



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

UNIDAD ZACATENCO

Departamento de genética y biología molecular

Efecto del resveratrol sobre la regulación de LIN28A en la línea celular de cáncer de
mama T47D

T E S I S

Que presenta:

ELVY SAMANTHA CRUZ ROSALES

Para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIAS
En la especialidad de
Genética y Biología Molecular

Directores de Tesis:

Dr. Patricio Gariglio Vidal
Dr. José de la Luz Díaz Chávez

Ciudad de México

Septiembre 2023

ASESORES

Dr. José Efraín Garrido Guerrero

Investigador CINEVESTAV 3C

Departamento Genética y Biología Molecular

CINEVESTAV, Zacatenco

egarrido@cinvestav.mx

Dr. Bulmaro Cisneros Vega

Investigador CINEVESTAV 3C

Departamento Genética y Biología Molecular

CINEVESTAV, Zacatenco

bcisnero@cinvestav.mx

La presente tesis fue desarrollada y realizada gracias al apoyo del
**Programa Nacional de Becas de Posgrado Del Consejo Nacional de
Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT)** No. de registro:
1140498

Dedicado a mi familia, gracias por ser siempre mi lugar seguro.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Patricio Gariglio Vidal por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo y por siempre estar al pendiente de mis avances y dispuesto a ayudarme aconsejarme para mejorar mi proyecto.

Al Dr. José de la Luz Díaz Chávez, por el tremendo apoyo para que este proyecto fuera posible, por todos sus consejos y asesorías.

A mis asesores, el Dr. Efraín Garrido Guerrero y el Dr. Bulmaro Cisneros Vega por sus observaciones y recomendaciones en cada seminario, y por el apoyo brindado para la revisión de este trabajo.

Al biólogo Enrique García Villa, por siempre apoyarme cuando las cosas no salían bien y felicitarme cuando lo hacían. Por todo el conocimiento brindado y las ideas para mejorar mi proyecto.

A Gabriela Mora Macías por su apoyo en todo el aspecto administrativo y su paciencia al explicarme cada proceso que debía llegar a cabo.

A la futura doctora Sandra Paola Cotino Nájera, porque sin ella este proyecto no hubiera sido posible, por enseñarme tanto y siempre estar al pendiente de mis avances. Por brindarme su amistad y palabras de aliento cuando las necesitaba. Siempre he pensado que el conocimiento está hecho para compartirse y definitivamente Sandy ha reforzado esa idea.

A mis padres, Ana y Hector, por creer en mí en cada paso de mi vida, por siempre buscar la forma de estar presentes y hacerme sentir siempre respaldada. No existe guía para ser padre, pero ustedes lo han hecho increíble. Espero me alcance la vida para retribuirles aunque sea un poco de lo mucho que me han dado.

A Arantza Cruz, porque además de ser mi hermana es mi mejor amiga. Por tantísimas palabras de aliento y abrazos reconfortantes.

A Marco Alejandro Cruz Rosales, por ser mi mayor motivación desde el día que llego a este mundo.

A Michel González Diliegros por ser la porra #1. Por siempre estar ahí cuando lo necesito e inspirarme a ser mejor cada día en todos los aspectos. Gracias por todo tu amor y por siempre creer en mí.

A mis amigos, Cristhian, Dariel y Mary, por hacer de la maestría una experiencia inolvidable. Gracias por todo su apoyo, por las risas y las lágrimas compartidas. Los llevo siempre en mi corazón.

ÍNDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	11
Cáncer	11
LIN28	12
Función de LIN28	14
Regulación de LIN28 a través de los factores de transcripción STAT3 y SP1	17
1. Factor de transcripción STAT3	17
2. Factor de transcripción SP1	21
LIN28 en cáncer	23
Resveratrol	25
ANTECEDENTES	30
JUSTIFICACIÓN	36
HIPOTESIS	37
OBJETIVOS	37
General:	37
Particulares:	37
DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO	38
METODOLOGÍA	38
Cultivo de líneas celulares	38
Ensayo de proliferación celular (MTT)	39
Tratamientos con resveratrol	39
Extracción de RNA por método de TRIzol®	40
Cuantificación de RNA	41
Síntesis de cDNA (Retrotranscripción)	41
qPCR	42

Extracción de Proteína por el método de RIPA	43
Gel de integridad de Proteínas	43
Tinción de azul de coomasie	44
Western Blot	45
RESULTADOS	46
El resveratrol ejerce un efecto anti-proliferativo dosis dependiente en células T47D	46
Efecto del resveratrol sobre el mRNA de LIN28A, STAT3 y SP1	47
Efecto del resveratrol sobre la proteína de LIN28A	49
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES	57
BIBLIOGRAFÍA	58

