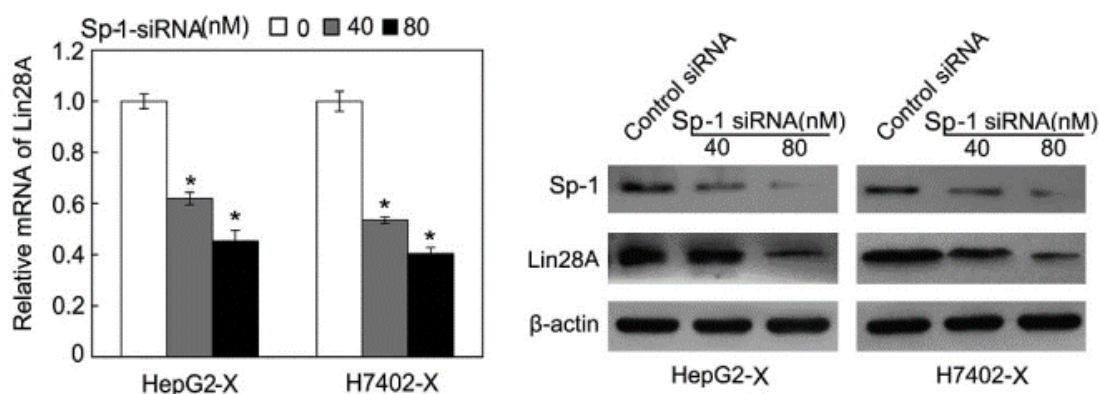


Figura 6 | Expresión de Lin28A en presencia y ausencia de Sp-1. La expresión del mRNA y los niveles de proteína de Lin28A aumentan en presencia del factor de transcripción Sp1; por el contrario, cuando Sp1 está silenciado, la expresión de Lin28A disminuye en células de cáncer de hígado (HepG2-X y H7402-X) (You et al., 2014).

Por otro lado, Xu y colaboradores (2021) encontraron que la expresión de Lin28A en las células A673-SP aumentó tras la transfección con pcDNA-STAT3, mientras que se redujo al transfectar las células con si-STAT3 (*Figura 7*). Además, concluyeron que STAT3 puede suprimir la expresión de Let-7a en las células A673 de sarcoma de Ewing mediante la activación de Lin28A (Xu et al., 2021).

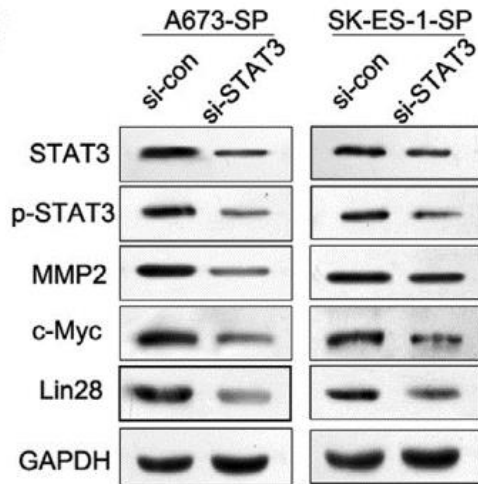


Figura 7| Expresión de Lin28A en presencia y ausencia de STAT3. Los niveles de proteína de Lin28A aumentan en presencia del factor de transcripción STAT3, por el contrario, cuando STAT3 está silenciado, la expresión de Lin28A disminuye en células de osteosarcoma de Erwin (A673-SP y SK-ES-1-SP) (Xu et al., 2021).

En cuanto a los mecanismos de regulación postraducciona mejor descritos se encuentran los siguientes: uno de ellos fue demostrado por Tsanov y col. en el 2017 y Liu en el 2017, el cual involucra a la vía MAPK/ERK (X. Liu et al., 2017; Tsanov et al., 2017). La vía MAPK constituye una familia de serina/treonina cinasas que se activan mediante una amplia gama de estímulos extracelulares, incluidos neurotransmisores, hormonas, factores inflamatorios, condiciones de estrés, virus y factores de crecimiento, lo que da como resultado diversas respuestas intracelulares a través de la regulación de la transcripción de genes involucrados en procesos celulares fundamentales como el crecimiento, la proliferación, diferenciación, migración, el metabolismo y la apoptosis (Y. Guo et al., 2020; Munshi & Ramesh, 2013).

Tsanov y colaboradores en el 2017, mostraron que Lin28 se fosforilaba por una MAPK en células de carcinoma embrionario humano (hECC), lo que le confería estabilización a nivel pos-traducciona y provocaba un incremento en los niveles de proteína. En este trabajo encontraron por análisis de espectrometría de masas que la serina 200 (S200) de Lin28A es fosforilada por una MAPK. Utilizaron tratamientos a corto plazo con PMA (acetato de miristato de forbol- un activador de la señalización de MAPK/ERK) y observaron que tanto la proteína de Lin28A como la fosforilación de Lin28A (pLin28A) en S200 incrementaba (Figura 8A). Por otro lado, para identificar la MAPK particular responsable de la fosforilación en S200, se realizó una selección de inhibidores dirigidos, utilizando los inhibidores selectivos de las principales MAPK; sólo el inhibidor de MEK/ERK, PD0325901,

redujo consistentemente la fosforilación de S200 en Lin28A. Por último, realizaron experimentos con cicloheximida para evaluar la cinética de degradación de pLin28A (S200) y Lin28A total. Se observó que la proteína de Lin28A sin fosforilar decaía a las 12 hrs., mientras que la fosfoproteína se mantuvo estable hasta las 24 horas (*Figura 8B*). De esta manera, concluyeron que la ruta MAPK/ERK afecta directamente a Lin28A favoreciendo su estabilidad a nivel postraduccional (Tsanov et al., 2017).

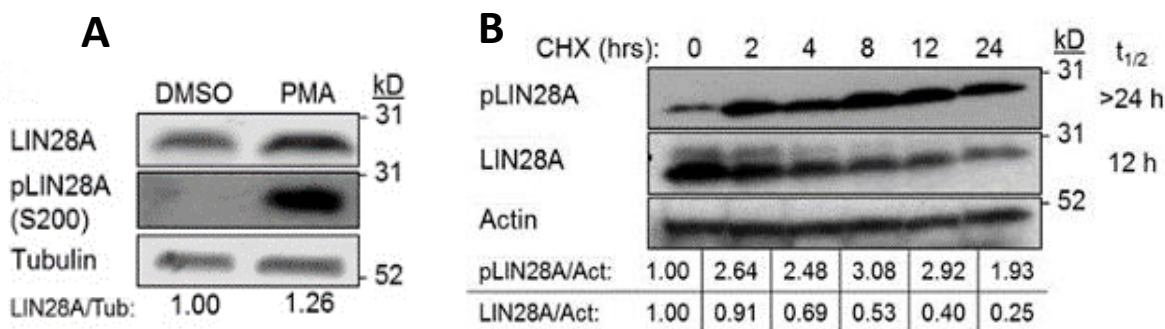


Figura 8 | La fosforilación de Lin28A en S200 por la vía MAPK/ERK estabiliza e incrementa la vida media de la proteína de Lin28A. (A) Western blot de Lin28A después de un tratamiento de 3 hrs, con DMSO (control) y PMA (200nM). (B) Cinética de degradación del fosfo-endógeno y Lin28A total. CHX= cicloheximida (100 μ g / ml) (Tsanov et al., 2017).

Otra de las modificaciones postraduccionales que afectan la estabilidad de Lin28A y el nivel de la proteína es la ubiquitinación. Se ha estudiado ampliamente que los eventos de ubiquitinación de proteínas se pueden invertir con enzimas conocidas como enzimas desubiquitinadoras (DUB). Existen aproximadamente 100 DUB en el proteoma humano y se dividen en varias familias principales, dentro de las cuales se encuentra la proteasa específica de ubiquitina (USP) (Clague et al., 2012).

La ubiquitinación es un fenómeno a través del cual las moléculas de ubiquitina se unen a los sustratos de proteínas para la degradación de las proteínas. Es una de las modificaciones postraduccionales más importantes que regulan la estabilidad y la actividad funcional de las proteínas; el proceso de ubiquitinación se organiza mediante una cascada de enzimas que consisten en enzimas activadoras de ubiquitina (E1), enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) y ubiquitinligasas (E3) que median la transferencia de

moléculas de ubiquitina a sustratos de proteínas específicas (Amerik & Hochstrasser, 2004). La ubiquitina es una pequeña molécula que se adhiere a los sustratos de proteínas como un monómero o como polímeros. Por lo general, la monoubiquitinación de una proteína sirve como una señal para la reparación del ADN, la transducción de señales y la endocitosis (Sun & Chen, 2004), mientras que la poliubiquitinación se limita principalmente a la degradación de las proteínas y la transducción por señal (Sadowski et al., 2012).

Por otro lado, como cada acción provoca una reacción, todas las modificaciones postraduccionales principales, incluido el proceso de ubiquitinación, pueden revertirse. El proceso de escisión de moléculas de ubiquitina de sustratos de proteínas conjugadas con ubiquitina mediante enzimas de desubiquitinación (DUB) se denomina deubiquitinación (*Figura 9*). La ubiquitinación de proteínas catalizada por las ligasas E3 puede revertirse mediante DUB para prevenir la degradación de las proteínas. Las enzimas DUB se unen al enlace isopeptídico entre la lisina de la proteína diana y la glicina del carbono terminal de la ubiquitina, lo que contrarresta la actividad-ubiquitina-proteinoligasa (Amerik & Hochstrasser, 2004). Las principales funciones celulares de las enzimas DUB son (i) el procesamiento de precursores de ubiquitina, (ii) el reciclaje de moléculas de ubiquitina durante la ubiquitinación, (iii) la edición de cadenas de ubiquitina y (iv) la reversión de la conjugación de ubiquitina (Reyes-Turcu et al., 2009). Por lo tanto, las proteínas DUB desempeñan un papel crítico en la regulación de la vía proteasomal. Las enzimas DUB regulan una variedad de funciones celulares como la prevención de la degradación de proteínas, apoptosis, progresión del ciclo celular, segregación de cromosomas, expresión de genes, reparación del ADN, activación de cinasas y la localización y degradación de los intermediarios de señalización (Amerik & Hochstrasser, 2004).

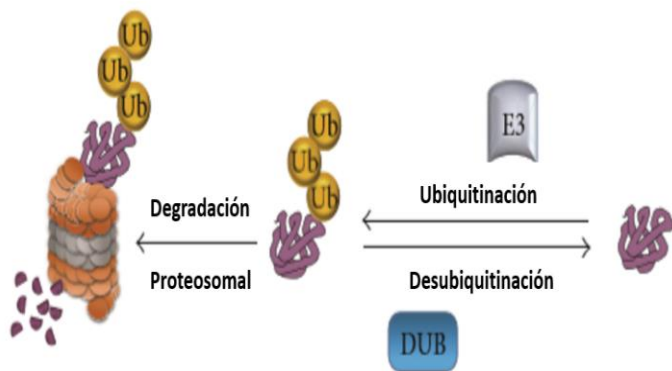


Figura 9| Proceso de ubiquitinación y desubiquitinación. La enzima ubiquitina E3 ligasa cataliza la transferencia de ubiquitina al residuo de lisina en la proteína dirigida y la canaliza hacia proteosoma 26S para su degradación. La enzima DUB es capaz de revertir la conjugación de ubiquitina, previniendo la proteólisis (Amerik & Hochstrasser, 2004).

En un estudio reciente realizado por Haq y colaboradores en el 2019, se demostró en células de carcinoma embrionario humano que la proteína Lin28A se ubiquitinaba, desestabilizaba y degradaba por vía proteosomal 26S y se informó que la enzima desubiquitinasa USP28 (proteasa 28 específica de ubiquitina) era capaz de interactuar y revertir la ubiquitinación de Lin28A evitando su degradación e incrementando su vida media (*Figura 10*). En consecuencia, la presencia de USP28 aumentaba la viabilidad de las células cancerosas, la migración y la progresión del tumor mediada por Lin28A (Haq et al., 2019).

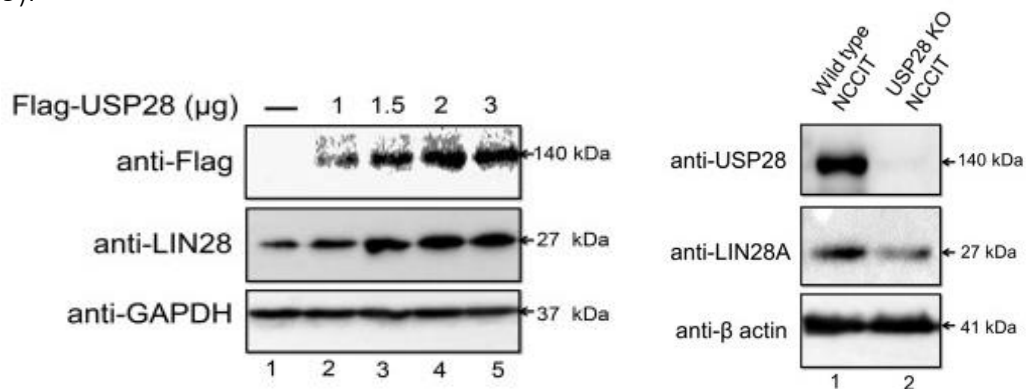


Figura 10| Lin28A incrementa sus niveles en presencia de USP28 en células NCCIT. (A) Western blot de Lin28A en células NCCIT con diferentes concentraciones de USP28. (B) Western blot de Lin28A en presencia y ausencia de USP28 (Haq et al., 2019).

Por otra parte, Azad Saei y col. en el 2018, demostraron en células 293T (células embrionarias humanas de riñón derivadas de las HEK293) que la pérdida de USP28 mejora la actividad de la vía MAPK a través de la estabilización de miembros de la familia RAF, lo que promueve un incremento en la activación de pERK (*Figura 11*) (Saei et al., 2018). Esto

nos permite suponer que en ausencia de una vía de estabilización pos-traducciona la otra estaría presente.

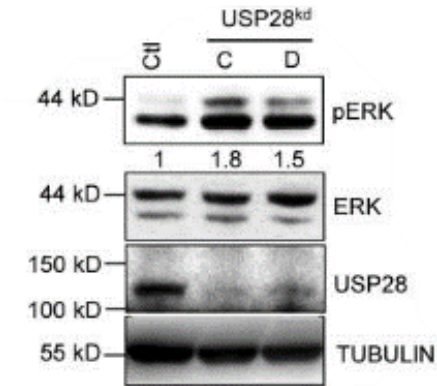


Figura 11 | Western blot del knockout de USP28 y la activación de ERK. Las letras C y D hacen referencia a los 2 vectores con shRNA contra USP28 con mejor eficiencia en el silenciamiento. Además, se observa cómo la pérdida de USP28 mejora eficazmente la activación de ERK (pERK) en comparación con el control (Saei et al., 2018).

De manera interesante, estudios anteriores han demostrado el papel oncogénico de USP28, al promover la proliferación celular, invasión, metástasis, estimular la supervivencia celular, inhibir la diferenciación celular, inducir la angiogénesis y mantener las características similares a las CSC. En todos estos procesos, la ubiquitinación y desubiquitinación de proteínas juega un papel importante (*Figura 12*) (X. Ren et al., 2023). Por ello, se ha considerado a USP28 como un blanco terapéutico clave que podría influir en la sensibilidad de las células cancerígenas a diversas terapias.

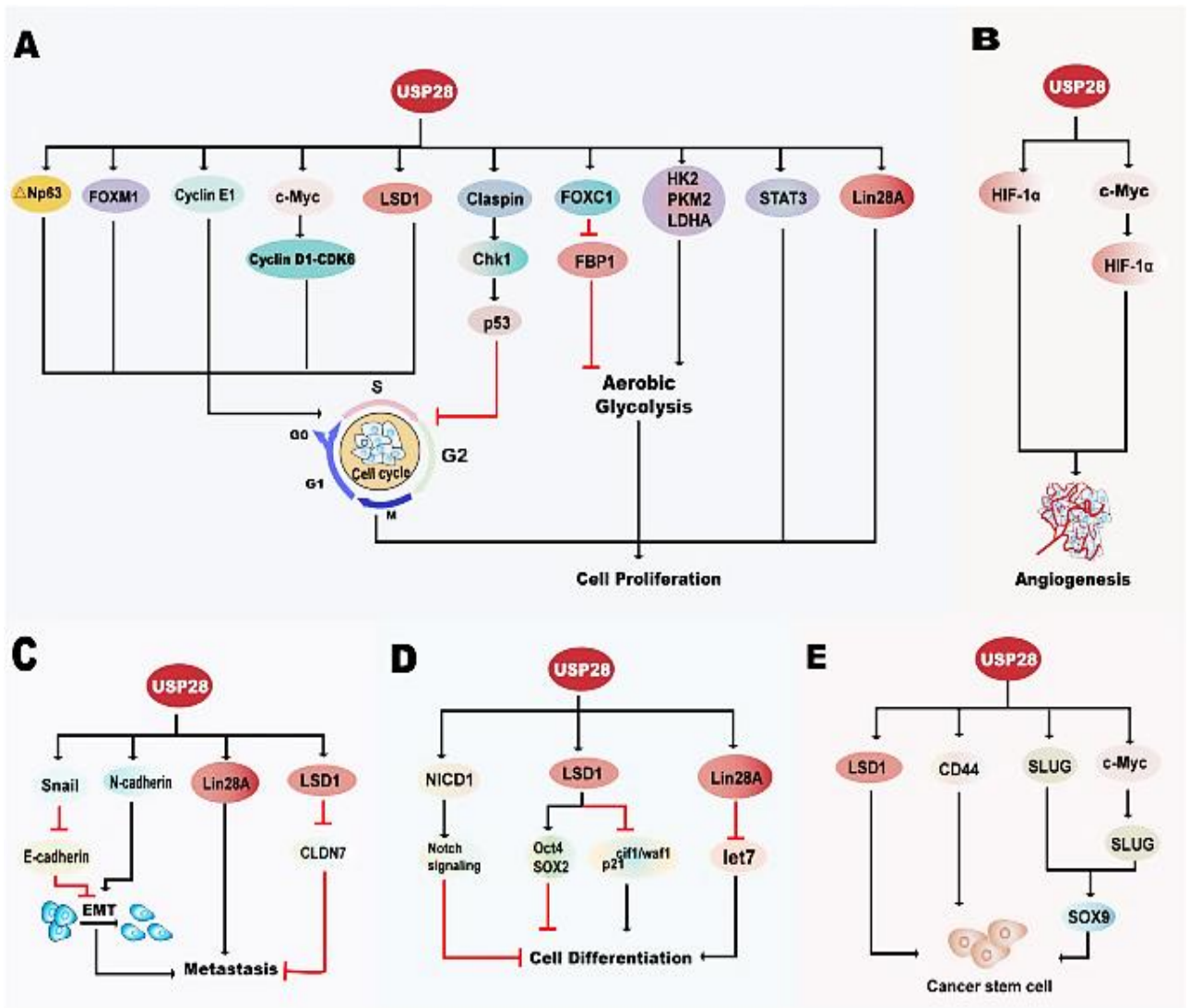


Figura 12 | Papel de USP28 en la progresión del cáncer. (A) USP28 promueve la progresión del ciclo celular, la glucólisis aeróbica y proliferación celular. (B) USP28 acelera la angiogénesis mediante la mediación de HIF-1 α y c-Myc. (C) USP28 puede inducir la promoción de la EMT y metástasis. (D) USP28 suprime la diferenciación celular mediante NICD1, LSD1 y Lin28A. (E) USP28 mantiene las características similares a las de las células madre cancerosas (X. Ren et al., 2023).

Varios estudios han demostrado que la inhibición terapéutica, la inactivación génica o el silenciamiento del mRNA de Lin28 y USP28 revierten la troncalidad y los fenotipos invasivos (Saei et al., 2018; T. Wang et al., 2021).

En la *Figura 13*, podemos ver con mayor claridad los mecanismos que pueden estabilizar y mejorar la expresión de Lin28A/B vía post-traduccionalmente. Por ejemplo, la fosforilación mediada por MAPK/ERK que estabiliza, extiende la vida media y regula la función de Lin28A como factor de pluripotencia (Tsanov et al., 2017). También se puede apreciar a USP28, la cual, regula y protege a Lin28A de la degradación al desubiquitar la proteína (Haq et al., 2019). De manera similar, en embryonic stem cell (ESC) se demostró que la proteína Kap1 (proteína 1 asociada a KRAB), interactúa con Lin28A y atenúa su ubiquitinación, aumentando su estabilidad, de manera parecida a USP28 (Moon et al., 2022). Además, recientemente se encontró que la proteína 6B que contiene el dominio OTU (OTUD6B) perteneciente a la familia de deubiquitinasas del dominio de tumor de ovario (OTU) protege a Lin28B de la degradación desubiquitinándola (Ma et al., 2023).

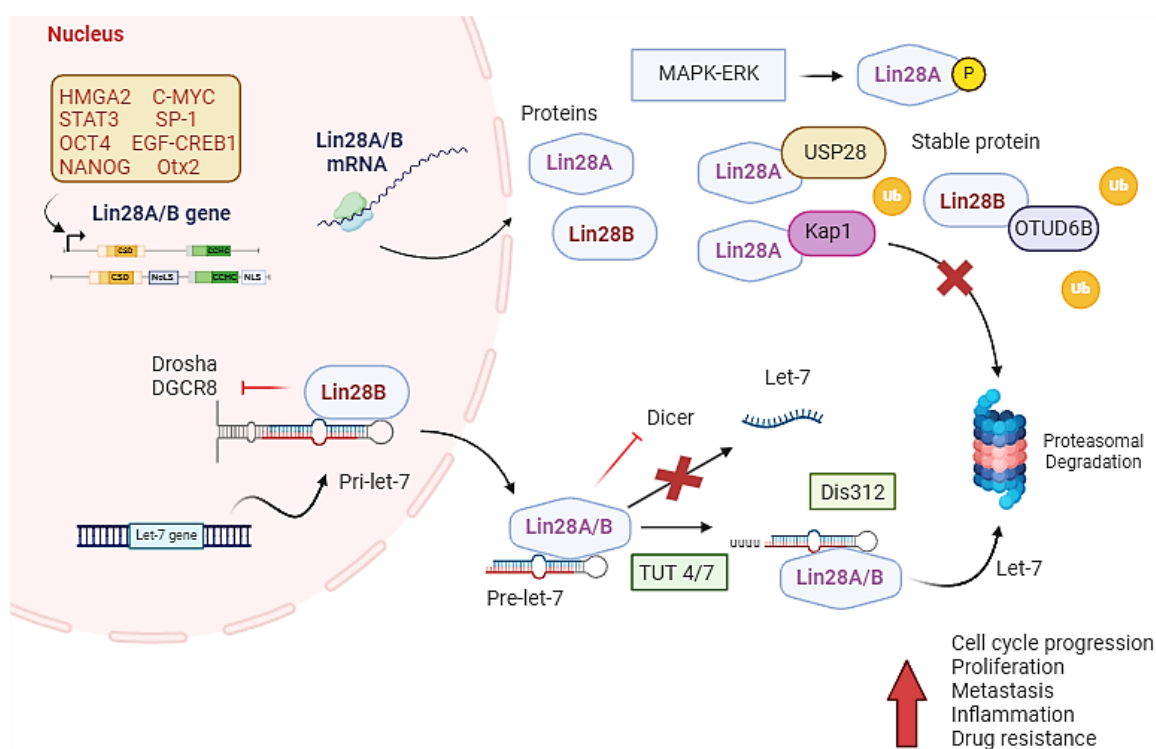


Figura 13| Mecanismos que promueven la expresión y estabilidad de Lin28A/B. Regulación negativa del procesamiento Let-7 por Lin28A/B y mecanismos de regulación positiva de Lin28A/B (Cotino-Nájera et al., 2024).

3. Resveratrol

El resveratrol (3,4', 5-trihidroxiestilbeno) es un compuesto polifenólico de origen natural, denominado estilbeno por su cantidad de anillos y los elementos estructurales que están unidos a éstos. Es una fitoalexina reportada en 72 especies diferentes de plantas, especialmente moras, arándanos y algunas leguminosas, así como en cacahuates, soya, uvas rojas (epidermis de hoja y piel del fruto) y por lo tanto en el vino (Catalgol et al., 2012; Xiong et al., 2017).

Su estructura cuenta con dos anillos aromáticos unidos por un doble enlace de metileno y tres grupos hidroxilo. La distribución de los carboxilos y su posición es la que confiere su actividad biológica. Existen dos formas isoméricas: *cis*-resveratrol y *trans*-resveratrol (Figura 14), siendo la forma *trans* la más estable y potente (Catalgol et al., 2012).

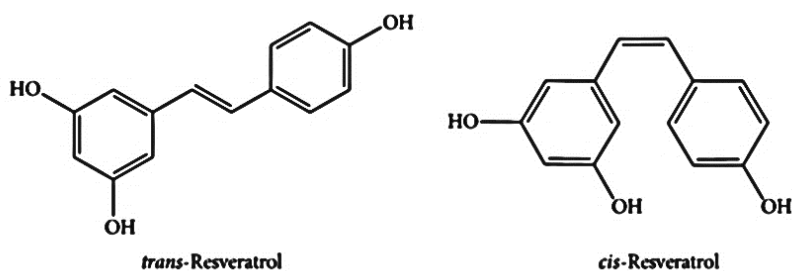


Figura 14 | Estructura química de *trans*-resveratrol y *cis*-resveratrol.

El resveratrol puede inhibir la progresión de varias enfermedades como las metabólicas, cardiovasculares, neurodegenerativas y carcinogénicas, puesto que tiene capacidad antimicrobiana, regula el transporte del colesterol, reduce la hipercolesterolemia, evita el envejecimiento, regula negativamente el ciclo celular, es anti-isquémico, antioxidante, anti-inflamatorio, anti-proliferativo, pro-apoptótico, quimio-preventivo, anti-metastásico y ayuda a mejorar el sistema inmune (Catalgol et al., 2012; Gresele et al., 2011; Taylor et al., 2014); también se han descrito propiedades analgésicas. A su vez, el resveratrol

puede reducir lesiones en órganos como el riñón, médula espinal, hígado, pulmones, intestino y colon (Baur & Sinclair, 2006).

Para efectos de este trabajo el enfoque estará centrado en los procesos carcinogénicos y la intervención del resveratrol en ellos.

3.1 El papel del resveratrol en cáncer

Actualmente, existe un gran interés en el uso de compuestos naturales como posibles agentes anti-cancerígenos debido a las grandes ventajas que presentan como la disponibilidad inmediata, baja toxicidad, bajo costo, entre otros. Uno de los productos naturales y actualmente uno de los más estudiados es el resveratrol. Este compuesto se ha vuelto muy popular debido a su potencial contra el cáncer, reportado por primera vez en 1997 (Jang et al., 1997). Desde entonces, los investigadores han prestado atención a este compuesto debido a su prometedor papel en la inhibición de la inflamación y la carcinogénesis (Baur & Sinclair, 2006). El resveratrol puede fungir como un agente pleiotrópico que actúa sobre múltiples objetivos y vías de señalización alteradas en las células cancerosas, con una toxicidad limitada hacia las células normales. Además, el resveratrol contribuye a reducir el daño causado por el estrés oxidativo, que incluye la lesión del ADN, la oxidación de proteínas y la peroxidación de lípidos, al mismo tiempo que potencia la vigilancia del sistema inmunológico (Varoni et al., 2016). Por otro lado, el resveratrol interfiere en el proceso de conversión de pro-carcinógenos a carcinógenos al inhibir la enzima hepática citocromo mono-oxigenasa P450 isoenzima CYP1A1, que es responsable del metabolismo de xenobióticos (Diaz et al., 2016). Además, promueve la actividad antitumoral al inhibir la angiogénesis y la proliferación (Baur & Sinclair, 2006; Catalgol et al., 2012). Respecto a esto, es importante la interacción del resveratrol con enzimas de replicación como la DNA polimerasa α y la ribonucleótido reductasa.

Por otro lado, la angiogénesis es dependiente de moléculas secretadas por las células tumorales al tejido huésped normal circundante, tales como TNF, TGF α , VEGF, IL-8, PDEG,

β FGF, entre otras, que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos. De estas moléculas, VEGF y β FGF parecen ser las más importantes para mantener el crecimiento tumoral y son producidas por muchos tipos de células cancerosas (BRÅKENHIELM et al., 2001). Otro factor importante es el factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α); éste y VEGF están sobre expresados en varios tumores humanos, asociados siempre a peor pronóstico y un fenotipo tumoral más agresivo. Se ha informado que el resveratrol suprime la expresión de VEGF y de HIF- 1α en células humanas de cáncer de ovario al inhibir la activación de las vías de señalización PI3K / Akt y MAPK; así como a los factores y marcadores de angiogénesis como EGFR o FGF-2 (Ko et al., 2017).

En varios reportes se muestra que el resveratrol induce la apoptosis en diversos tipos de células cancerosas y se ha documentado que el resveratrol no tiene ningún efecto apoptótico en las células sanas (Hasegawa et al., 2001; TINHOFER et al., 2001). Este compuesto polifenólico induce apoptosis por diferentes vías; por ejemplo, puede activar las vías de los receptores de muerte Fas y TNF (vía extrínseca) (Delmas et al., 2003). Asimismo, el resveratrol favorece la liberación del citocromo c, que activa a las caspasas y, en consecuencia, conduce a apoptosis (por vía intrínseca). El resveratrol también puede inhibir gradualmente la expresión de la oncoproteína Bcl-2, que es antiapoptótica y favorecer la expresión de Bax, que es proapoptótica, así como de p53 (Ko et al., 2017; TINHOFER et al., 2001). De igual manera, en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que el tratamiento con resveratrol (150-250 μ mol/l) induce apoptosis en las líneas celulares de cáncer (C33A, HeLa, SiHa) y particularmente en las células CaSki. Además, observamos un aumento en la detención del ciclo celular en la fase G1 en estas líneas celulares (García-Zepeda et al., 2013).

Del mismo modo, el resveratrol inhibe ciclinas y CDKs bloqueando el ciclo celular a diferentes niveles. La inhibición de ciclina D1/CDK4 por el resveratrol provoca el arresto del ciclo celular en la fase G0 / G1; y la inhibición de la ciclina A y E por resveratrol, arresta al ciclo celular en las fases S / G2 (Ko et al., 2017).

Otro estudio reveló que al tratar con resveratrol a las líneas celulares cancerosas MCF-7 (mama) y DU-145 (próstata) se inhibe la expresión de la CDK4 y la ciclina D1, lo que

se ha relacionado con la detención del ciclo celular y con la inducción de p21 y p53 (Ko et al., 2017). De manera similar, en nuestro grupo de trabajo Medina-Aguilar R y colaboradores en el 2016, encontraron que el resveratrol alteraba la transición de fase G1/S en las células MDA-MB-231 y MCF-7 al inhibir las quinasas AURKA y PLK1 (Medina-Aguilar et al., 2016).

Además, en otro estudio realizado en nuestro laboratorio, se demostró que el resveratrol es efectivo para sensibilizar a las células madre de cáncer (CSC) cervical HeLa y MCF-7 (cáncer de mama) debido a la inhibición de RAD51 (una recombinasa involucrada en la reparación del ADN por recombinación homóloga). Las CSC se asocian con un fenotipo de cáncer más agresivo y resistencia al tratamiento en una variedad de tumores incluyendo ovario, próstata, cáncer colorrectal y gliomas malignos. El resveratrol promueve el arresto del ciclo celular en fase S y aumenta la apoptosis de las CSC. Lo anterior apoya al resveratrol como un agente novedoso para tratar el cáncer (Leon-Galicia et al., 2013; Ruíz et al., 2018).

Por otro lado, lo ideal en el uso terapéutico del resveratrol es emplearlo a la concentración más baja posible; sin embargo, se ha observado que el resveratrol tiene un comportamiento bifásico cuando se utiliza a concentraciones bajas y altas (Jaisamut et al., 2021; Jodynis-Liebert & Kujawska, 2020). Este comportamiento no sólo se da a nivel general, existiendo mayor proliferación celular a bajas concentraciones e inhibición del crecimiento y un aumento en apoptosis a altas concentraciones. El comportamiento bifásico, también conocido como hormesis, es un fenómeno de respuesta a dosis, que también puede afectar los niveles de la expresión de un gen en particular (N. Li et al., 2017; Safaeinejad et al., 2018; Song et al., 2019).

Se han documentado en múltiples estudios los efectos anticancerígenos del compuesto natural resveratrol, así como las vías de señalización celular a las que se dirige en diferentes tipos de cáncer (*Figura 15*) (Farooqi et al., 2018; B. Ren et al., 2021). Sin embargo, no se había evaluado el efecto de este compuesto en la expresión del oncogén Lin28A.

Figura 15| Esquema que ilustra las diversas rutas de señalización blanco del resveratrol en el tratamiento del cáncer. (I) El resveratrol disminuye la expresión de β -catenina y bloquea su translocación al núcleo al interferir con el largo ARN no codificante MALAT1; (II) suprime la transición epitelial-mesenquimatosa (EMT) provocada por TGF- β /Smad y el factor de transcripción Snail; (III) reduce la activación de IKK α /p65 mediada por IKK, lo que resulta en la inhibición de la proliferación de células cancerosas a través de la desactivación de NF- κ B (p50/p65); (IV) inhibe la acumulación nuclear de FOXO3a provocada por p-PI3K/p-AKT; (V) suprime la fosforilación de Src-STAT3 e induce la apoptosis en células cancerosas; (VI) inhibe la activación de HIF-1 α mediada por AKT/MAPK y acelera su degradación a través de la ubiquitinación (B. Ren et al., 2021).

4. Antecedentes directos

En nuestro grupo de trabajo se ha evaluado el efecto que tiene el compuesto natural resveratrol en la inhibición de Lin28A. Encontramos una disminución en los niveles del mRNA de Lin28A por el tratamiento con resveratrol a partir de una concentración de 25 μ M en la línea celular de cáncer testicular NCCIT (*Figura 16A*). Sin embargo, la proteína Lin28A mantiene una expresión alta a concentraciones de resveratrol de 25, 50 y 100 μ M, hasta llegar a una concentración de 150 μ M donde se observa una disminución de Lin28A (*Figura 16B*) (Arenas, A. M., 2018).

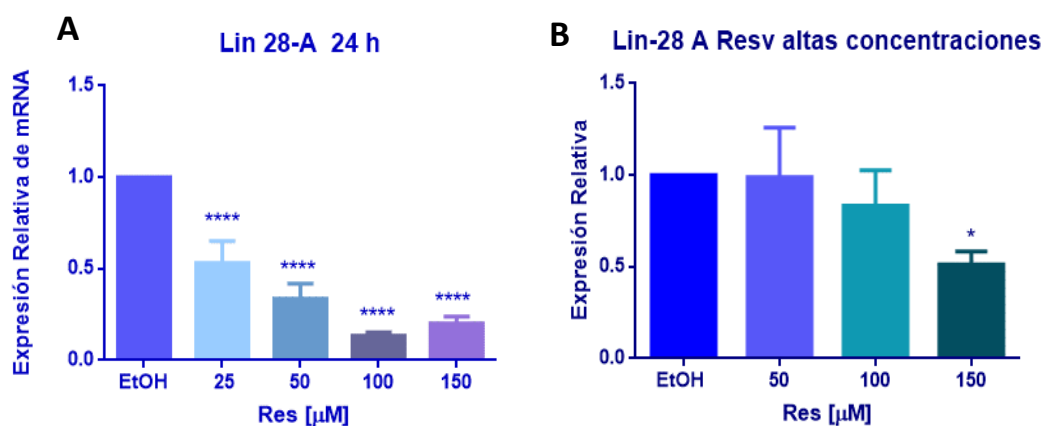


Figura 16| El Resveratrol disminuye significativamente la expresión del mRNA de Lin28A en las células NCCIT. (A) Gráfica que ilustra la expresión relativa del mRNA de Lin28A a las 24 horas en respuesta a diferentes concentraciones de resveratrol (25, 50, 100 y 150 μ M). (B) Gráfica que presenta la expresión relativa de la proteína Lin28A a las 24 horas, también en función de diferentes concentraciones de resveratrol (50, 100 y 150 μ M). Ambos evaluados en células NCCIT (Arenas, A. M., 2018).

Basándonos en datos anteriores, correspondientes a mi maestría en nuestro grupo de trabajo se evaluó la expresión de la proteína de Lin28A en células NCCIT tratadas con 150 μ M de resveratrol en tiempos largos (24, 48, 72 y 96 hrs.) (Figura 17) (Cotino-Nájera, 2020). En la figura 17B, se muestra como la exposición a una concentración de 150 μ M de resveratrol a tiempos prolongados promueve la disminución de los niveles de la proteína de Lin28A en células NCCIT, e interesantemente se observa que a las 96 horas de tratamiento ésta desaparece por completo (Cotino-Nájera, 2020).

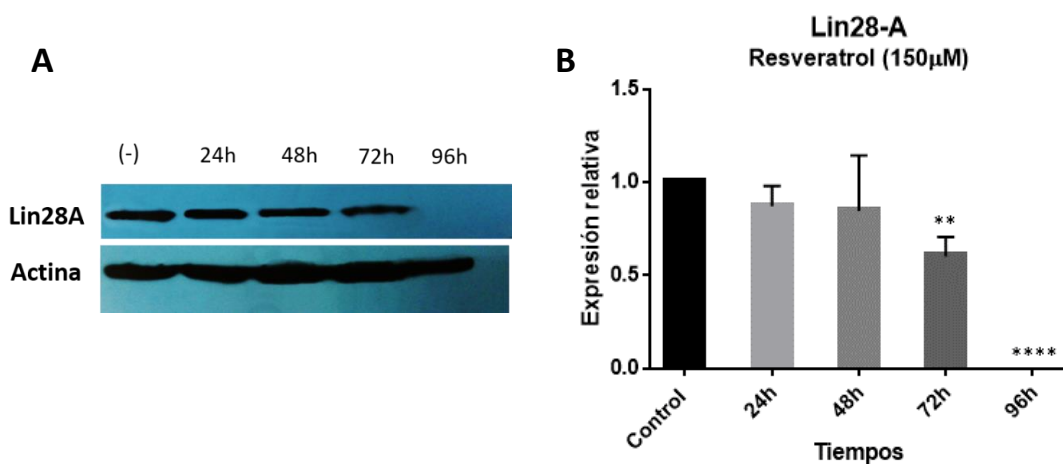


Figura 17 | La exposición a una concentración de 150 μ M de resveratrol a tiempos prolongados disminuye el nivel de proteína de Lin28A en células NCCIT. A) Western Blot representativo del tratamiento con resveratrol (150 μ M) a tiempos largos (24, 48, 72 y 96h). PM de Actina: 43 kDa y Lin28: 28 kDa. B) Gráfica de densitometría. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos distintos \pm DS. * representa cambio significativo obtenido por análisis t-student (*= p <0.05, **= p <0.01, ***= p <0.001, ****= p <0.0001) (Cotino-Nájera, 2020).

Además, con el fin de saber si la proteína de USP28 también se veía afectada con el tratamiento de resveratrol se evaluaron los niveles de USP28 en la línea celular NCCIT en las mismas muestras utilizadas para medir los niveles de Lin28A en los periodos de tiempo largos y se observó también una disminución de los niveles de la proteína USP28 (Figura 18).

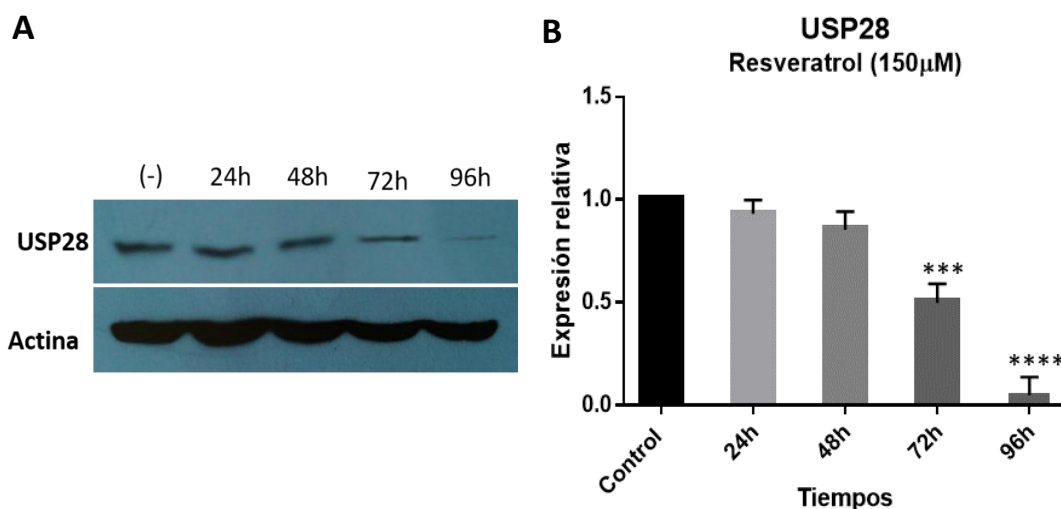


Figura 18 | La exposición a una concentración de 150 μM de resveratrol a tiempos prolongados disminuye a la proteína USP28 en células NCCIT. A) Western Blot representativo del tratamiento con resveratrol (150 μM) a tiempos largos (24, 48, 72 y 96h). PM de USP28: 140 kDa y 43 kDa de Actina. B) Gráfica de densitometría. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos distintos \pm DS. * representa cambio significativo obtenido por análisis t-student (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, ****= $p < 0.0001$) (Cotino-Nájera, 2020).

La disminución en los niveles de la proteína USP28 en la línea celular NCCIT tratada con resveratrol, podría explicar la desestabilización y degradación de Lin28A, de acuerdo con lo reportado por Haq *et al*; 2018. Sin embargo, experimentos adicionales son necesarios para comprobar que efectivamente este es el mecanismo de regulación de Lin28A por el resveratrol. Por ello en este trabajo, nos enfocamos en dilucidar los mecanismos por los cuales el resveratrol regula negativamente a la proteína Lin28A en la línea celular de cáncer testicular NCCIT.

5. Pregunta de investigación

- ¿De qué manera el resveratrol regula la expresión de la oncoproteína Lin28A en células de cáncer testicular NCCIT?

6. Justificación

Lin28A es una proteína de unión al RNA y el principal regulador negativo del miRNA supresor de tumor Let-7. Lin28A generalmente se encuentra altamente sobre expresado en diferentes tumores malignos humanos y está implicado en promover la proliferación y metástasis. Se ha encontrado altamente expresado en la línea celular de cáncer testicular (NCCIT). Interesantemente se ha visto que la proteína Lin28A es estabilizada por diferentes mecanismos. En el estudio realizado por Haq y colaboradores en el 2018, se demostró que la proteína Lin28A se ubiquitina, desestabiliza y degrada por la vía proteasomal 26S e informaron que la enzima desubiquitinasa USP28 (proteasa 28 específica de ubiquitina), revierte la ubiquitinación de Lin28A, estabilizándola. Otro mecanismo que estabiliza a la proteína Lin28A fue descrito por Tsanov y colaboradores; ellos comprobaron que la fosforilación en S200 de Lin28A inducida por la activación de ERK ½ una cinasa que forma parte de la ruta de las MAPK (de las siglas en inglés Mitogen-Activated Protein Kinases, o proteínas cinasas activadas por mitógenos), mejora la estabilidad de la proteína de Lin28A. Estos mecanismos de estabilización de la oncoproteína Lin28A, aumentan la viabilidad de las células cancerosas, la resistencia a quimio y radioterapia, la migración y en última instancia, aumenta la progresión del tumor. Por otro lado, en nuestro grupo de trabajo se ha evaluado el efecto del resveratrol a diferentes concentraciones sobre la expresión de Lin28A. De manera interesante, encontramos que los niveles del mRNA de Lin28A disminuyen por el tratamiento con resveratrol a partir de una concentración de 50 μ M en la línea celular NCCIT, mientras que la proteína Lin28A se mantiene estable a 25, 50 y 100 μ M, hasta llegar a una concentración de 150 μ M donde Lin28A pierde su estabilidad. De igual forma se demostró

que la exposición a una concentración de 150 μM de resveratrol a tiempos prolongados también disminuye el nivel de la proteína USP28 en células NCCIT. Lo anterior da lugar a suponer que la disminución de USP28 podría ser un mecanismo por el cual el resveratrol disminuye la estabilidad de Lin28A. Por ello, en este trabajo de investigación se realizaron experimentos para comprobar que efectivamente éste último es uno de los mecanismos de regulación negativa de Lin28A por el resveratrol. Por otra parte, también se evaluó si el resveratrol afecta de manera simultánea a la vía de las MAPK, esto en relación al estudio de Azad Saei y col. en el 2018, donde demuestran como la pérdida de USP28 mejora la actividad de la vía MAPK a través de la estabilización de miembros de la familia RAF, promoviendo un incremento en la activación de pERK. Derivado de esto, y retomando que mi trabajo de maestría anterior, observamos la degradación de Lin28A con el tratamiento de resveratrol, se hipotetizó que se están afectando ambas vías de estabilización de Lin28A. Este trabajo de investigación analiza los mecanismos posibles que lleva a cabo el resveratrol para disminuir los niveles de expresión del oncogén Lin28A en la línea celular de cáncer NCCIT. Lo anterior incrementaría la importancia tanto de USP28 como un blanco terapéutico en cáncer como la importancia del compuesto natural resveratrol como un tratamiento complementario al habitual en pacientes con cáncer.