RESUMEN

LIN28A es una proteína de unión al RNA (RBP) que desempeña un papel importante en la regulación de la expresión génica y la diferenciación celular. Tiene la capacidad de unirse a RNAs mensajeros y bloquear la traducción de estos en proteínas. Cuando LIN28A se sobreexpresa en adultos puede contribuir a la transformación celular y la formación de tumores, permitiendo a las células cancerígenas mantener características indiferenciadas similares a las de las células madre favoreciendo la progresión del cáncer y ocasionando un peor pronóstico. Diversos estudios han demostrado que los factores de transcripción STAT3 y SP1, también considerados oncogénicos, tienen la capacidad de regular positivamente la expresión de LIN28A. Dada la significativa implicación de LIN28A en los procesos fundamentales de la progresión del cáncer, es importante encontrar compuestos terapéuticos que puedan disminuir su expresión. En este sentido, se ha reportado que el resveratrol es un polifenol que se encuentra en varios alimentos y ha atraído la atención en el campo de la biología molecular debido a sus posibles implicaciones en la prevención y tratamiento del cáncer; por ejemplo, se ha observado que puede inhibir varios oncogenes como c-Myc, Bcl-2, VEGF, entre otros. Interesantemente, en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que el resveratrol disminuye la expresión de LIN28A en la línea celular NCCIT (Cotino-Nájera, 2020). Sin embargo, el mecanismo por el cual puede ejercer este efecto no es bien conocido. Por lo que, en este trabajo evaluamos el efecto del resveratrol sobre LIN28A, STAT3 y SP1 en la línea celular T47D, para conocer si el resveratrol disminuye los niveles de mRNA y proteína de LIN28A, a través de la regulación de STAT3 y SP1. Encontramos que el resveratrol influye en la expresión de LIN28A, STAT3 y SP1; sin embargo, no hay un patrón uniforme de comportamiento entre estos tres. Por lo tanto, aún no podemos afirmar que el resveratrol regule la transcripción de LIN28A a través de estos factores en esta línea celular. Del mismo modo, encontramos que la inhibición de la proteína de LIN28A es mucho menos drástica que la del mRNA, resultados que concuerdan con estudios realizados anteriormente en nuestro laboratorio en otras líneas celulares. Esto nos

abre un interesante campo de estudio para comenzar a descartar o encontrar el mecanismo por el cual el resveratrol puede disminuir la expresión de LIN28A.

ABSTRACT

LIN28A is an RNA-binding protein (RBP) that plays a crucial role in the regulation of gene expression and cellular differentiation. It has the ability to bind to messenger RNAs and inhibit their translation into proteins. When LIN28A is overexpressed in adults, it can contribute to cellular transformation and tumor formation, allowing cancer cells to maintain undifferentiated characteristics similar to stem cells, thus promoting cancer progression and resulting in a poorer prognosis. Several studies have demonstrated that the transcription factors STAT3 and SP1, also considered oncogenic, have the capacity to positively regulate the expression of LIN28A. Given the significant implication of LIN28A in fundamental processes of cancer progression, it is important to identify therapeutic compounds that can decrease its expression. In this regard, resveratrol, a polyphenol found in various foods, has attracted attention in the field of molecular biology due to its potential implications in cancer prevention and treatment. For example, it has been observed that resveratrol can inhibit several oncogenes such as c-Myc, Bcl-2, VEGF, among others. Interestingly, our research group has demonstrated that resveratrol decreases the expression of LIN28A in the NCCIT cell line (Cotino-Nájera, 2020). However, the mechanism by which it can exert this effect is not well understood. In this study, we evaluated the effect of resveratrol on LIN28A, STAT3, and SP1 in the T47D cell line to determine if resveratrol reduces the levels of LIN28A mRNA and protein through the regulation of STAT3 and SP1. We found that resveratrol influences the expression of LIN28A, STAT3, and SP1; however, there is no uniform pattern of behavior among these three. Therefore, we cannot yet conclude that resveratrol regulates the transcription of LIN28A through these factors in this cell line. Likewise, we found that the inhibition of LIN28A protein is much less drastic than that of mRNA, consistent with previous studies conducted in our laboratory in other cell lines. This opens an intriguing field of study to begin to rule out or discover the mechanism by which resveratrol can decrease the expression of LIN28A.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer es el resultado de diversas alteraciones en genes críticos que controlan procesos como la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular. En condiciones normales, las células humanas se generan por división celular, cuando estas células envejecen o sufren un daño en el DNA irreparable van a apoptosis y se generan nuevas células para reemplazarlas. Sin embargo, algunas células sobreviven y continúan con su ciclo de vida, estas células suelen crecer de forma incontrolada dando origen a tumores cancerígenos o benignos. El cáncer se caracteriza por la acumulación de diversos eventos que dañan las células como la inestabilidad cromosómica, la inactivación de las proteínas reguladoras del ciclo celular, la inhibición de la apoptosis y las modificaciones epigenéticas, entre otros (Ocádiz-Delgado. *et al.*, 2012). Las células cancerígenas que forman los tumores malignos tienen la capacidad de invadir otros tejidos, proceso conocido como metástasis, el cual implica la dispersión de células tumorales de una lesión primaria hacia órganos distales y es la principal causa de las altas cifras de letalidad en cáncer. Dicha migración celular necesita de diversos mecanismos celulares, algunos de éstos son la invasión a través del estroma, la evasión y modulación del microambiente tisular y la resistencia a la intervención terapéutica (Suhail. *et al.*, 2019). Cada año se reportan alrededor de 14.100 millones de nuevos casos de cáncer (7.400 millones de hombres y 6.600 millones de mujeres) y más de 8.200 millones de muertes (4.600 millones de hombres y 3.500 millones de mujeres), siendo la segunda causa de mortalidad en el mundo (Vervandier-Fasseur & Latruffe, 2019).