7. Hipótesis

El compuesto natural resveratrol disminuye el nivel de la proteína Lin28A a través de la inhibición de la desubiquitinasa USP28 y evitando la fosforilación de la proteína Lin28A por la vía de las MAPK en la línea celular de cáncer testicular NCCIT.

8. Objetivos

General

- I. Determinar los mecanismos por los cuales el resveratrol regula negativamente a la proteína Lin28A en la línea celular de cáncer testicular NCCIT.

Específicos

- 1) Evaluar la expresión del mRNA de USP28, con el fin de conocer si está siendo degradado a nivel transcripcional por el tratamiento con resveratrol.
- 2) Demostrar por medio de MG132 si la proteína de Lin28A está siendo degradada por vía proteasomal con el tratamiento de resveratrol.
- 3) Evaluar la expresión de los mRNAs de SP-1 y STAT3, para saber si están siendo afectados por el tratamiento con resvetratrol.
- 4) Silenciar la expresión de USP28 para comprobar si la degradación de Lin28A es totalmente dependiente de esta proteína y determinar si el resveratrol disminuye la expresión de Lin28A en menor tiempo o a menor concentración, cuando hay un silenciamiento previo de USP28.
- 5) Comprobar si disminuye la activación de la vía de las MAPK, evaluando la fosforilación en S200 de Lin28A en las células (NCCIT) tratadas con resveratrol.
- 6) Evaluar la expresión de la proteína de Lin28A en células tratadas con el inhibidor de la vía de las MAPK, los siRNAs vs. USP28, la combinación de ambos inhibidores y el tratamiento con resveratrol por sí solo. Con el fin de conocer la cinética de degradación de la proteína de Lin28A con los diferentes tratamientos utilizando Cicloheximida.
- 7) Comprobar el efecto del resveratrol sobre Lin28A y USP28 en otro modelo celular, para demostrar que es un efecto general del resveratrol.

- 8) Describir los mecanismos de regulación negativa de la proteína Lin28A generados por el tratamiento con el compuesto natural resveratrol.

9. Diseño experimental

Tipo de estudio: Experimental

Modelo experimental in vitro.

1) Criterios de selección del sistema de estudio

Cultivo de líneas celulares

En este trabajo se utilizó la línea celular de carcinoma embrionario pluripotente (teratocarcinoma testicular): NCCIT (ATCC# CRL-2073), mantenida en medio RPMI 1640 (Biowest®) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % (v/v) y 1000 µL de antibiótico por cada 100 mL de medio en cajas adherentes a 37°C con 5% de CO₂.

La segunda línea celular a utilizada para verificar el efecto del resveratrol contra Lin28A y USP28 fue la T47D de carcinoma humano de mama (ATCC# HTB-133), mantenida en medio DMEM (Biowest®) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10 % (v/v) y 1000 µL de antibiótico por cada 100 mL de medio en cajas adherentes a 37°C con 5% de CO₂.

2) Variables

Exposición:

- a) Tratamiento con resveratrol
- b) Tratamiento con MG132 (inhibidor de vía proteosomal)
- c) Tratamiento con inhibidor de USP28 (siRNA)
- d) Tratamiento con inhibidor de la vía de las MAPK

Respuesta:

- a) Expresión del mRNA de USP28

- b) Expresión de la proteína de Lin28A (PM: 28 KDa)
- c) Expresión de la proteína de USP28 (PM: 140 KDa)
- d) Expresión de Lin28A fosforilada (pLin28A) en Serina 200
- e) Expresión del mRNA de SP1 y STAT3

Modificadoras de efecto:

- a) Duración del tratamiento
- b) Uso de una línea celular diferente

3) Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos de los resultados se llevaron a cabo utilizando GraphPad Prism (Versión 8; GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). El análisis estadístico se realizó con análisis de varianza (ANOVA) y método de prueba t-Student. Los resultados se expresaron con media \pm error estándar. Los valores de p * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$ denotaron diferencias estadísticamente significativas.

Materiales y métodos:

Tratamientos con Resveratrol

Las células NCCIT se sometieron a tratamiento con Resveratrol (Sigma-Aldrich®) (n.º de catálogo R5010-100 mg; Merck KGaA) suspendido en etanol absoluto (vehículo). Por 24, 48, 72 y 96 horas a diferentes concentraciones: 25, 50, 100 y 150 μ M.

Tratamientos con MG132

Se administró tratamiento con el inhibidor del proteosomal MG132, 5 μ M (Sigma-Aldrich®) (Merck KGaA) (n.º de catálogo M8699) al cumplir las 0, 48 y 96 horas de tratamiento sin y con Resveratrol (150 μ M).

Transfecciones con siRNAs vs USP28

Las células se transfectaron con RNAs de interferencia pequeños contra USP28 (siRNA; n.º de catálogo 4392420-s33508; s33509 y s33510) o control negativo selecto de siRNA (n.º de catálogo 4390843); todos de Ambion® (Thermo fisher Scientific, EE. UU.). En una concentración de 2 µM en células NCCIT utilizando Lipofectamine® 3000 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), según el protocolo del fabricante.

Tratamientos con inhibidor de la vía de las MAPK/ERK

El Inhibidor de MAPK/ERK: PD0325901 se adquirió de Sigma-Aldrich (Merck KGaA) (n.º de catálogo PZ0162) y se resuspendió en DMSO. Se dio tratamiento con 1, 2, 5, 7.5 y 10 µM del inhibidor para el ensayo de MTT y se eligieron las dosis de 5 y 7.5 µM para los experimentos posteriores, los cuales fueron realizados en diferentes periodos de tiempo (24, 48, 72 y 96 horas).

Ensayo de proliferación celular (MTT)

La línea celular NCCIT fue sembrada en placas de 24 pozos a una densidad de 8×10^4 células por pozo 24 horas antes de su tratamiento. Posteriormente, se trataron con concentraciones de 0, 25, 50, 100, 130, 150 y 200 µM/ml de Resveratrol (Sigma-Aldrich®) disuelto en etanol, utilizándose como control etanol al 0.3% durante 48 horas. O diferentes concentraciones del inhibidor/ERK (PD0325901) (0, 1, 2, 5, 7,5 y 10 µM) durante 48 horas utilizando como control células tratadas con DMSO. Al final del período de tratamiento, las células se incubaron con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich®) (0,5 mg/mL) durante 30 mín. Se eliminó el medio y los cristales de colorante de formazán sintetizados se solubilizaron con 500 µl de isopropanol ácido y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm (lector de microplacas de absorbancia Sunrise de Tecan, Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza). El porcentaje de crecimiento se calculó utilizando el número de células del control con vehículo como 100% y se determinó la IC50 por interpolación usando el programa GraphPad Prism 5. Se realizaron tres experimentos independientes en tres pocillos por duplicado.

Tratamientos con Cicloheximida

Se sometieron las células de igual forma a tratamiento con Cicloheximida- CHX, 100µg/ml (Sigma-Aldrich®) (n.º de catálogo 01810) por 3, 6, 9, 15, 18 y 24 horas. Esta fue incluida a la par que los otros tratamientos (siRNAs vs USP28, Inhibidor de MAPK/ERK y Resveratrol).

Extracción de RNA (*Trizol*)

1. En condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar vertical) se retiró el medio a las células en cultivo y se lavarán con 1 mL de PBS.
2. Se retiró el PBS y se adicionaron 500 µL de Trizol.
3. Se cosecharon y colocaron las células en tubos Eppendorf y se agitaron con vórtex suave.
4. Se colocaron en hielo y agregaron 200 µL de cloroformo y se mezcló por inversión.
5. Se centrifugaron por 15 min. a 14,000 rpm (4°C).
6. Se recuperó el sobrenadante (RNA).
7. Se adicionaron 500 µL de isopropanol y se dejaron reposar 15 min a -20°C.
8. Se centrifugaron por 15 min. a 14,000 rpm (4°C).
9. Se decantó el sobrenadante y se agregó 1 mL de EtOH 70%.
10. Se centrifugaron nuevamente por 5 min. a 15,000 rpm (4°C).
11. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla.
12. Se resuspendió la pastilla en 30 µL de agua DEPC y se guardó (a – 70°C) o se continuo con el protocolo.
13. Se agrego 1 µL de DNAsa I libre de RNAsa + 3 µL de Buffer.
14. Se incubaron por 30 min. a 37°C y después 10 min. a 70°C.
15. Finalmente se almacenaron a – 70°C, hasta su uso posterior.
16. La cuantificación y determinación de la integridad del RNA mediante análisis en gel de agarosa y se cuantificó utilizando un instrumento NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop One/One, Waltham, MA, EE. UU.).

Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Se utilizó el Kit First Strand cDNA (Thermo Scientific®). Una vez cuantificado el RNA se tomaron 3µg/µL y se le añadió 1 µL de Oligo DT, esto se llevó a un volumen final de 11 µL utilizando agua libre de nucleasas (Se incubo el mix por 5 min. a 65°C).

En seguida, se realizó otro mix(2) que contenía lo siguiente:

- Buffer de reacción 5X: 4 µL
- Robolock: 1 µL
- dNTP mix: 2 µL
- Retrotranscriptasa: 2 µL

El mix 2 fue agregado a cada tubo de reacción y se incubo por 1 hora a 37°C. Una vez culminado el tiempo se incubo por 5 min. a 70°C.

Cabe mencionar que los datos descritos aquí son para una sola reacción o muestra, por lo que se realizaron los respectivos cálculos para cada caso.

PCR en tiempo real

La RT-PCR en tiempo real se realizó utilizando iTaq Universal SYBR® Green Supermix (Bio-RAD, Laboratories, Inc.) en un instrumento 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EE. UU.). La especificidad de cada PCR se examinó mediante los perfiles de temperatura de disociación de los productos finales. Las reacciones se realizaron por triplicado y las cantidades relativas de genes se normalizaron utilizando microglobulina beta-2 (β2M) como control endógeno. Los datos relativos de expresión génica se analizaron mediante el método Ct comparativo (método 2 – ΔΔCt) descrito por Livak et al, 2001 (Livak & Schmittgen, 2001). Primers prediseñados: Lin28A, USP28, SP1, STAT3 y β2M se adquirieron de Integrated DNA Technologies (IDT, Skokie, IL, EE. UU.), y las secuencias directas e inversas se presentan en la Tabla 1.

Condiciones de amplificación:

- 1 ciclo de 10 min. a 95°C - 1 ciclo de 30 segundos a 60°C -1 ciclo de 30 segundos a 72°C
- 40 ciclos de 15 segundos a 95°C - 1 min. a 60°C.

Tabla 1. Secuencias de los primers utilizados para PCR cuantitativa en tiempo real.

NOMBRE DEL GEN	SECUENCIA 5' → 3'
LIN28A-F	CATCTGTAAGTGGTTCAACGTG
LIN28A-R	CCCTTCCATGTGCAGCTTA
USP28-F	TGGCCAGGCTGATCTCTAACTC
USP28-R	GAAGGCCGGGTACGATGA
SP1-F	GCCACCAACTCCTTTTTCAATT
SP1-R	GCACCCCCTTGAGCTTGT
STAT3-F	TTTTAGCAGGATGGCCCAAT
STAT3-R	GCCGCATATGCCCAATCT
B2M-F	GGACTGGTCTTTCTATCTCTTGT
B2M-R	ACCTCCATGATGCTGCTTAC

Extracción de Proteínas por el método de RIPA

1. En condiciones estériles (bajo una campana de flujo laminar vertical), se retiró el medio de cultivo de las células y se lavaron con 1 mL de PBS frío.
2. Después de eliminar el PBS, se agregó nuevamente 1 mL de PBS frío para desprender las células mecánicamente de la caja.
3. La suspensión de células en PBS se transfirió a microtubos de 1.5 mL previamente etiquetados.
4. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min. a 4 °C.
5. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 300 µL de Buffer RIPA, previamente complementado con inhibidores de proteasas (40 µL de solución completa por cada mL de Buffer RIPA).
6. Las muestras se incubaron en hielo durante 30 min., agitando a máximo cada 10 min.

7. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 5 min. a 4 °C.
8. Se recuperó el sobrenadante (fracción proteica) y se realizaron alícuotas de 25 µL cada una, que se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

Gel de integridad de Proteínas

Se realizaron geles delgados (1mm) al 15 % preparados de la siguiente manera: **Para la proteína de Lin28A y pLin28A**

Gel separador

Buffer L (pH 8.8) → 0.9 µL

H₂O bidestilada y estéril → 1.35 µL

Solución N (Acrilamida) → 2.25 µL

Temed → 8 µL

APS → 120 µL

Buffer L (pH: 8.8) Tris Base → 1.5 M SDS → 0.4% H ₂ O → 100 mL
--

Gel concentrador

Buffer M (pH 6.8) → 0.2 µL

H₂O bidestilada y estéril → 1.5 µL

Solución N (Acrilamida) 30% → 0.3 µL

Temed → 3.5 µL

APS 10% → 60 µL

Buffer M (pH: 6.8) Tris Base → 0.5 M SDS → 0.4% H ₂ O → 100 mL
--

Se realizaron geles delgados (1mm) al 10 % preparado de la siguiente forma: **Para la proteína de USP28**

Gel separador

Buffer L (pH 8.8) → 0.9 µL

H₂O bidestilada y estéril → 2.1 μL

Solución N (Acrilamida) 30% → 1.5 μL

Temed → 4 μL

APS 10% → 70 μL

Gel concentrador (preparado similar que el anterior).

Las muestras se prepararon de la siguiente forma:

En microtubos de 0.6 mL se mezclaron 10 μL de proteína (10μg) + 2 μL de buffer de carga (azul de bromofenol) 5X. Se homogenizaron completamente y se pusieron a hervir durante 5 min. Una vez culminado el tiempo, se cargaron los pozos con las muestras y se colocó en el carril No. 1 el marcador de peso molecular 3.5 μL + 2 μL de buffer de carga 5X.

Usando el buffer de corrida (tris-base/glicina/SDS). Se dejó correr el gel (2 mA o 100 volts) hasta que el frente de corrida llegara al final del gel.

Tinción de azul de Coomassie

1. Al terminar la corrida se colocó el gel en un recipiente.
2. Se fijaron las proteínas con solución fijadora durante 5 min. Para evitar la dispersión de las proteínas antes de la tinción.
3. Se recuperó en un tubo la solución fijadora.
4. Se tiñó el gel con azul de Coomassie 4 min.
5. Una vez transcurrido el tiempo, se recuperó el Coomassie y se lavó el gel con solución fijadora (Esto para que se destiñera más rápido).
6. Se quitó la solución y se agregó solución desteñidora hasta que el gel quedara transparente y únicamente se observaran las proteínas marcadas (12 horas).

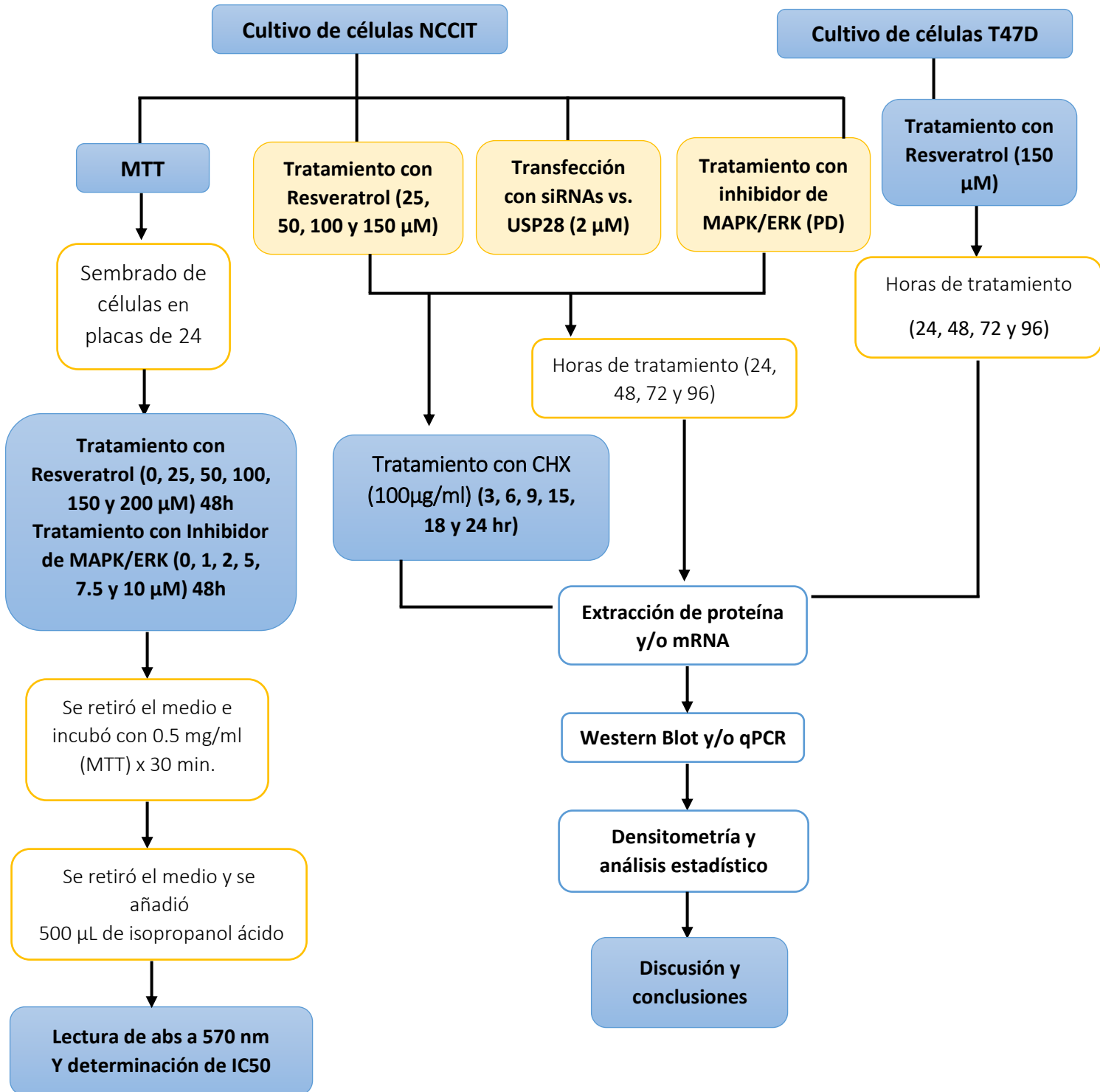
Gracias a este gel se logró observar la cantidad de proteína de cada muestra y la limpieza de las muestras (libres de DNA).

Western Blot

1. Se realizó y cargo el gel de acuerdo a la proteína a analizar, como se describió anteriormente.
2. El gel se corrió a 100 volts usando buffer de corrida (tris base-glicina-SDS). Se dejó correr hasta que la proteína deseada pudiese visualizarse de manera correcta.
3. La electrotransferencia a la membrana de nitrocelulosa se realizó a 100 V durante 1 hora (geles para visualizar a Lin28A) o 1 hora y 30 min. (geles para visualizar USP28) a 4°C usando buffer de transferencia (tris-base/glicina/metanol).
4. Una vez terminada la transferencia, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau durante 3-5 minutos para verificar la calidad de transferencia de las proteínas.
5. Posteriormente se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos de la membrana, con una solución de leche al 5% durante 1 hora con agitación (Para el caso de pLin28A se bloqueó la membrana con 5% de albumina).
6. Al terminar el bloqueo se realizaron 2 lavados con PBS 1X a la membrana durante 3 min. (Para el caso de pLin28A los lavados se hicieron con TBS 1X con 0.05% de Tween).
7. Tras esos lavados se dejó incubando la membrana con el anticuerpo Lin28A Monoclonal Antibody HRP conjugate (MA1-016-HRP) Thermo Scientific® (Dilución 1:750) durante 18 H o en su caso con el anticuerpo HRP policlonal anti-USP28 (orb480432) Biorbyt® (Dilución 1:1000) o con el anticuerpo policlonal anti-fosfo-Lin28A (Ser200) (PA5-105696) Thermo Scientific® (Dilución 1:1000).
8. La cicloheximida se adquirió de Sigma-Aldrich (Merck KGaA) (n.º de catálogo 01810).
9. Al terminar la incubación se realizaron 3 lavados de 10 min. con PBS 1X-Tween para eliminar los restos de anticuerpo.
 - Para el caso de pLin28A se incubo 1 hora la membrana con anticuerpo secundario IgG-anti-conejo (sc-2357) Santa Cruz Biotechnology® (Dilución 1:20,000).

10. Se incubó la membrana con luminol por 5 min. y se revelaron las proteínas en placas fotográficas con 3-5 min. de exposición ó 10-20 min. según el caso (en completa oscuridad).
11. Para la obtención del control de carga (Actina) se lavó la membrana y se dejó incubando con el anticuerpo Monoclonal Anti- β -Actin-Peroxidase antibody (A3854) Sigma® durante 1 hora a temperatura ambiente.
12. Se realizaron 3 lavados de 10 min c/u con PBS 1X-Tween o TBS 1X-Tween (Según el caso).
13. Se agregó luminol, se incubo por 5 min. para su posterior revelación.

10. Diagrama de trabajo



Nota: A partir de este momento nos referiremos al resveratrol con la siguiente abreviatura RSV.

11. Resultados

11.1 RSV disminuye la viabilidad celular de las células NCCIT.

Para investigar el efecto de dosis crecientes de RSV (25 a 200 μM) sobre la proliferación de la línea celular de teratocarcinoma testicular (NCCIT), se realizaron ensayos de MTT. Observamos que el tratamiento con RSV tuvo un efecto inhibitor dependiente de la dosis sobre la viabilidad de las células NCCIT (*Figura 19*). Encontramos que la IC₅₀ del RSV es 148 μM en la línea celular NCCIT. Luego de este resultado, se decidió trabajar únicamente con dosis de 25 a 150 μM de RSV.

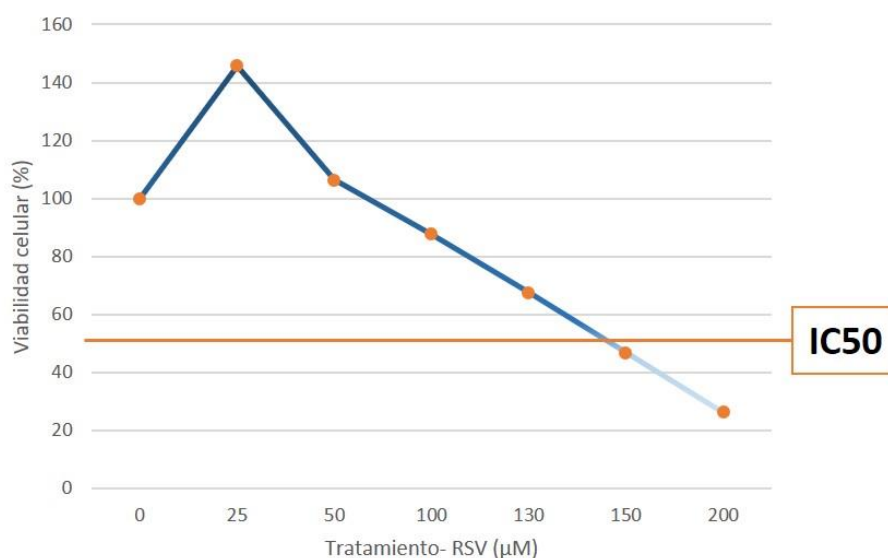


Figura 19 | Ensayo MTT con RSV para determinar IC₅₀. Las células NCCIT se trataron con diferentes concentraciones de RSV (25, 50, 100, 130, 150 y 200 μM) durante 48 h. La viabilidad celular se probó con el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Cada punto de datos es el promedio de tres experimentos independientes \pm DE. La IC₅₀ calculada de RSV en NCCIT fue de **148 μM** .

11.2 RSV disminuye la expresión de mRNA de Lin28A en células NCCIT.

Para evaluar el efecto del RSV en la expresión del mRNA de Lin28A en NCCIT, se realizó RT-qPCR (Figura 20). Observamos que la concentración más baja de RSV (25 μ M) aumenta los niveles de mRNA de Lin28A. Aun así, a medida que aumenta la concentración de RSV, la expresión del mRNA de Lin28A disminuye significativamente. Por lo tanto, los resultados muestran que RSV (50 μ M y superior) disminuye la expresión de Lin28A. Luego de esto, decidimos evaluar los niveles de la proteína Lin28A con el tratamiento con RSV.

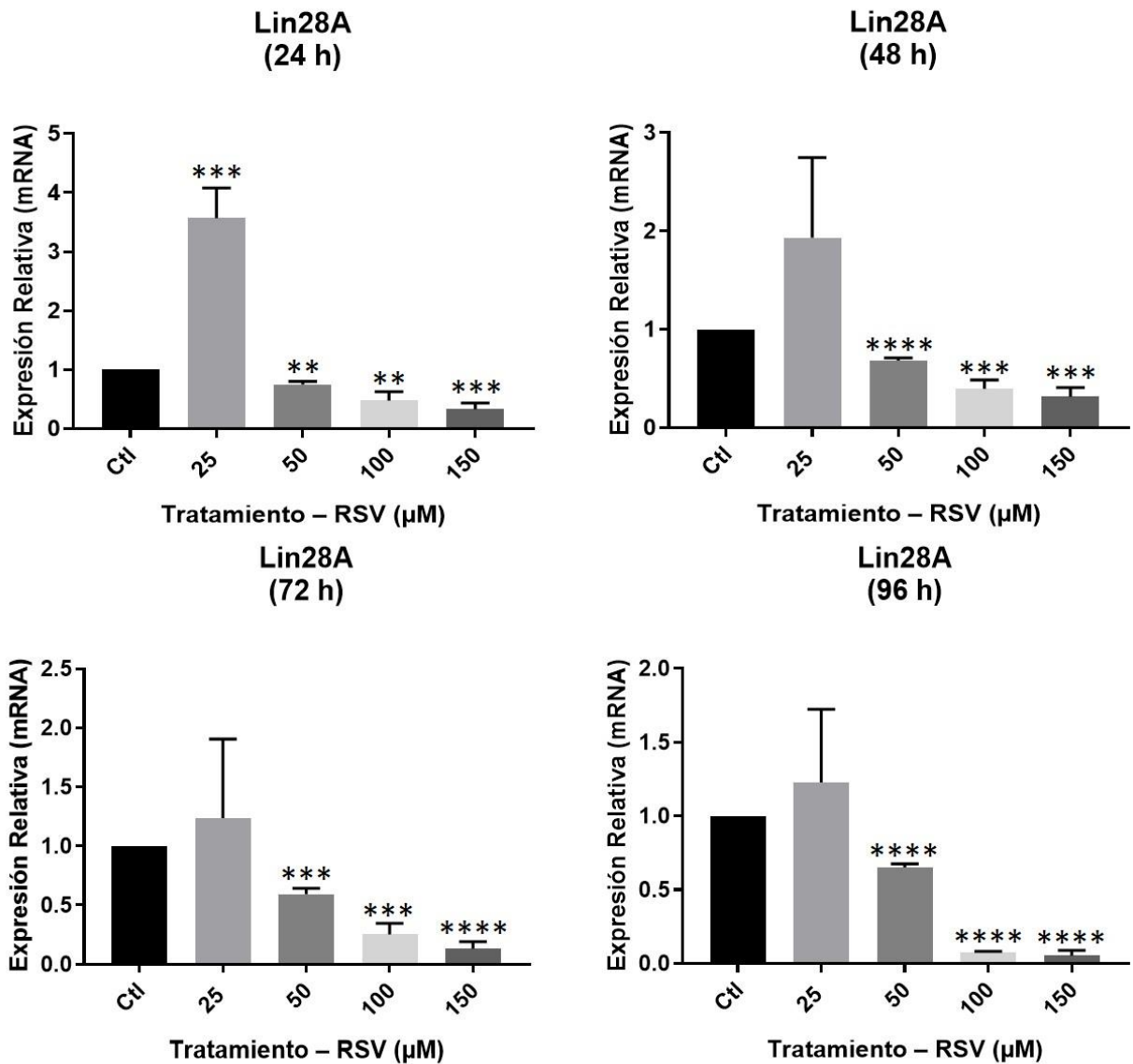


Figura 20| El RSV disminuye la expresión del mRNA de Lin28A en células NCCIT dependiente de la concentración y el tiempo. Las células tratadas con etanol, el vehículo de dilución para RSV, se utilizaron como control (Ctl). Los niveles de mRNA se normalizaron utilizando el gen endógeno B2M. Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm DE. La prueba de comparación se utilizó para evaluar la diferencia entre las células Ctl y los otros grupos de tratamiento. * representa un indicador significativo (**= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, ****= $p < 0.0001$ vs Ctl).

11.2.1 RSV disminuye los niveles de mRNA de los factores de transcripción SP1 y STAT3.

Con el fin de explicar como el RSV disminuye los niveles del mRNA de Lin28A, se evaluó el efecto del RSV sobre dos factores transcripcionales importantes, que se ha visto son capaces de unirse al promotor de Lin28A y promover su expresión. Para ello, se realizaron RT-qPCR (*Figura 21 y Figura 21.1*). Observamos que el RSV disminuye la expresión de los mRNA de SP1 y STAT3 significativamente. Estos resultados muestran evidencia sobre un posible mecanismo de acción del RSV sobre el mRNA de Lin28A.

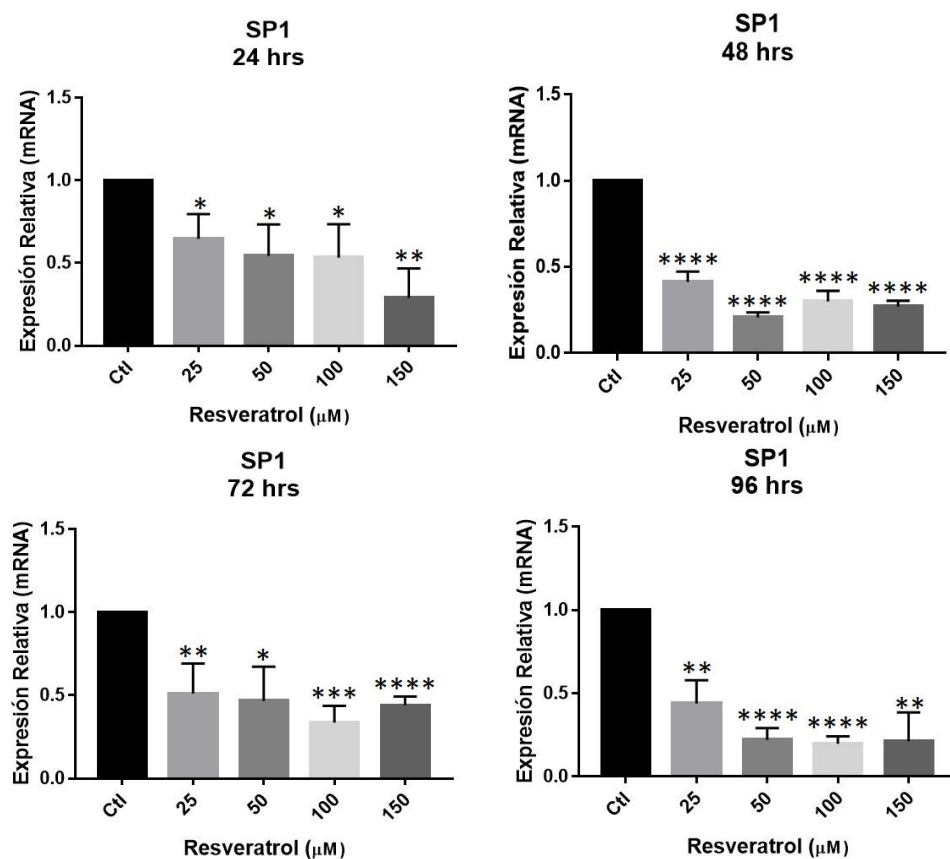


Figura 21| El RSV disminuye la expresión del mRNA de SP1 en células NCCIT. Las células tratadas con etanol, el vehículo de dilución para RSV, se utilizaron como control (Ctl). Los niveles de mRNA se normalizaron utilizando el gen endógeno B2M. Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm DE. La prueba de comparación se utilizó para evaluar la diferencia entre las células Ctl y los otros grupos de tratamiento. * representa un indicador significativo (*= p <0.1, **= p <0.01, ***= p <0.001, ****= p <0.0001 vs Ctl).

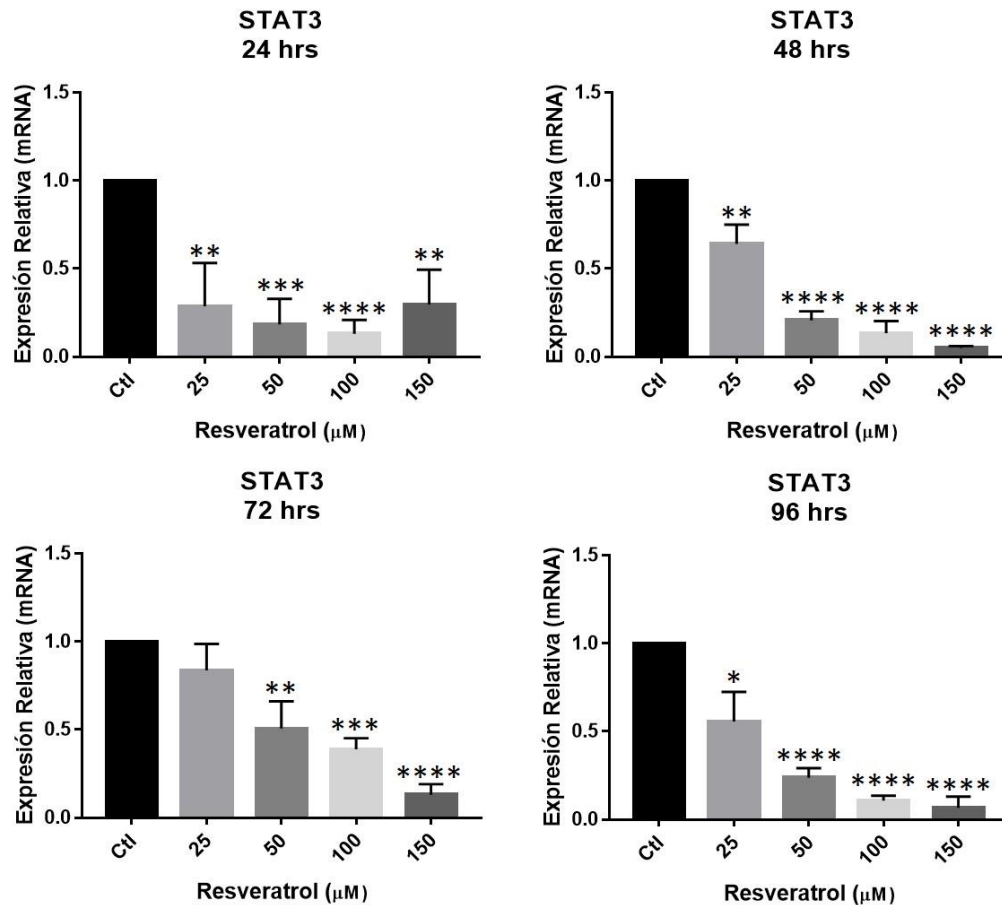


Figura 21.1| El RSV disminuye la expresión del mRNA de STAT3 en células NCCIT. Las células tratadas con etanol, el vehículo de dilución para RSV, se utilizaron como control (Ctl). Los niveles de mRNA se normalizaron utilizando el gen endógeno B2M. Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm DE. La prueba de comparación se utilizó para evaluar la diferencia entre las células Ctl y los otros grupos de tratamiento. * representa un indicador significativo (*= p <0.1, **= p <0.01, ***= p <0.001, ****= p <0.0001 vs Ctl).

11.2.2 RSV disminuye los niveles de proteína Lin28A en células NCCIT.

También, investigamos si el RSV tiene un efecto sobre la proteína de Lin28A. La expresión de la proteína Lin28A se evaluó en células NCCIT tratadas con diferentes concentraciones

de RSV (25, 50, 100 y 150 μM) (Figura 22). Se realizó un análisis por Western blot y se observó que el nivel de proteína Lin28A comienza a disminuir sólo con las concentraciones más altas de RSV (100 μM y 150 μM). Con relación a lo obtenido, se dedujo que la proteína Lin28A fue más estable al tratamiento con RSV, por lo que se decidió evaluar la expresión de USP28. La deubiquitinasa que se demostró es capaz de mantener estable Lin28A, evitando su degradación (Haq et al., 2019).

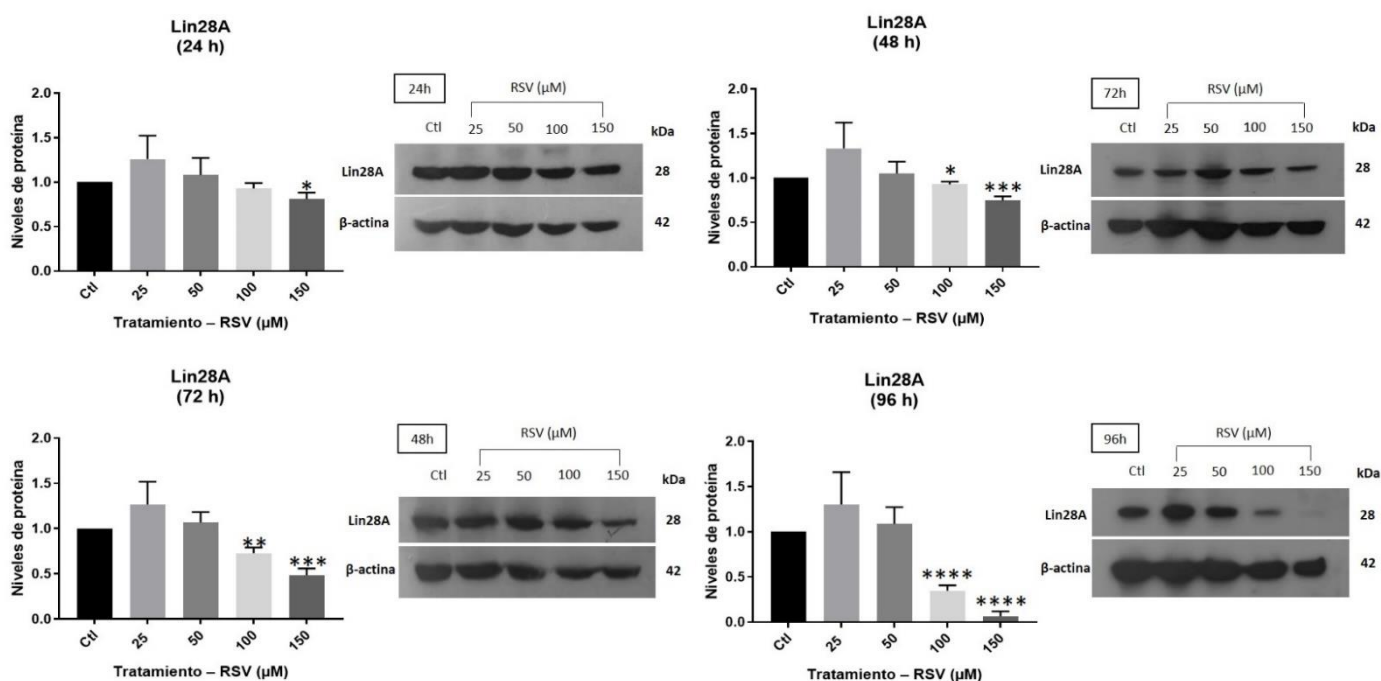


Figura 22| La proteína Lin28A es más estable que el mRNA y solo se ve afectada por las concentraciones más altas de RSV. Las células NCCIT se trataron con diferentes concentraciones de RSV (25, 50, 100 y 150 μM) en diferentes períodos de tiempo. Para los gráficos y Western Blots correspondientes a estos tratamientos, se utilizó β -actina como control de carga. Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm DE. * representa un indicador significativo (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, ****= $p < 0.0001$ vs Ctl).

11.3 RSV disminuye la expresión del mRNA de USP28.

Se realizó RT-qPCR para evaluar el efecto del RSV sobre el mRNA de USP28 en la línea celular NCCIT (Figura 23). Observamos que a medida que aumenta la concentración de RSV, la expresión del mRNA de USP28 disminuye significativamente como Lin28A. Por lo tanto, se decidió evaluar también la proteína USP28.

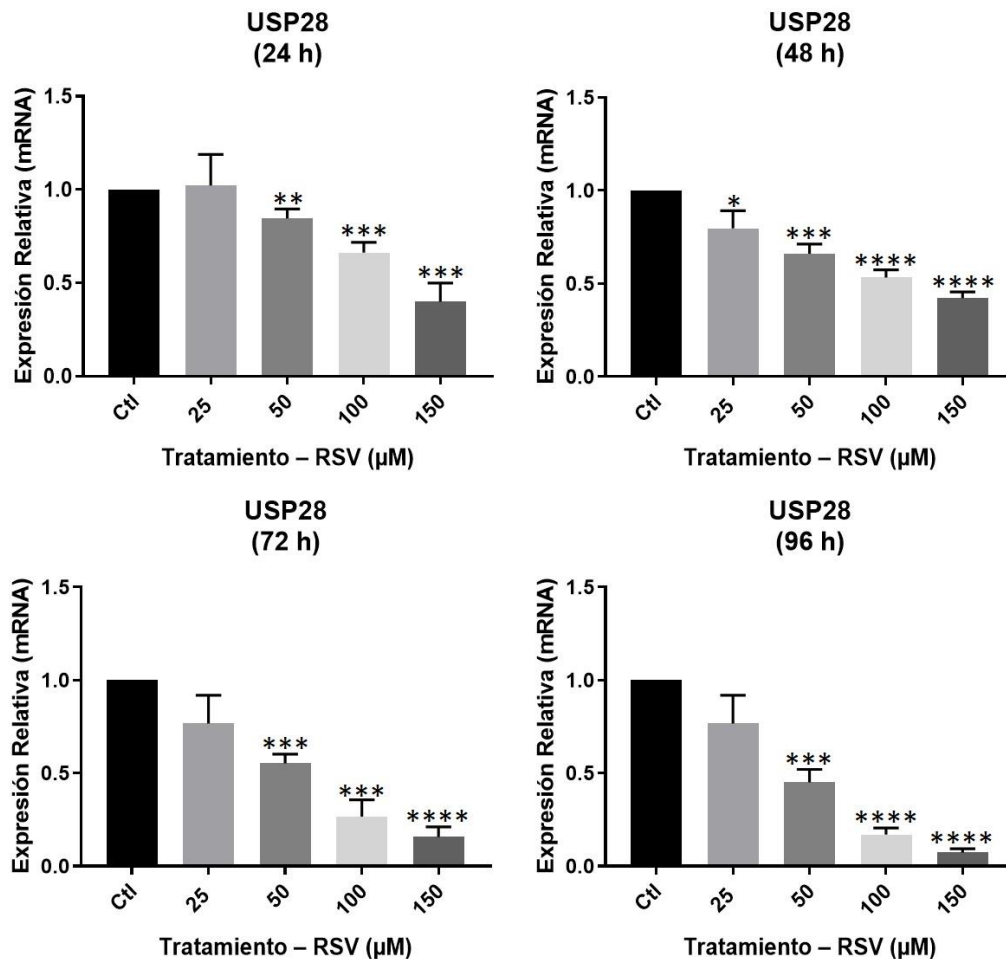


Figura 23| RSV disminuye la expresión del mRNA de USP28 a diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento en células NCCIT. Las células tratadas con etanol, el vehículo de dilución para RSV, se utilizaron como control (Ctl). Los niveles de mRNA se normalizaron utilizando el gen endógeno B2M. Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm DE. * representa un indicador significativo (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, ****= $p < 0.0001$ vs Ctl).

11.3.1 RSV disminuye el nivel de la proteína USP28.

Para investigar el efecto de 150 μM de RSV (concentración a la que vemos una mayor disminución en la proteína Lin28A (Figura 24) sobre la proteína USP28, se utilizó el análisis por Western blot (Figura 24.1). La administración de 150 μM de RSV redujo significativamente el nivel de proteína de la deubiquitinasa USP28, observándose el mayor efecto a las 72 y 96 horas de tratamiento. Una vez demostrada la disminución de USP28 con el tratamiento con RSV, continuamos evaluando si la degradación de Lin28A por RSV se llevó a cabo a través de la vía proteosomal.

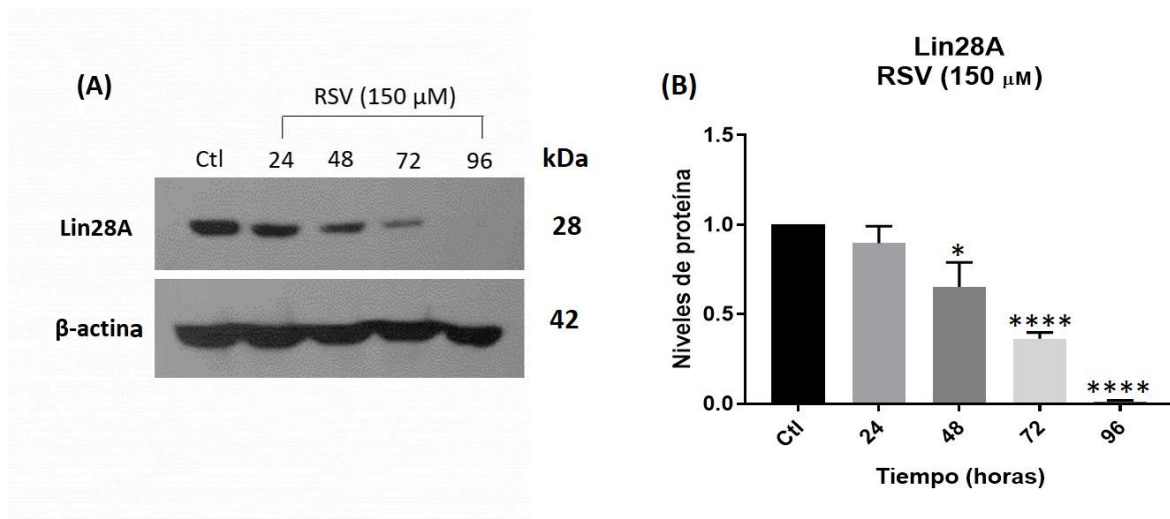


Figura 24 | RSV a 150 μM puede disminuir significativamente el nivel de la proteína Lin28A. Las células NCCIT se trataron con RSV 150 μM en diferentes períodos de tiempo (24, 48, 72 y 96 horas). A) Western Blot (WB) representativo de la proteína Lin28A. B) El contenido del gráfico representa el análisis del WB (A) y sus triplicados biológicos independientes \pm DE. Se utilizó β -actina como control de carga. La prueba de comparación se utilizó para evaluar la diferencia entre las células Ctl y los otros grupos de tratamiento. * representa el cambio significativo obtenido mediante el análisis t-student (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, ****= $p < 0,0001$).

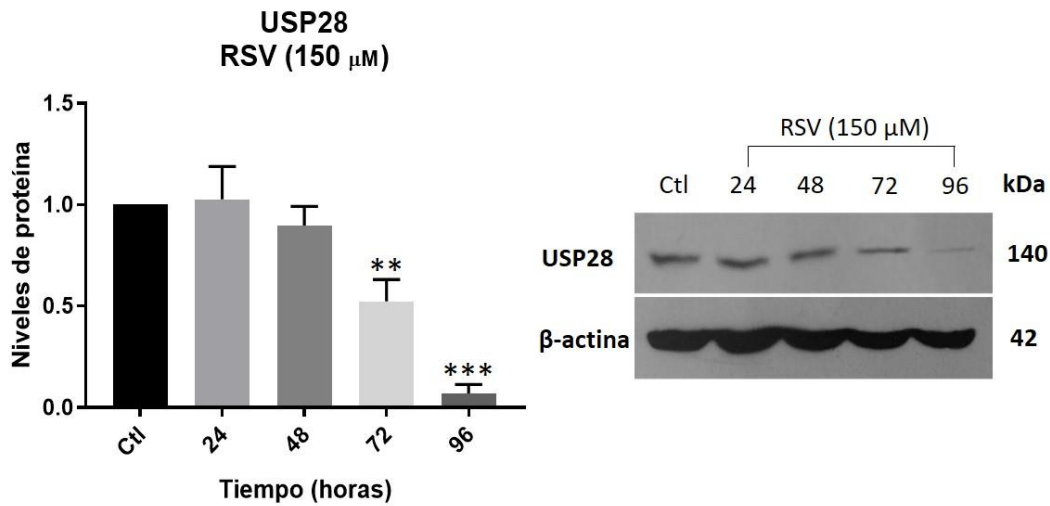
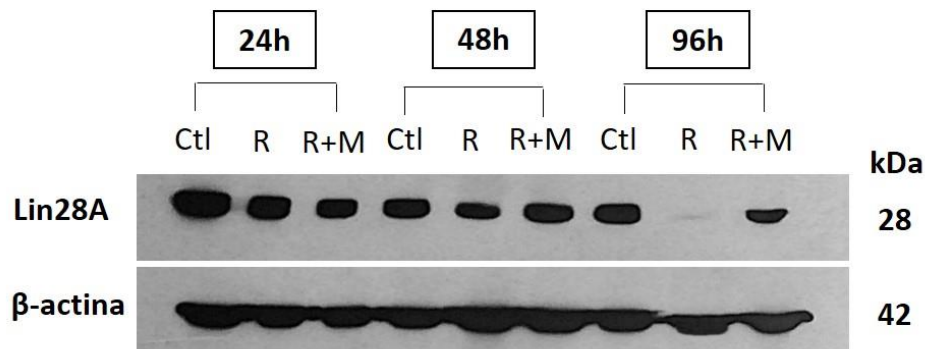


Figura 24.1| RSV a 150 μ M puede disminuir el nivel de la proteína USP28. Las células NCCIT se trataron con RSV 150 μ M en diferentes períodos de tiempo (24, 48, 72 y 96 horas). Gráfico y Western Blot (WB) representativo de la proteína USP28. Se utilizó β -actina como control de carga. Los valores en el gráfico representan la media de tres experimentos independientes \pm DE. * representa un indicador significativo (*= p <0.05, **= p <0.01, ***= p <0.001, ****= p <0.0001 vs Ctl).

11.4 El RSV degrada la proteína Lin28A mediante la vía proteasomal.

Para investigar si el tratamiento con RSV induce la degradación de la proteína Lin28A por la vía proteosomal, examinamos el nivel de proteína de Lin28A en presencia del inhibidor proteosomal MG132 (M) en células NCCIT tratadas con 150 μ M - RSV (R) en diferentes periodos de tiempo (Figura 25). El resultado mostró que la presencia de MG132 en las células tratadas con RSV inhibió la degradación de Lin28A.



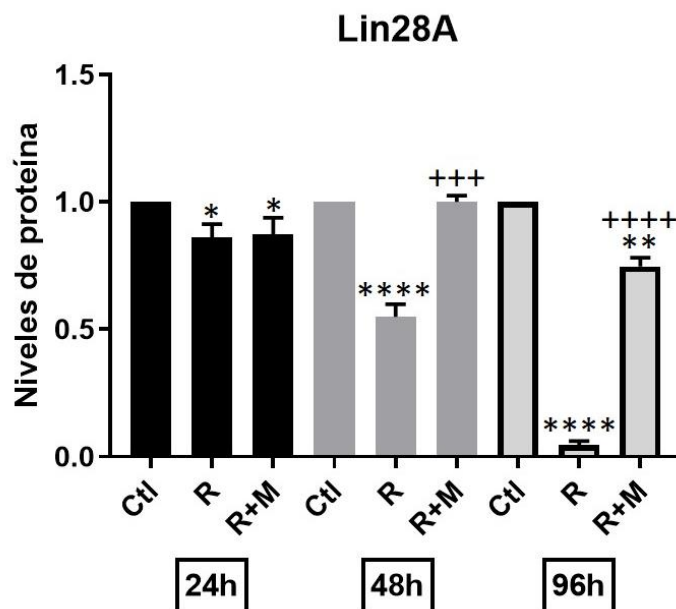


Figura 25| RSV induce la degradación proteosómica de Lin28A. Las células NCCIT se trataron con 5 μ M de MG132 y 150 μ M de RSV durante diferentes períodos de tiempo (24, 48 y 96 horas) y luego se sometieron a transferencia Western. Western Blot representativo de la proteína Lin28A. (R = RSV, M = MG132) Se utilizó β -actina como control de carga. El gráfico representa el análisis del WB. Las células tratadas con etanol, el vehículo de dilución para RSV, se utilizaron como control (Ctl). Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm DE. * representa un indicador significativo (*= p <0.05, **= p <0.01, ****= p <0.0001 vs Ctl). + representa un indicador significativo obtenido al comparar células tratadas con R con células tratadas con R + M (+++= p <0,001, ++++= p <0,0001 vs grupo R).

11.5 La inhibición de USP28 por siRNAs (siUSP28) disminuye los niveles de Lin28A pero en menor proporción que el tratamiento con RSV.

Para evaluar la expresión de Lin28A cuando existe un silenciamiento específico contra USP28, se transfectaron células NCCIT con siUSP28. Las células se transfectaron con diferentes siUSP28 específicos (*Figura 26*) usando lipofectamina. El resultado fue evaluado mediante Western blot, observándose que con cada uno de los siRNAs utilizados se observó silenciamiento en la expresión de USP28. Aun así, se decidió utilizar la combinación de los tres siRNA para obtener un mejor resultado para los siguientes experimentos. La *Figura 26.1A* muestra los niveles de proteína de USP28 en células transfectadas con siUSP28 en diferentes tiempos, observándose cómo la traducción

disminuye significativamente. De manera similar, se observa una disminución en la proteína USP28 cuando las células NCCIT se transfectaron con siUSP28 (Figura 26.1B). Curiosamente, al evaluar la expresión del mRNA de Lin28A (Figura 26.1C) y la proteína Lin28A (Figura 26.1D) en células transfectadas con siUSP28, notamos que el mRNA comienza a disminuir después de 48 horas de tratamiento, mientras que la proteína Lin28A permanece estable hasta 72 horas y fue menor en comparación con el tratamiento solo con RSV (150 μ M) (Figura 24). Además, se evaluó la expresión de Lin28A fosforilada en S200 (pLin28A) en células transfectadas con siRNAs vs USP28, con el fin de conocer qué pasaba con la otra vía reportada que estabiliza a la proteína de Lin28A. Curiosamente, observamos un aumento en pLin28A (Figura 26.1D), tras la eliminación de USP28 con siRNAs. Por lo que se decidió evaluar los niveles de pLin28A con el tratamiento de RSV.

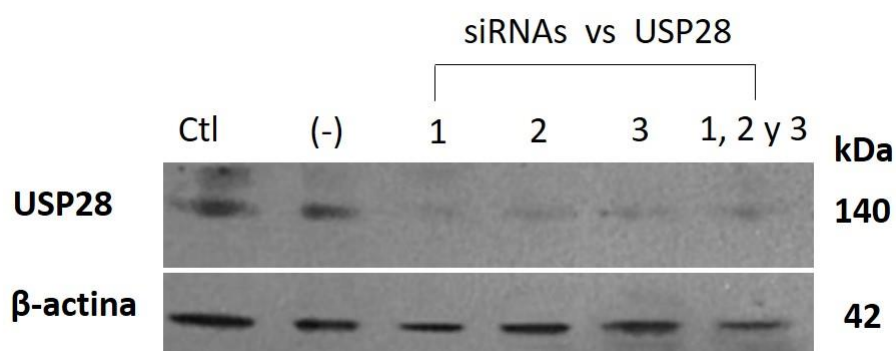


Figura 26| Silenciamiento de USP28 mediante transfección con siRNA contra USP28 (siUSP28). Western Blot representativo del silenciamiento de USP28 con siRNAs específicos. El (-) se refiere a la transfección de un siRNA que no afecta al gen de interés (USP28). Las (Ctl) son células NCCIT que no fueron transfectadas.

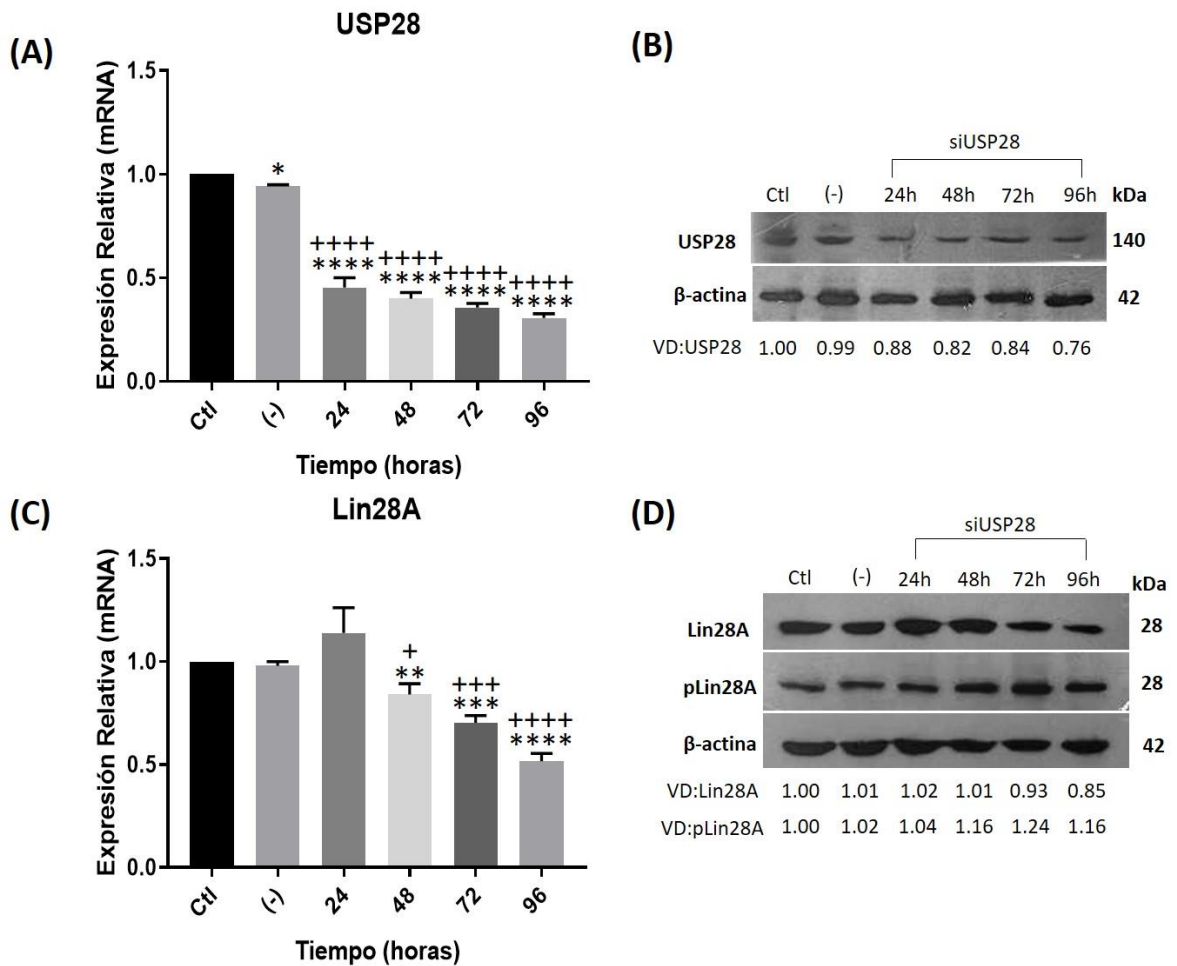
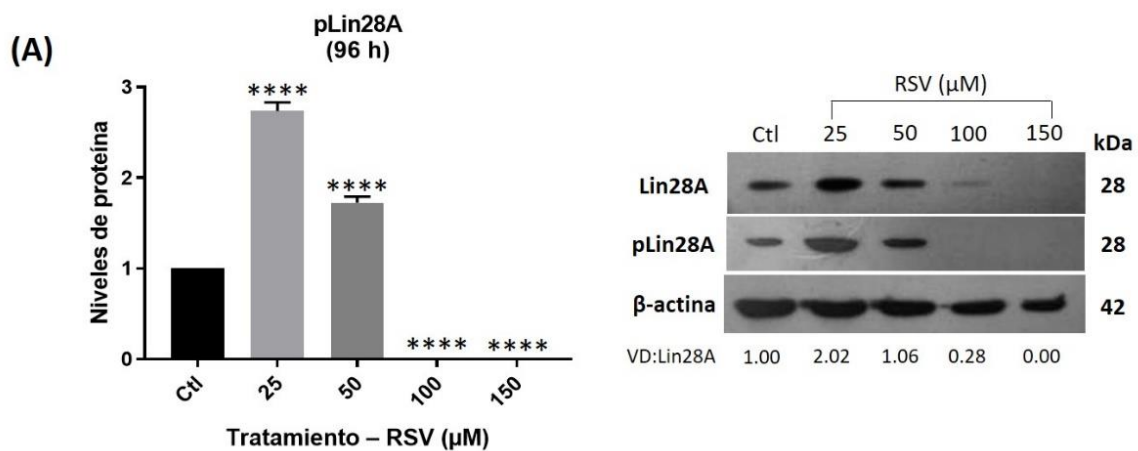


Figura 26.1| La inhibición de USP28 con siRNAs específicos no es suficiente para disminuir totalmente la expresión de la proteína Lin28A. A) La expresión del mRNA de USP28 en células transfectadas con siUSP28 se cuantificó mediante RT-qPCR. Las (Ctl), en este caso, son células NCCIT que no fueron transfectadas. El (-) se refiere a la transfección de un siRNA inespecífico que no afecta al gen de interés (USP28). B) Proteína USP28, WB de células transfectadas con siUSP28 en diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 horas). C) La expresión del mRNA de Lin28A en células transfectadas con siUSP28 se cuantificó mediante RT-qPCR. Los niveles de mRNA se normalizaron utilizando el gen endógeno B2M. D) WB representativo de la proteína Lin28A y la fosforilación de Lin28A (s200) por MAPK/ERK (pLin28A), a partir de células transfectadas con siUSP28 en diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 horas). Se utilizó β -actina como control de carga para experimentos de Western Blot (WB). Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm DE. * representa un indicador significativo (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, ****= $p < 0.0001$ vs Ctl). + representa un cambio significativo obtenido al comparar las celdas (-) con todos los demás grupos tratados (+= $p < 0,05$, +++= $p < 0,001$, ++++= $p < 0,0001$ vs -). VD= valor de densitometría.

11.6 RSV disminuye los niveles de fosforilación de Lin28A S200.

En relación con los resultados anteriores, decidimos evaluar el efecto del RSV sobre la fosforilación de S200 en la proteína Lin28A. Las células NCCIT fueron tratadas con diferentes concentraciones de RSV durante 96 horas (tiempo en el que se ha visto un mayor efecto en la reducción de la proteína Lin28A) (*Figura 27A*). Este experimento demostró que el RSV en concentraciones bajas (25 y 50 μM) aumenta pLin28A. Por otro lado, a concentraciones (100 y 150 μM) el RSV logra disminuir fuertemente los niveles de proteína pLin28A. También evaluamos el efecto del RSV a una concentración de 150 μM en diferentes períodos de tiempo (*Figura 27B*). Nuestros hallazgos muestran que el tratamiento con RSV a partir de 24 horas disminuye significativamente los niveles de fosforilación de Lin28A. Esto sugiere que el RSV puede reducir la fosforilación de Lin28A impulsada por la vía MAPK/ERK, similar a lo observado por Tsanov *et al* en 2017 (11). La detección de una disminución de la fosforilación de Lin28A después de la exposición al RSV proporciona apoyo experimental adicional para el mecanismo previamente identificado, en el que el RSV disminuye a USP28 y afecta de manera similar la vía MAPK/ERK (mecanismos de estabilización de Lin28A).



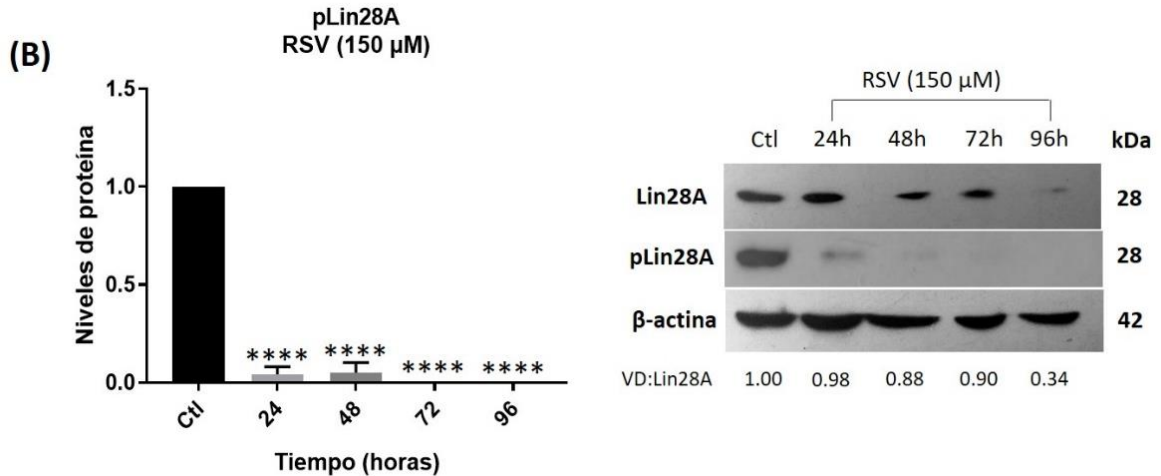


Figura 27 | RSV disminuye la fosforilación de Lin28A en serina 200=s200 (pLin28A) causada por MAPK/ERK. A) Gráfico representativo del análisis de WB (izquierda) y WB representativo (derecha). Las células NCCIT se trataron con diferentes concentraciones de RSV durante 96 horas. B) Gráfico representativo del análisis de WB (izquierda) y WB representativo (derecha). Las células NCCIT se trataron con 150 μ M de RSV en diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 horas). En ambos experimentos se utilizaron como control (Ctl) células tratadas con etanol (vehículo de dilución para RSV). Se utilizó β -actina como control de carga. Los valores representan la media de tres experimentos independientes \pm DE. * representa indicador significativo (****= $p < 0.0001$ vs Ctl). VD= valor de densitometría.

11.7 La inhibición de la vía MAPK/ERK reduce específicamente el nivel de proteína pLin28A.

Posteriormente, decidimos evaluar el efecto de inhibir solo la activación de ERK1/2 sobre la fosforilación de Lin28A en la serina 200 (s200) (pLin28A) y la estabilidad de Lin28A total, así como de USP28 en las células NCCIT. Las células fueron tratadas con un inhibidor específico de la activación de ERK1/2, un miembro de la vía MAPK responsable de la fosforilación de Lin28A en s200. Primero, se realizó un ensayo MTT para evaluar la dosis segura de inhibidor que podría usarse para tratar las células; En este experimento, obtuvimos una IC50 de 9 μ M (Figura 28). El siguiente experimento se realizó con 5 o 7,5 μ M del inhibidor, concentraciones que afectan mínimamente la viabilidad celular. Observamos que ambas concentraciones utilizadas del inhibidor fueron suficientes para mostrar una disminución del nivel de pLin28A. Aun así, ninguna concentración afecta significativamente la estabilidad de las proteínas Lin28A y USP28 totales (Figura 28.1).

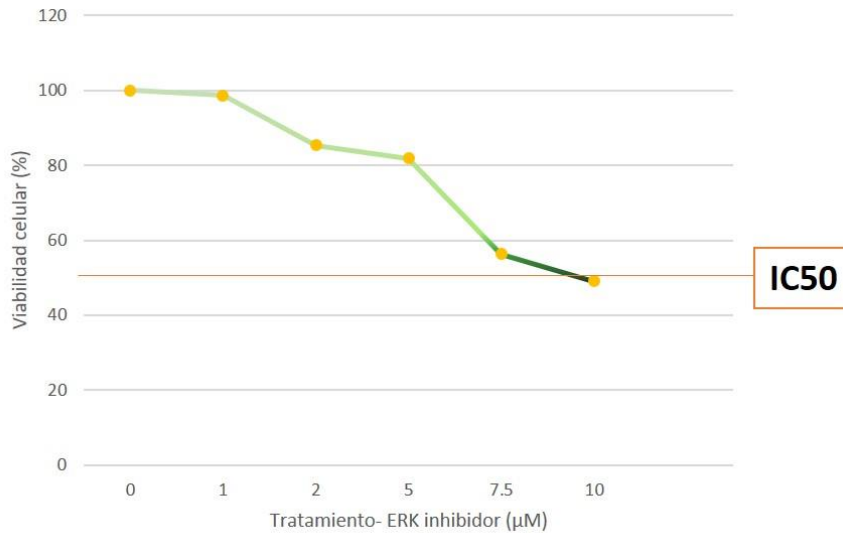


Figura 28| Ensayo de MTT con inhibidor de MAPK/ERK (PD: PD0325901) para determinar IC50. Las células NCCIT se trataron con diferentes concentraciones de inhibidor de MAPK/ERK (1, 2, 5, 7,5 y 10 µM) durante 48 h. La viabilidad celular se probó con el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Cada punto de datos representa el promedio de tres experimentos independientes ± DE. La IC50 calculada del inhibidor de MAPK/ERK en NCCIT fue de 9 µM.

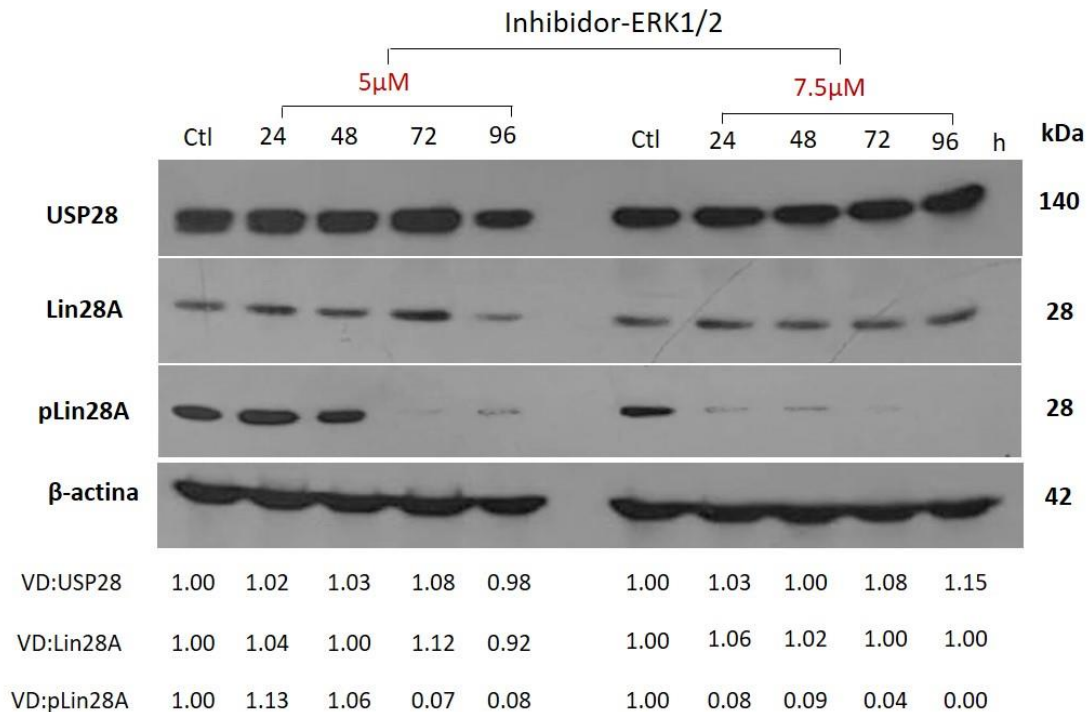


Figura 28.1 | El inhibidor de MAPK/ERK disminuyó la fosforilación de Lin28A (s200) (pLin28A) similar al tratamiento con RSV. WB representativo del tratamiento de células NCCIT con el inhibidor MAPK/ERK (5 o 7,5 μ M) a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96 horas). Las células tratadas con DMSO (vehículo de dilución para inhibidor de PD) se usaron como control (Ctl). Se utilizó β -actina como control de carga. VD= valor de densitometría.

11.8 RSV disminuye fuertemente la estabilidad de la proteína Lin28A.

Finalmente, evaluamos la cinética de la degradación de la proteína Lin28A en células NCCIT utilizando diferentes condiciones (RSV, siUSP28, inhibidor/ERK), se llevó a cabo un ensayo de cicloheximida (CHX) (*Figura 29*) y (*Figura 29.1*). En este experimento, se demostró que el tratamiento con RSV reduce significativamente la estabilidad de la proteína Lin28A. Además, la estabilidad disminuyó con el tratamiento con siUSP28 y el tratamiento combinado de siUSP28 e inhibidor/ERK. Sin embargo, la reducción en la estabilidad de Lin28A con el tratamiento de RSV fue más efectiva en todos los casos.

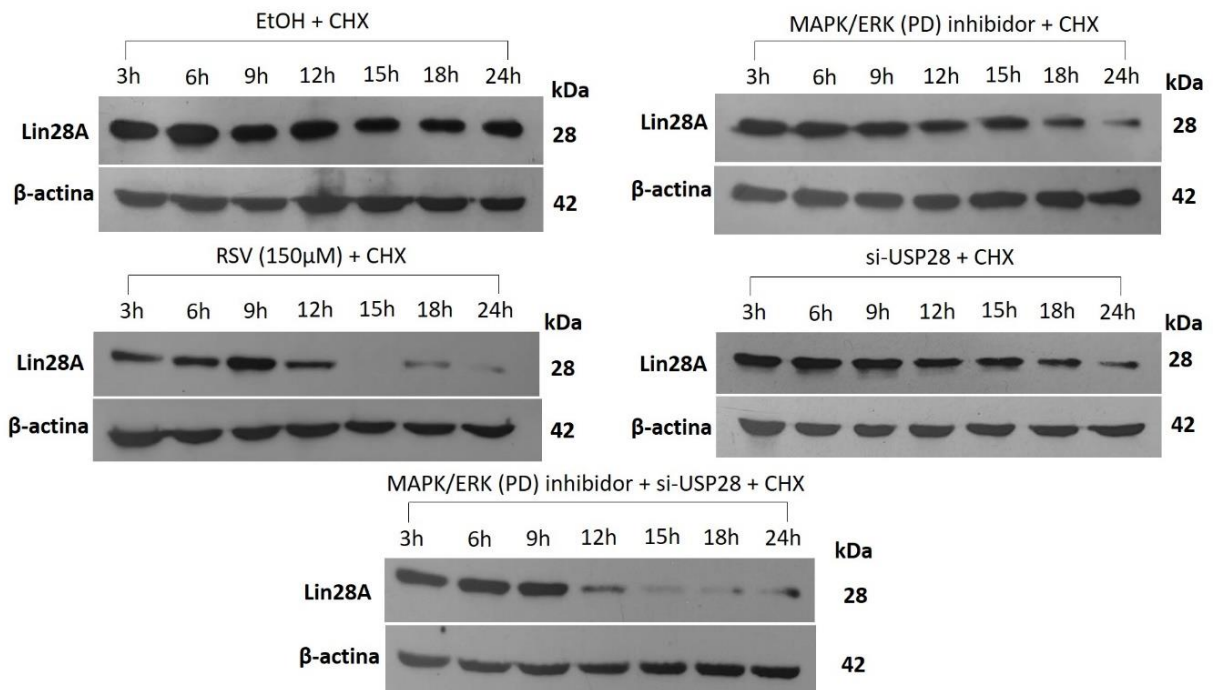


Figura 29 | Western Blots que muestran los niveles de proteína de Lin28A con distintos tratamientos. Expresión de la proteína Lin28A en células NCCIT tratadas con EtOH, RSV, si-USP28, inhibidor de MAPK/ERK, y todas ellas con CHX en diferentes tiempos de tratamiento (3, 6, 9, 12, 15, 18 y 24 horas). El análisis densitométrico se muestra en la *Figura 29.1*, donde se observa una comparación de la degradación de Lin28A con cada uno de los tratamientos.

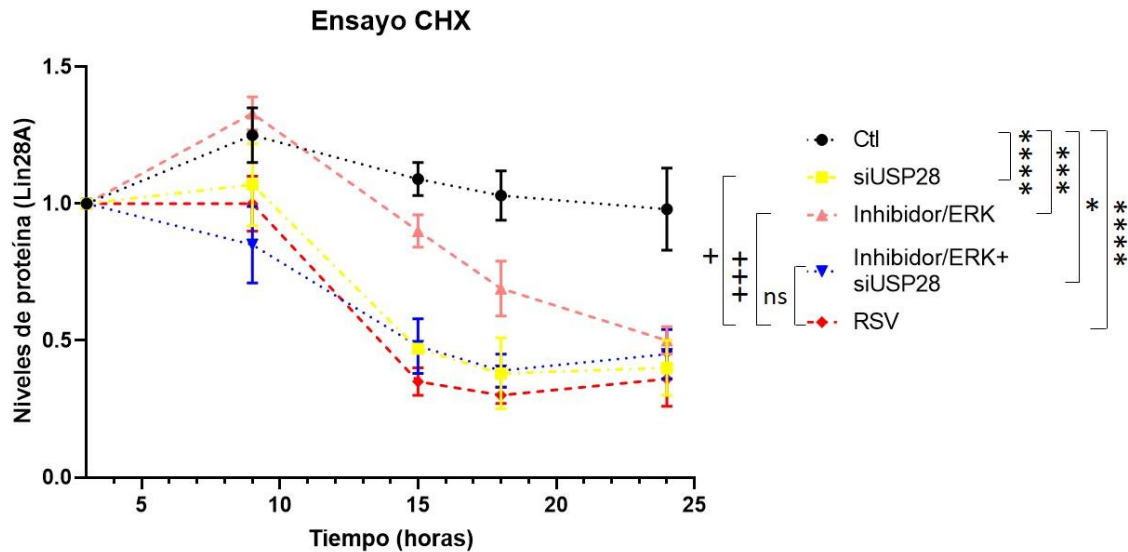


Figura 29.1 | Ensayo de estabilidad de la proteína Lin28A con cicloheximida. Gráfico comparativo de la cinética de degradación de la proteína Lin28A con los diferentes tratamientos (siUSP28, Inhibidor/ERK, RSV) en células NCCIT con 11 µg/mL de CHX. El ensayo se realizó durante un período de tiempo de 3 a 24 horas, y se realizaron WB para evaluar la expresión de proteínas, como se muestra en la *Figura 29*. Para realizar las pruebas de comparación, se consideró el tiempo de 15 horas porque, durante este tiempo, se observó la disminución más drástica en los tratamientos. (*) se utilizó para representar un indicador de cambio significativo (*=p<0,05, ***=p<0,001, ****=p<0,0001 vs Ctl). + representa un cambio significativo obtenido al comparar las células tratadas con RSV con todos los demás grupos tratados (+=p<0,05, +++=p<0,001, ns= no significativo vs RSV).

11.9 RSV disminuye las proteínas de Lin28A y USP28 en otro modelo celular.

Con la finalidad de demostrar el efecto del RSV sobre la disminución de los niveles de Lin28A y USP28, se evaluó por medio de Western Blots los niveles correspondientes de dichas proteínas en la línea celular T47D (Carcinoma de mama). Observando una disminución significativa de ambas proteínas (Lin28A y USP28); sin embargo, esta

disminución se observó en menor proporción en comparación con la línea celular NCCIT (Figura 30).

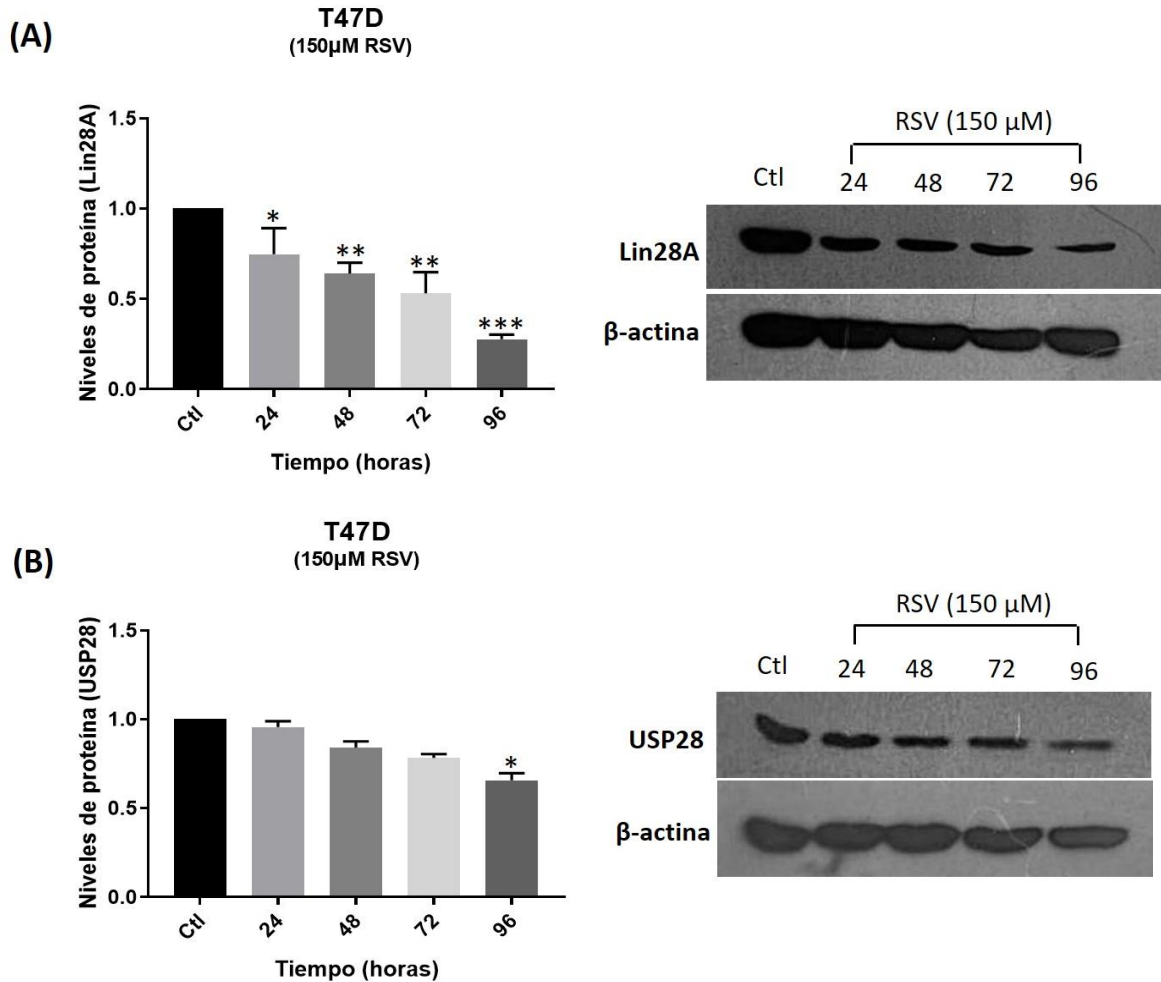


Figura 30| RSV disminuye la proteína de Lin28A y USP28 en la línea celular T47D. A) Gráfico representativo del análisis de WB (izquierda) y WB representativo(derecha). Las células T47D se trataron con 150 µM de RSV por diferentes periodos de tiempo (24, 48, 72 y 96 horas). B) Gráfico representativo del análisis de WB (izquierda) y WB representativo (derecha). En ambos experimentos se utilizaron como control (Ctl) células tratadas con etanol (vehículo de dilución para RSV). Se utilizó β-actina como control de carga. Los valores representan la media de tres experimentos independientes ± DE. * representa indicador significativo (*=p<0.1, **=p<0.01, ***=p<0.001 vs Ctl).

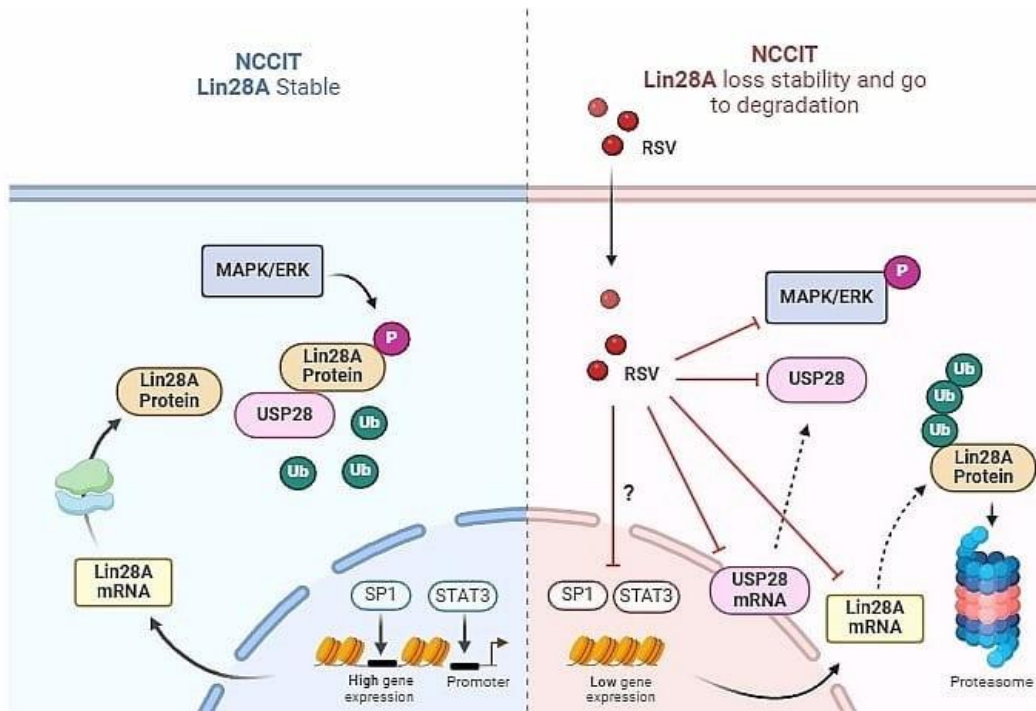


Figura 31| Modelo esquemático final del trabajo. En células NCCIT, el RSV inhibe la expresión del mRNA de Lin28A; Pensamos que puede ser que el RSV inhiba la síntesis de mRNA de Lin28A mediante la disminución de los factores de transcripción SP1 y STAT3, pero esto no se ha demostrado completamente en el modelo (?). Por otro lado, se demuestra que el RSV inhibe la expresión de la deubiquitinasa USP28 y la vía MAPK/ERK (encargada de realizar la fosforilación en la serina 200, lo que permite su estabilidad). Esto hace que la proteína Lin28A pierda sus mecanismos de estabilidad y comience su degradación a través de la vía proteasomal. Imagen realizada en Biorender®.

12. Discusión

En este trabajo, nos centramos en evaluar los posibles mecanismos que promueven la regulación negativa de la oncoproteína Lin28A en células NCCIT por el tratamiento con RSV.

Nuestros resultados indicaron que el RSV inhibe la expresión del mRNA de Lin28A entre concentraciones de 50 μM y 150 μM . Curiosamente, se observó un aumento en el mRNA de Lin28A con la concentración más baja (25 μM) de RSV. Este resultado puede deberse al efecto hormético o bifásico del RSV. Este efecto contradice la creencia tradicional de

que la dosis-respuesta de un fármaco o compuesto es siempre directamente proporcional, ya que se caracteriza por inducir una estimulación de la transcripción a dosis bajas (o efecto beneficiosos o terapéuticos) y un efecto opuesto a dosis más altas (Efecto toxico) (Jodynys-Liebert & Kujawska, 2020). En este caso, ocurre un comportamiento hormético contrario. Aún no está claro por qué se produce este efecto, pero existen algunas teorías que intentan explicar la hormesis, entre ellas está la modulación de las vías de señalización: en donde se piensa que los fármacos o compuestos naturales son capaces de interactuar con vías de señalización celular y modular su actividad de manera diferente a dosis bajas y altas, otra de ellas involucra la expresión génica, se cree que estos compuestos pueden influir en la expresión de genes involucrados en procesos celulares clave, y este efecto puede variar según la dosis. Sin embargo, siempre se recomienda evaluar este fenómeno para determinar la dosis o dosis a las que se obtiene un efecto positivo o negativo, independientemente del compuesto o fármaco a utilizar.

La disminución en la expresión de Lin28A por RSV podría estar relacionada con la disminución de algunos factores de transcripción, como SP1 y STAT3, que se ha reportado que se unen al promotor Lin28A, favoreciendo su expresión y que al ser silenciados o inhibidos pueden repercutir en la disminución tanto del transcrito como de la traducción de Lin28A (L. Guo et al., 2013; Xu et al., 2021; You et al., 2014). En este sentido, estudiamos la expresión de ambos factores de transcripción después del tratamiento con RSV (50-150 μ M) y observamos una regulación negativa en la expresión del mRNA de Sp1 y STAT3.

Curiosamente, cuando evaluamos la expresión de la proteína Lin28A en células NCCIT, observamos que su estabilidad no se correlacionaba con la regulación negativa del transcrito (mRNA), porque la expresión de la proteína disminuye en las concentraciones más altas de RSV (100 y 150 μ M). Estos resultados muestran que la proteína Lin28A es muy estable, posiblemente debido a mecanismos de regulación postraduccional que ya han sido descritos para esta proteína. Por ejemplo, en el estudio realizado por Haq y colaboradores en 2019, se demostró que Lin28A interactúa con USP28 y la desubiquitina evitando su degradación, manteniendo estable la proteína de Lin28A y extendiendo su

vida media (Haq et al., 2019). Por otro lado, el estudio de Tsanov *et al.*, 2017, demostró que Lin28A es fosforilada en la serina 200 (s200) por ERK1/2 quienes forman parte de las MAPKs. Esta fosforilación en Lin28A permite su estabilización postraduccional (Tsanov et al., 2017). De manera consistente con estos estudios, nosotros evaluamos la capacidad del compuesto natural RSV para disminuir estos mecanismos de regulación postraduccional.

USP28 es un importante regulador de la estabilidad de proteínas implicadas en la proliferación y metástasis como cMYC, LSD1, HIF-1a, c-JUN y MDC1; Además, USP28 suele estar sobre-expresada en diferentes tipos de cáncer, como el cáncer de páncreas, el cáncer epitelial escamoso, gástrico, colorrectal y otros (L. Chen et al., 2021; X. Wang, Liu, et al., 2018; Zhuo et al., 2022), y se considera una diana terapéutica importante en el tratamiento del cáncer. Interesantemente, nosotros demostramos que el RSV regula negativamente los niveles de la proteína USP28. Por ello, decidimos analizar si el RSV tenía efecto sobre la transcripción de USP28, mostrando de igual manera una regulación negativa del mRNA de USP28 de manera dependiente de la dosis y el tiempo. Especulamos que este efecto podría deberse a la regulación negativa de los factores de transcripción que se unen al promotor USP28 o al incremento en el nivel de algunos miRNAs. En este sentido, existen algunos miRNAs y genes candidatos que se han visto disminuyen o aumentan su expresión con la presencia de RSV, como c-JUN, c-MYC, miR92b-3p, miR-216b y miR-622. Se ha demostrado que los factores de transcripción oncogénicos como c-JUN y c-MYC pueden unirse al promotor USP28 y aumentar su expresión (Fukuda et al., 2022; X. Wang, Liu, et al., 2018). De hecho, ya se ha demostrado que el RSV puede inhibir estos factores (L. Chen et al., 2021; Maier et al., 2023; Zhao et al., 2019), por lo que deducimos que esto podría estar sucediendo en nuestro modelo. Además, sugerimos que el RSV puede estar aumentando los niveles del miR92b-3p porque ya se ha demostrado que miR-92b-3p puede unirse al 3'-UTR de USP28 y reprimir su expresión (Prieto-García et al., 2021). Alternativamente, el RSV puede estar aumentando los niveles de miR-216b, un microRNA que puede inhibir la expresión del mRNA de USP28 en células HCC (carcinoma hepatocelular) (Zhang, 2020). También podría ser posible que el RSV esté

aumentando el miR-622, un miRNA que actúa como supresor de tumores contra KRAS; interesantemente, KRAS es un oncogén que puede regular positivamente la expresión de USP28 (Serra et al., 2014). Sin embargo, estas son sólo especulaciones y deberían realizarse más experimentos para demostrar que esto sucede.

Además, demostramos que el RSV induce la degradación de Lin28A por la vía proteosomal. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Haq, 2019 (Haq et al., 2019), donde demuestran que Lin28A es degradado por la vía proteasomal 26S. Por otro lado, comparamos la expresión de las proteínas Lin28A y pLin28A con el tratamiento único de siRNAs vs. USP28. En este experimento, observamos una pequeña disminución de la proteína Lin28A mientras que pLin28A aumentó su expresión. Pensamos que la expresión constante del mRNA de Lin28A podría compensar la pérdida de protección por la regulación negativa de USP28 mientras que, por otro lado, la disminución de USP28 podría aumentar la activación de ERK, que a su vez aumenta los niveles de pLin28A (Piskounova et al., 2011). En este sentido, la eliminación de la oncoproteína USP28 en la línea celular NCCIT no es suficiente para reducir completamente la expresión de la proteína Lin28A. Como se mencionó con anterioridad la fosforilación de la proteína Lin28A en S200 es otra forma importante de estabilizar y activar esta proteína, por lo que analizamos si el RSV podría reducir la fosforilación de Lin28A causada por la vía MAPK/ERK. Cuando analizamos lo que sucedió al tratar células NCCIT con diferentes concentraciones de RSV, nuevamente se observó un efecto hormético, donde a bajas concentraciones (25 y 50 μ M) RSV aumentó pLin28A y a altas concentraciones (100 y 150 μ M) disminuyó pLin28A significativamente. Dado que se ha demostrado que el RSV puede inhibir la vía de señalización MAPK/ERK (Fouad et al., 2013; F.-M. Wang et al., 2019), sugerimos que este polifenol disminuye la fosforilación en s200 de Lin28A y promueve la degradación de la proteína Lin28A.

Adicionalmente, analizamos si la inhibición de la vía MAPK/ERK era suficiente para disminuir el nivel de las proteínas pLin28A y Lin28A. pLin28A y Lin28A total se analizaron en células NCCIT tratadas sólo con el inhibidor ERK (PD), el mismo inhibidor utilizado en el trabajo de Tsanov (Tsanov et al., 2017). En estos experimentos, notamos que, aunque

la fosforilación de Lin28A disminuyó, la proteína Lin28A total permaneció estable. Se analizó la expresión de la proteína USP28 con el tratamiento con el inhibidor de ERK, y se observó que USP28 no se alteró bajo estas condiciones lo que sugiere que la estabilidad de la proteína Lin28A depende de ambas vías (USP28 y MAPK/ERK). Además, esto demostró que la ausencia de cualquiera de estas vías no es suficiente para la degradación completa de Lin28A, al menos en nuestro modelo donde existe una expresión continua del transcrito de Lin28A. Finalmente, usando el inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida (CHX), demostramos que la disminución en el nivel de proteína de USP28 era más importante para la degradación de Lin28A que la inhibición de la activación de ERK. Más interesante aún, se demostró que el RSV es el tratamiento más eficaz para la inhibición de la proteína Lin28A y, curiosamente, la combinación del tratamiento con siRNAs vs. USP28 y con el inhibidor de ERK se asemeja a la cinética de degradación presentada por el RSV, lo que sugiere que, de hecho, estas son las vías afectadas por el RSV que permiten la regulación negativa de la proteína Lin28A, sin embargo, podrían no ser las únicas. Esto puede tener grandes implicaciones terapéuticas en el tratamiento contra el cáncer a nivel molecular, por lo que resulta fascinante seguir explorando los blancos terapéuticos del compuesto natural RSV en diferentes modelos de cáncer *in vitro* e *in vivo*.

13. Conclusión

En conclusión, demostramos que el RSV inhibe la expresión de Lin28A a través de múltiples mecanismos. RSV bloquea la regulación postraduccional mediada por USP28 y la fosforilación mediada por MAPK/ERK de Lin28A, promoviendo la degradación de Lin28A a través de la vía proteosomal (*Figura 31*). Además, nuestro resultado de que demuestra que el RSV también inhibe a USP28 es importante, ya que esta desubiquitinasa participa en la estabilización de varios oncogenes y facilita la transición epitelio-mesénquimal y la metástasis (X. Wang, Liu, et al., 2018; Zhao et al., 2019). La capacidad del RSV para modular esta vía implica efectos anticancerígenos amplios más allá de Lin28A. En conjunto, los efectos inhibidores multidireccionales del RSV sobre la expresión y

estabilización de Lin28A establecen al RSV como una terapia complementaria atractiva. Su capacidad para inhibir simultáneamente a Lin28A, pLin28A y USP28 mejora el perfil antitumoral del RSV, lo que respalda su posible aplicación junto con regímenes convencionales para el tratamiento integral del cáncer.

14. Perspectivas

- A. Evaluar si el RSV tiene efecto sobre SP1 y STAT3 a nivel de proteína en este modelo de estudio.
- B. Evaluar por medio de inmunoprecipitación o cribado de dos híbridos, si SP1 y STAT3 se están uniendo al promotor de Lin28A, con el fin de evaluar si realmente están favoreciendo su expresión a nivel de mRNA.
- C. Evaluar si el RSV está teniendo un efecto positivo en la expresión de Let-7.
- D. Evaluar la expresión de los miR-216b, miR-92b-3p, miR-622 y otros, con el fin de conocer si el RSV regula la expresión de USP28 a través de ellos.
- E. Evaluar otros blancos de USP28 (como cMYC, LSD1, c-JUN) para ver si también están siendo afectados por la disminución de dicha proteína por el tratamiento con RSV.
- F. Evaluar si el RSV está afectando directamente a MEK1/2 o a ERK1/2, en este modelo de estudio.

Referencias

Amerik, A. Y., & Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1695(1-3), 189-207. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.10.003>

Arenas, A. M. (2018). *Evaluación del efecto del resveratrol sobre la expresión de los genes Lin-28 A y Lin-28 B en las líneas celulares T47D y NCCIT* [Tesis de pregrado]. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Baltanas, F. C., & Santos, E. (2023). Advances in Molecular Research of Oncogenes. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7222. <https://doi.org/10.3390/ijms24087222>

Balzeau, J., Menezes, M. R., Cao, S., & Hagan, J. P. (2017). The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Frontiers in Genetics*, 8. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00031>

Baur, J. A., & Sinclair, D. A. (2006). Therapeutic potential of resveratrol: The in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(6), 493-506. <https://doi.org/10.1038/nrd2060>

BRÅKENHJELM, E., CAO, R., & CAO, Y. (2001). Suppression of angiogenesis, tumor growth, and wound healing by resveratrol, a natural compound in red wine and grapes. *The FASEB Journal*, 15(10), 1798-1800. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0028fje>

Büssing, I., Slack, F. J., & Großhans, H. (2008). Let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 14(9), 400-409. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.07.001>

Cao, D., Allan, R. W., Cheng, L., Peng, Y., Guo, C. C., Dahiya, N., Akhi, S., & Li, J. (2011). RNA-binding protein LIN28 is a marker for testicular germ cell tumors. *Human Pathology*, 42(5), 710-718. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2010.09.007>

Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y., & Ozer, N. K. (2012). Resveratrol: French paradox revisited. *Frontiers in pharmacology*, 3, 141. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00141>

Chang, T.-C., Zeitels, L. R., Hwang, H.-W., Chivukula, R. R., Wentzel, E. A., Dews, M., Jung, J., Gao, P., Dang, C. V., Beer, M. A., Thomas-Tikhonenko, A., & Mendell, J. T. (2009). Lin-28B transactivation is necessary for Myc-mediated let-7 repression and proliferation. *Proceedings of*

the *National Academy of Sciences*, 106(9), 3384-3389.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0808300106>

Chen, I.-T., Cheng, A.-C., Liu, Y.-T., Yan, C., Cheng, Y.-C., Chang, C.-F., & Tseng, P.-H. (2022). Persistent TLR4 Activation Promotes Hepatocellular Carcinoma Growth through Positive Feedback Regulation by LIN28A/Let-7g miRNA. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), 8419. <https://doi.org/10.3390/ijms23158419>

Chen, L., Sun, Y., Wang, J., Jiang, H., & Muntean, A. G. (2016). Differential regulation of the c-Myc/Lin28 axis discriminates subclasses of rearranged MLL leukemia. *Oncotarget*, 7(18), 25208-25223. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8199>

Chen, L., Xu, Z., Li, Q., Feng, Q., Zheng, C., Du, Y., Yuan, R., & Peng, X. (2021). USP28 facilitates pancreatic cancer progression through activation of Wnt/ β -catenin pathway via stabilising FOXM1. *Cell Death & Disease*, 12(10), 887. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-04163-z>

Chien, C.-S., Wang, M.-L., Chu, P.-Y., Chang, Y.-L., Liu, W.-H., Yu, C.-C., Lan, Y.-T., Huang, P.-I., Lee, Y.-Y., Chen, Y.-W., Lo, W.-L., & Chiou, S.-H. (2015). Lin28B/Let-7 Regulates Expression of Oct4 and Sox2 and Reprograms Oral Squamous Cell Carcinoma Cells to a Stem-like State. *Cancer Research*, 75(12), 2553-2565. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2215>

Clague, M. J., Coulson, J. M., & Urbé, S. (2012). Cellular functions of the DUBs. *Journal of Cell Science*, 125(2), 277-286. <https://doi.org/10.1242/jcs.090985>

Cotino-Nájera. (2020). *Regulación negativa de la proteína Lin28A a través de la inhibición de USP28 por el compuesto natural resveratrol en células NCCIT* [Tesis de posgrado]. CINVESTAV-DGBM.

Cotino-Nájera, S., García-Villa, E., Cruz-Rosales, S., Gariglio, P., & Díaz-Chávez, J. (2024). The role of Lin28A and Lin28B in cancer beyond Let-7. *FEBS Letters*, 1873-3468.15004. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.15004>

De Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., & Clifford, G. M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: A worldwide incidence analysis. *The Lancet Global Health*, 8(2), e180-e190. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7)

Delmas, D., Rébé, C., Lacour, S., Filomenko, R., Athias, A., Gambert, P., Cherkaoui-Malki, M., Jannin, B., Dubrez-Daloz, L., Latruffe, N., & Solary, E. (2003). Resveratrol-induced apoptosis is

associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(42), 41482-41490. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304896200>

Diaz, P., Huang, W., Keyari, C. M., Buttrick, B., Price, L., Guilloteau, N., Tripathy, S., Sperandio, V. G., Fronczek, F. R., Astruc-Diaz, F., & Isoherranen, N. (2016). Development and Characterization of Novel and Selective Inhibitors of Cytochrome P450 CYP26A1, the Human Liver Retinoic Acid Hydroxylase. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(6), 2579-2595. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01780>

Farooqi, A., Khalid, S., & Ahmad, A. (2018). Regulation of Cell Signaling Pathways and miRNAs by Resveratrol in Different Cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 652. <https://doi.org/10.3390/ijms19030652>

Fouad, M., Agha, A., Merzabani, M. A., & Shouman, S. (2013). Resveratrol inhibits proliferation, angiogenesis and induces apoptosis in colon cancer cells: Calorie restriction is the force to the cytotoxicity. *Human & Experimental Toxicology*, 32(10), 1067-1080. <https://doi.org/10.1177/0960327113475679>

Fukuda, M., Ogasawara, Y., Hayashi, H., Inoue, K., & Sakashita, H. (2022). Resveratrol Inhibits Proliferation and Induces Autophagy by Blocking SREBP1 Expression in Oral Cancer Cells. *Molecules*, 27(23), 8250. <https://doi.org/10.3390/molecules27238250>

García-Zepeda, S. P., García-Villa, E., Díaz-Chávez, J., Hernández-Pando, R., & Gariglio, P. (2013). Resveratrol induces cell death in cervical cancer cells through apoptosis and autophagy. *European Journal of Cancer Prevention*, 22(6), 577-584. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e328360345f>

Gariglio, P. (2012). *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes* (Camacho. Javier, Vol. 1). Mol. Oncol. Princ. Recent Adv. [https://books.google.com.mx/books?id=xyRZEPYS7JIC&pg=PA64&dq=Gariglio,+P.+\(2012\).+Oncogenes+and+Tumor+Suppressor+Genes&lr=&hl=es&source=gbs_toc_r&cad=2#v=onepage&q=Gariglio%2C%20P.%20\(2012\).%20Oncogenes%20and%20Tumor%20Suppressor%20Genes&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=xyRZEPYS7JIC&pg=PA64&dq=Gariglio,+P.+(2012).+Oncogenes+and+Tumor+Suppressor+Genes&lr=&hl=es&source=gbs_toc_r&cad=2#v=onepage&q=Gariglio%2C%20P.%20(2012).%20Oncogenes%20and%20Tumor%20Suppressor%20Genes&f=false)

- Gresele, P., Cerletti, C., Guglielmini, G., Pignatelli, P., de Gaetano, G., & Violi, F. (2011). Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: An update. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(3), 201-211. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.07.004>
- Grivennikov, S. I., & Karin, M. (2010). Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 21(1), 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.11.005>
- Guo, L., Chen, C., Shi, M., Wang, F., Chen, X., Diao, D., Hu, M., Yu, M., Qian, L., & Guo, N. (2013). Stat3-coordinated Lin-28–let-7–HMGA2 and miR-200–ZEB1 circuits initiate and maintain oncostatin M-driven epithelial–mesenchymal transition. *Oncogene*, 32(45), 5272-5282. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.573>
- Guo, L., Cheng, X., Chen, H., Chen, C., Xie, S., Zhao, M., Liu, D., Deng, Q., Liu, Y., Wang, X., Chen, X., Wang, J., Yin, Z., Qi, S., Gao, J., Ma, Y., Guo, N., & Shi, M. (2019). Induction of breast cancer stem cells by M1 macrophages through Lin-28B-let-7-HMGA2 axis. *Cancer Letters*, 452, 213-225. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.03.032>
- Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- Hafner, M., Max, K. E. A., Bandaru, P., Morozov, P., Gerstberger, S., Brown, M., Molina, H., & Tuschl, T. (2013). Identification of mRNAs bound and regulated by human LIN28 proteins and molecular requirements for RNA recognition. *RNA*, 19(5), 613-626. <https://doi.org/10.1261/rna.036491.112>
- Hamano, R., Miyata, H., Yamasaki, M., Sugimura, K., Tanaka, K., Kurokawa, Y., Nakajima, K., Takiguchi, S., Fujiwara, Y., Mori, M., & Doki, Y. (2012). High expression of Lin28 is associated with tumour aggressiveness and poor prognosis of patients in oesophagus cancer. *British Journal of Cancer*, 106(8), 1415-1423. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.90>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C. J., Creyghton, M. P., van Oudenaarden, A., & Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*, *462*(7273), 595-601. <https://doi.org/10.1038/nature08592>

Haq, S., Das, S., Kim, D.-H., Chandrasekaran, A. P., Hong, S.-H., Kim, K.-S., & Ramakrishna, S. (2019). The stability and oncogenic function of LIN28A are regulated by USP28. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1865*(3), 599-610. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.12.006>

Hasegawa, H., Sohrin, Y., Seki, K., Sato, M., Norisuye, K., Naito, K., & Matsui, M. (2001). Biosynthesis and release of methylarsenic compounds during the growth of freshwater algae. *Chemosphere*, *43*(3), 265-272. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00137-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00137-5)

Helsmoortel, H. H., Bresolin, S., Lammens, T., Cavé, H., Noellke, P., Caye, A., Ghazavi, F., de Vries, A., Hasle, H., Labarque, V., Masetti, R., Stary, J., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Philippé, J., Van Roy, N., Benoit, Y., Speleman, F., Niemeyer, C., Flotho, C., ... De Moerloose, B. (2016). LIN28B overexpression defines a novel fetal-like subgroup of juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*, *127*(9), 1163-1172. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-667808>

Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., & Struhl, K. (2009). An Epigenetic Switch Involving NF- κ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 Links Inflammation to Cell Transformation. *Cell*, *139*(4), 693-706. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.014>

Jaisamut, P., Wanna, S., Limsuwan, S., Chusri, S., Wiwattanawongsa, K., & Wiwattanapatapee, R. (2021). Enhanced Oral Bioavailability and Improved Biological Activities of a Quercetin/Resveratrol Combination Using a Liquid Self-Microemulsifying Drug Delivery System. *Planta Medica*, *87*(04), 336-346. <https://doi.org/10.1055/a-1270-7606>

Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W. W., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., & Pezzuto, J. M. (1997). Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science*, *275*(5297), 218-220. <https://doi.org/10.1126/science.275.5297.218>

Jin, S., Xu, C., Wang, L., Wei, J., & Wang, S. (2020). Impact of Lin28 on lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Oncology Letters*, *21*(2), 97. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12358>

Jodynis-Liebert, J., & Kujawska, M. (2020). Biphasic Dose-Response Induced by Phytochemicals: Experimental Evidence. *Journal of Clinical Medicine*, 9(3), 718. <https://doi.org/10.3390/jcm9030718>

Ko, J.-H., Sethi, G., Um, J.-Y., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Kumar, A. P., Bishayee, A., Ahn, K. S., Ko, J.-H., Sethi, G., Um, J.-Y., Shanmugam, M. K., Arfuso, F., Kumar, A. P., Bishayee, A., & Ahn, K. S. (2017). The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2589. <https://doi.org/10.3390/ijms18122589>

Krsnik, D., Marić, T., Bulić-Jakuš, F., Sinčić, N., & Bojanac, A. K. (2022). LIN28 Family in Testis: Control of Cell Renewal, Maturation, Fertility and Aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7245. <https://doi.org/10.3390/ijms23137245>

Leon-Galicia, I., Diaz-Chavez, J., Garcia-Villa, E., Uribe-Figueroa, L., Hidalgo-Miranda, A., Herrera, L. A., Alvarez-Rios, E., Garcia-Mena, J., & Gariglio, P. (2013). Resveratrol induces downregulation of DNA repair genes in MCF-7 human breast cancer cells. *European Journal of Cancer Prevention*, 22(1), 11-20. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0b013e328353edcb>

Li, M., Chen, H., & Wu, T. (2019). LIN28: A cancer stem cell promoter for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 98, 92-95. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.09.024>

Li, N., Du, Z., Shen, Q., Lei, Q., Zhang, Y., Zhang, M., & Hua, J. (2017). Resveratrol Enhances Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(7), 1928-1935. <https://doi.org/10.1002/jcb.25942>

Lin, X., Shen, J., Dan Peng, He, X., Xu, C., Chen, X., Tanyi, J. L., Montone, K., Fan, Y., Huang, Q., Zhang, L., & Zhong, X. (2018). RNA-binding protein LIN28B inhibits apoptosis through regulation of the AKT2/FOXO3A/BIM axis in ovarian cancer cells. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 3(1), 23. <https://doi.org/10.1038/s41392-018-0026-5>

Lin, Z., Radaeva, M., Cherkasov, A., & Dong, X. (2022). Lin28 Regulates Cancer Cell Stemness for Tumour Progression. *Cancers*, 14(19), 4640. <https://doi.org/10.3390/cancers14194640>

Liu, X., Chen, M., Li, L., Gong, L., Zhou, H., & Gao, D. (2017). Extracellular Signal-regulated Kinases (ERKs) Phosphorylate Lin28a Protein to Modulate P19 Cell Proliferation and Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 292(10), 3970-3976. <https://doi.org/10.1074/jbc.C117.775122>

Liu, Y., Hu, X., Han, C., Wang, L., Zhang, X., He, X., & Lu, X. (2015). Targeting tumor suppressor genes for cancer therapy. *BioEssays*, 37(12), 1277-1286. <https://doi.org/10.1002/bies.201500093>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Lu, L., Katsaros, D., Shaverdashvili, K., Qian, B., Wu, Y., de la Longrais, I. A. R., Preti, M., Menato, G., & Yu, H. (2009). Pluripotent factor lin-28 and its homologue lin-28b in epithelial ovarian cancer and their associations with disease outcomes and expression of let-7a and IGF-II. *European Journal of Cancer*, 45(12), 2212-2218. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.05.003>

Ma, B., Wei, X., Zhou, S., & Yang, M. (2023). MCTS1 enhances the proliferation of laryngeal squamous cell carcinoma via promoting OTUD6B-1 mediated LIN28B deubiquitination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 678, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.08.036>

Maier, C. R., Hartmann, O., Prieto-Garcia, C., Al-Shami, K. M., Schlicker, L., Vogel, F. C. E., Haid, S., Klann, K., Buck, V., Münch, C., Schmitz, W., Einig, E., Krenz, B., Calzado, M. A., Eilers, M., Popov, N., Rosenfeldt, M. T., Diefenbacher, M. E., & Schulze, A. (2023). USP28 controls SREBP2 and the mevalonate pathway to drive tumour growth in squamous cancer. *Cell Death & Differentiation*, 30(7), 1710-1725. <https://doi.org/10.1038/s41418-023-01173-6>

Medina-Aguilar, R., Marchat, L. A., Ocampo, E. A., Gariglio, P., Mena, J. G., Sepúlveda, N. V., Castillo, M. M., & López-Camarillo, C. (2016). Resveratrol inhibits cell cycle progression by targeting Aurora kinase A and Polo-like kinase 1 in breast cancer cells. *Oncology Reports*, 35(6), 3696-3704. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4728>

Mills, W. T., Nassar, N. N., Ravindra, D., Li, X., & Meffert, M. K. (2020). Multi-Level Regulatory Interactions between NF- κ B and the Pluripotency Factor Lin28. *Cells*, 9(12), 2710. <https://doi.org/10.3390/cells9122710>

Missios, P., da Rocha, E. L., Pearson, D. S., Philipp, J., Aleman, M. M., Pirouz, M., Farache, D., Franes, J. W., Kubaczka, C., Tsanov, K. M., Jha, D. K., Pepe-Mooney, B., Powers, J. T., Gregory, R. I., Lee, A. S. Y., Dominguez, D., Ting, D. T., & Daley, G. Q. (2021). LIN28B alters ribosomal dynamics

to promote metastasis in MYCN-driven malignancy. *Journal of Clinical Investigation*, 131(22), e145142. <https://doi.org/10.1172/JCI145142>

Moon, H. J., Lee, N. Y., Do, E. K., Lee, S. Y., Park, G. T., Lim, J. K., Seo, J. K., & Kim, J. H. (2022). Kap1 Regulates the Stability of Lin28A in Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 40(4), 385-396. <https://doi.org/10.1093/stmcls/sxac010>

Morita, K., Han, M., Eves, E. M., Newman, M., Erkeland, S. J., Hammond, S. M., Minn, A. J., & Rosner, M. R. (2006). Multiple mechanisms are involved in regulating the expression of the developmental timing regulator lin-28 in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal*, 25(24), 5794-5804. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601451>

Munshi, A., & Ramesh, R. (2013). Mitogen-Activated Protein Kinases and Their Role in Radiation Response. *Genes & Cancer*, 4(9-10), 401-408. <https://doi.org/10.1177/1947601913485414>

Murray, M. J., Saini, H. K., Siegler, C. A., Hanning, J. E., Barker, E. M., van Dongen, S., Ward, D. M., Raby, K. L., Groves, I. J., Scarpini, C. G., Pett, M. R., Thornton, C. M., Enright, A. J., Nicholson, J. C., Coleman, N., & CCLG. (2013). LIN28 Expression in malignant germ cell tumors downregulates let-7 and increases oncogene levels. *Cancer Research*, 73(15), 4872-4884. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2085>

NCI. (2024). The Genetics of Cancer [Institucional]. *About Cancer*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/genetics>

Nguyen, L. H., Robinton, D. A., Seligson, M. T., Wu, L., Li, L., Rakheja, D., Comerford, S. A., Ramezani, S., Sun, X., Parikh, M. S., Yang, E. H., Powers, J. T., Shinoda, G., Shah, S. P., Hammer, R. E., Daley, G. Q., & Zhu, H. (2014). Lin28b Is Sufficient to Drive Liver Cancer and Necessary for Its Maintenance in Murine Models. *Cancer Cell*, 26(2), 248-261. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.06.018>

OMS. (2022). Cáncer [Institucional]. *Cáncer*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

Peng, F., Li, T.-T., Wang, K.-L., Xiao, G.-Q., Wang, J.-H., Zhao, H.-D., Kang, Z.-J., Fan, W.-J., Zhu, L.-L., Li, M., Cui, B., Zheng, F.-M., Wang, H.-J., Lam, E. W.-F., Wang, B., Xu, J., & Liu, Q. (2017). H19/let-7/LIN28 reciprocal negative regulatory circuit promotes breast cancer stem cell maintenance. *Cell Death & Disease*, 8(1), e2569-e2569. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.438>

- Piskounova, E., Polytarchou, C., Thornton, J. E., LaPierre, R. J., Pothoulakis, C., Hagan, J. P., Iliopoulos, D., & Gregory, R. I. (2011). Lin28A and Lin28B Inhibit let-7 MicroRNA Biogenesis by Distinct Mechanisms. *Cell*, *147*(5), 1066-1079. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.039>
- Pretzsch, E., Max, N., Kirchner, T., Engel, J., Werner, J., Klauschen, F., Angele, M. K., & Neumann, J. (2021). LIN28 promotes tumorigenesis in colorectal cancer but is not associated with metastatic spread. *Pathology - Research and Practice*, *228*, 153669. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153669>
- Prieto-Garcia, C., Tomašković, I., Shah, V. J., Dikic, I., & Diefenbacher, M. (2021). USP28: Oncogene or Tumor Suppressor? A Unifying Paradigm for Squamous Cell Carcinoma. *Cells*, *10*(10), 2652. <https://doi.org/10.3390/cells10102652>
- Qi, M., Xia, Y., Wu, Y., Zhang, Z., Wang, X., Lu, L., Dai, C., Song, Y., Xu, K., Ji, W., & Zhan, L. (2022). Lin28B-high breast cancer cells promote immune suppression in the lung pre-metastatic niche via exosomes and support cancer progression. *Nature Communications*, *13*(1), 897. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28438-x>
- Qiu, C., Ma, Y., Wang, J., Peng, S., & Huang, Y. (2010). Lin28-mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, *38*(4), 1240-1248. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1071>
- Ren, B., Kwah, M. X.-Y., Liu, C., Ma, Z., Shanmugam, M. K., Ding, L., Xiang, X., Ho, P. C.-L., Wang, L., Ong, P. S., & Goh, B. C. (2021). Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives. *Cancer Letters*, *515*, 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.05.001>
- Ren, X., Jiang, M., Ding, P., Zhang, X., Zhou, X., Shen, J., Liu, D., Yan, X., & Ma, Z. (2023). Ubiquitin-specific protease 28: The decipherment of its dual roles in cancer development. *Experimental Hematology & Oncology*, *12*(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s40164-023-00389-z>
- Reyes-Turcu, F. E., Ventii, K. H., & Wilkinson, K. D. (2009). Regulation and Cellular Roles of Ubiquitin-Specific Deubiquitinating Enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, *78*(1), 363-397. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082307.091526>
- Roetman, J. J., Apostolova, M. K. I., & Philip, M. (2022). Viral and cellular oncogenes promote immune evasion. *Oncogene*, *41*(7), 921-929. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02145-1>

Ruíz, G., Valencia-González, H. A., León-Galicia, I., García-Villa, E., García-Carrancá, A., & Gariglio, P. (2018). Inhibition of RAD51 by siRNA and Resveratrol Sensitizes Cancer Stem Cells Derived from HeLa Cell Cultures to Apoptosis. *Stem Cells International*, 2018, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2018/2493869>

Sadowski, M., Suryadinata, R., Tan, A. R., Roesley, S. N. A., & Sarcevic, B. (2012). Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life*, 64(2), 136-142. <https://doi.org/10.1002/iub.589>

Saei, A., Palafox, M., Benoukraf, T., Kumari, N., Jaynes, P. W., Iyengar, P. V., Muñoz-Couselo, E., Nuciforo, P., Cortés, J., Nötzel, C., Kumarakulasinghe, N. B., Richard, J. L. C., Bin Adam Isa, Z. F., Pang, B., Guzman, M., Siqin, Z., Yang, H., Tam, W. L., Serra, V., & Eichhorn, P. J. A. (2018). Loss of USP28-mediated BRAF degradation drives resistance to RAF cancer therapies. *Journal of Experimental Medicine*, 215(7), 1913-1928. <https://doi.org/10.1084/jem.20171960>

Safaeinejad, Z., Kazeminasab, F., Kiani-Esfahani, A., Ghaedi, K., & Nasr-Esfahani, M. H. (2018). Multi-effects of Resveratrol on stem cell characteristics: Effective dose, time, cell culture conditions and cell type-specific responses of stem cells to Resveratrol. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 155, 651-657. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.037>

SEOM. (2019). ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? [Institucional]. SEOM. <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>

Serra, R. W., Fang, M., Park, S. M., Hutchinson, L., & Green, M. R. (2014). A KRAS-directed transcriptional silencing pathway that mediates the CpG island methylator phenotype. *eLife*, 3, e02313. <https://doi.org/10.7554/eLife.02313>

Shen, H., Yang, Y., Zhao, L., Yuan, J., & Niu, Y. (2016). Lin28A and androgen receptor expression in ER-/Her2+ breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 156(1), 135-147. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3744-9>

Shi, H., Xie, J., Wang, K., Li, W., Yin, L., Wang, G., Wu, Z., Ni, J., Mao, W., Guo, C., & Peng, B. (2021). LINC01451 drives epithelial-mesenchymal transition and progression in bladder cancer cells via LIN28/TGF- β /Smad pathway. *Cellular Signalling*, 81, 109932. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.109932>

Song, Y., Chen, Y., Li, Y., Lyu, X., Cui, J., Cheng, Y., Zheng, T., Zhao, L., & Zhao, G. (2019). Resveratrol Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition in GBM by Regulating Smad-Dependent Signaling. *BioMed Research International*, 2019, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2019/1321973>

Sun, L., & Chen, Z. J. (2004). The novel functions of ubiquitination in signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(2), 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.02.005>

Taylor, E. J. M., Yu, Y., Champer, J., & Kim, J. (2014). Resveratrol Demonstrates Antimicrobial Effects Against *Propionibacterium acnes* In Vitro. *Dermatology and therapy*, 4(2), 249-257. <https://doi.org/10.1007/s13555-014-0063-0>

The human protein atlas. (2020a). [Human Protein Atlas]. *Lin-28 Homolog B*. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000187772-LIN28B/cell+line>

The human protein atlas. (2020b). [Human Protein Atlas]. *Lin-28 Homolog A*. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000131914-LIN28A/cell+line>

TINHOFER, I., BERNHARD, D., SENFTER, M., ANETHER, G., LOEFFLER, M., KROEMER, G., KOFLER, R., CSORDAS, A., & GREIL, R. (2001). Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2. *The FASEB Journal*, 15(9), 1613-1615. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0675fje>

Tsanov, K. M., Pearson, D. S., Wu, Z., Han, A., Triboulet, R., Seligson, M. T., Powers, J. T., Osborne, J. K., Kane, S., Gygi, S. P., Gregory, R. I., & Daley, G. Q. (2017). LIN28 phosphorylation by MAPK/ERK couples signalling to the post-transcriptional control of pluripotency. *Nature Cell Biology*, 19(1), 60-67. <https://doi.org/10.1038/ncb3453>

Tsialikas, J., & Romer-Seibert, J. (2015). LIN28: Roles and regulation in development and beyond. *Development*, 142(14), 2397-2404. <https://doi.org/10.1242/dev.117580>

Ustianenko, D., Hrossova, D., Potesil, D., Chalupnikova, K., Hrazdilova, K., Pachernik, J., Cetkovska, K., Uldrijan, S., Zdrahal, Z., & Vanacova, S. (2013). Mammalian DIS3L2 exoribonuclease targets the uridylylated precursors of let-7 miRNAs. *RNA*, 19(12), 1632-1638. <https://doi.org/10.1261/rna.040055.113>

Varoni, E. M., Lo Faro, A. F., Sharifi-Rad, J., & Iriti, M. (2016). Anticancer Molecular Mechanisms of Resveratrol. *Frontiers in Nutrition*, 3, 8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00008>

Viswanathan, S. R., & Daley, G. Q. (2010). Lin28: A MicroRNA Regulator with a Macro Role. *Cell*, 140(4), 445-449. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2010.02.007>

Viswanathan, S. R., Powers, J. T., Einhorn, W., Hoshida, Y., Ng, T. L., Toffanin, S., O'Sullivan, M., Lu, J., Phillips, L. A., Lockhart, V. L., Shah, S. P., Tanwar, P. S., Mermel, C. H., Beroukhim, R., Azam, M., Teixeira, J., Meyerson, M., Hughes, T. P., Llovet, J. M., ... Daley, G. Q. (2009). Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nature Genetics*, 41(7), 843-848. <https://doi.org/10.1038/ng.392>

Wang, F.-M., Hu, Z., Liu, X., Feng, J. Q., Augsburger, R. A., Gutmann, J. L., & Glickman, G. N. (2019). Resveratrol represses tumor necrosis factor α /c-Jun N-terminal kinase signaling via autophagy in human dental pulp stem cells. *Archives of Oral Biology*, 97, 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.10.020>

Wang, T., He, Y., Zhu, Y., Chen, M., Weng, M., Yang, C., Zhang, Y., Ning, N., Zhao, R., Yang, W., Jin, Y., Li, J., Redpath, R. J. R. E., Zhang, L., Jin, X., Zhong, Z., Zhang, F., Wei, Y., Shen, G., ... Li, X. (2021). Correction: Comparison of the expression and function of Lin28A and Lin28B in colon cancer. *Oncotarget*, 12(4), 392-393. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27903>

Wang, T., Wang, G., Hao, D., Liu, X., Wang, D., Ning, N., & Li, X. (2015). Aberrant regulation of the LIN28A/LIN28B and let-7 loop in human malignant tumors and its effects on the hallmarks of cancer. *Molecular cancer*, 14, 125. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0402-5>

Wang, X., Hu, H., & Liu, H. (2018). RNA binding protein Lin28B confers gastric cancer cells stemness via directly binding to NRP-1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 104, 383-389. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.064>

Wang, X., Liu, Z., Zhang, L., Yang, Z., Chen, X., Luo, J., Zhou, Z., Mei, X., Yu, X., Shao, Z., Feng, Y., Fu, S., Zhang, Z., Wei, D., Jia, L., Ma, J., & Guo, X. (2018). Targeting deubiquitinase USP28 for cancer therapy. *Cell Death & Disease*, 9(2), 186. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0208-z>

Wu, H., Chen, L., Zhu, F., Han, X., Sun, L., & Chen, K. (2019). The Cytotoxicity Effect of Resveratrol: Cell Cycle Arrest and Induced Apoptosis of Breast Cancer 4T1 Cells. *Toxins*, 11(12), 731. <https://doi.org/10.3390/toxins11120731>

Xia, L., & Wang, H. (2022). lncRNA LUCAT1/ELAVL1/LIN28B/SOX2 Positive Feedback Loop Promotes Cell Stemness in Triple-Negative Breast Cancer. *The Breast Journal*, 2022, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2022/7689718>

Xiong, H., Zhao, W., Wang, J., Seifer, B. J., Ye, C., Chen, Y., Jia, Y., Chen, C., Shen, J., Wang, L., Sui, X., & Zhou, J. (2017). Oncogenic mechanisms of Lin28 in breast cancer: New functions and therapeutic opportunities. *Oncotarget*, 8(15), 25721-25735. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14891>

Xu, J., Zhang, Z., Huang, L., Xiong, J., Zhou, Z., Yu, H., Wu, L., Liu, Z., & Cao, K. (2021). Let-7a suppresses Ewing sarcoma CSCs' malignant phenotype via forming a positive feedback circuit with STAT3 and lin28. *Journal of Bone Oncology*, 31, 100406. <https://doi.org/10.1016/j.jbo.2021.100406>

Xue, D., Peng, Y., Wang, F., Allan, R. W., & Cao, D. (2011). RNA-binding protein LIN28 is a sensitive marker of ovarian primitive germ cell tumours: Markers in germ cell tumours. *Histopathology*, 59(3), 452-459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2011.03949.x>

Yamamoto, H., Uchida, Y., Kurimoto, R., Chiba, T., Matsushima, T., Ito, Y., Inotsume, M., Miyata, K., Watanabe, K., Inada, M., Goshima, N., Uchida, T., & Asahara, H. (2023). RNA-binding protein LIN28A upregulates transcription factor HIF1 α by posttranscriptional regulation via direct binding to UGAU motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 299(1), 102791. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102791>

Yang, D.-H., & Moss, E. G. (2003). Temporally regulated expression of Lin-28 in diverse tissues of the developing mouse. *Gene Expression Patterns*, 3(6), 719-726. [https://doi.org/10.1016/S1567-133X\(03\)00140-6](https://doi.org/10.1016/S1567-133X(03)00140-6)

Yang, J., Bennett, B. D., Luo, S., Inoue, K., Grimm, S. A., Schroth, G. P., Bushel, P. R., Kinyamu, H. K., & Archer, T. K. (2015). LIN28A Modulates Splicing and Gene Expression Programs in Breast Cancer Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 35(18), 3225-3243. <https://doi.org/10.1128/MCB.00426-15>

You, X., Liu, F., Zhang, T., Lv, N., Liu, Q., Shan, C., Du, Y., Kong, G., Wang, T., Ye, L., & Zhang, X. (2014). Hepatitis B virus X protein upregulates Lin28A/Lin28B through Sp-1/c-Myc to enhance

the proliferation of hepatoma cells. *Oncogene*, 33(4), 449-460.
<https://doi.org/10.1038/onc.2012.618>

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*, 318(5858), 1917-1920.
<https://doi.org/10.1126/science.1151526>

Yun, J. H., Kim, K.-A., Yoo, G., Kim, S. Y., Shin, J. M., Kim, J. H., Jung, S. H., Kim, J., & Nho, C. W. (2017). Phenethyl isothiocyanate suppresses cancer stem cell properties in vitro and in a xenograft model. *Phytomedicine*, 30, 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.01.015>

Zhang, J. (2020). MicroRNA-216b suppresses the cell growth of hepatocellular carcinoma by inhibiting Ubiquitin-specific peptidase 28 expression. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 36(6), 423-428. <https://doi.org/10.1002/kjm2.12193>

Zhang, J., Ratanasirintrao, S., Chandrasekaran, S., Wu, Z., Ficarro, S. B., Yu, C., Ross, C. A., Cacchiarelli, D., Xia, Q., Seligson, M., Shinoda, G., Xie, W., Cahan, P., Wang, L., Ng, S.-C., Tintara, S., Trapnell, C., Onder, T., Loh, Y.-H., ... Daley, G. Q. (2016). LIN28 Regulates Stem Cell Metabolism and Conversion to Primed Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 19(1), 66-80.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.05.009>

Zhao, L., Zhang, T., Feng, X., Chang, J., Suo, F., Ma, J., Liu, Y., Liu, Y., Zheng, Y., & Liu, H. (2019). USP28 contributes to the proliferation and metastasis of gastric cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(5), 7657-7666. <https://doi.org/10.1002/jcb.28040>

Zhou, J., Ng, S.-B., & Chng, W.-J. (2013). LIN28/LIN28B: An emerging oncogenic driver in cancer stem cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(5), 973-978.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.006>

Zhuo, Z.-L., Xian, H.-P., Sun, Y.-J., Long, Y., Liu, C., Liang, B., & Zhao, X.-T. (2022). Long noncoding RNA ZNF1-AS1 promotes the invasion and proliferation of gastric cancer cells by regulating LIN28 and CAPRIN1. *World Journal of Gastroenterology*, 28(34), 4973-4992.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i34.4973>