Podemos definir a un oncogén como la forma mutante de un proto-oncogén, que antes de sufrir una mutación favorece el crecimiento celular normal y después de sufrir dicha mutación favorece la proliferación celular descontrolada ayudando al crecimiento de las células cancerosas (Instituto Nacional del Cáncer, 2019). Es importante mencionar que a comparación de los proto-oncogenes, los genes supresores de tumor pueden contribuir al

cáncer únicamente cuando son inactivados por una mutación o regulación epigenética, esto provoca que la célula no tenga las herramientas necesarias para evitar la división celular inapropiada. A diferencia de los genes supresores de tumores, que suelen interrumpirse debido a eliminaciones en la cantidad de copias y mutaciones que provocan la pérdida de función (nonsense y frameshift), los oncogenes en su mayoría se activan debido a amplificaciones localizadas y mutaciones que causan errores en la secuencia genética (missense). Los genes supresores de tumores a menudo experimentan una inactivación en ambos alelos, mientras que los oncogenes suelen activarse mediante eventos únicos y heterocigotos que ejercen un efecto dominante (Saito Y. et al. 2020). Este proyecto se enfoca específicamente en el oncogén LIN28, el cual será descrito a continuación.

LIN28

LIN28 es una proteína relativamente pequeña (<30kDa), que ejerce su función a través de la unión a RNA; es conocida por su papel en la promoción de la pluripotencia y el mecanismo más estudiado por el cual ejerce esta función es a través de la regulación negativa del microRNA let-7. LIN28 favorece la inducción de la dediferenciación celular tanto de forma dependiente como independiente de let-7. Esta proteína se caracterizó por primera vez en el nematodo *Caenorhabditis elegans* como un importante regulador de su desarrollo (Viswanathan & Daley, 2010).

C. elegans y *Drosophila melanogaster* tienen un único gen LIN28, mientras que los vertebrados tienen dos genes parálogos de LIN28: LIN28A y LIN28B. Todas las proteínas LIN28 pueden identificarse por contener un dominio de choque frío (CSD) y dos dominios de dedos de zinc de cisteína e histidina (CCHC), los cuales son capaces de unirse al RNA. La estructura del CSD es de barril beta y el dominio nudillo de zinc CCHC es un motivo que se encuentra normalmente en los retrovirus (fig. 1); ambos parálogos son expresadas específicamente en células madre embrionarias (Moss & Tang, 2003). LIN28A y LIN28B tienen una alta identidad de secuencia en estas regiones, pero difieren en algunos aspectos. Por ejemplo, LIN28B contiene una región de cola extendida en el extremo C-terminal de la proteína (Lee. et al. 2014) y también contiene una señal de localización nuclear (Piskounova.

et al. 2008). LIN28A se localiza predominantemente en el citoplasma de las células, aunque puede desplazarse hacia y desde el núcleo. LIN28B, en cambio, se encuentra en el núcleo, concretamente en el nucléolo (Tzialikas & Romer-Seibert, 2015).

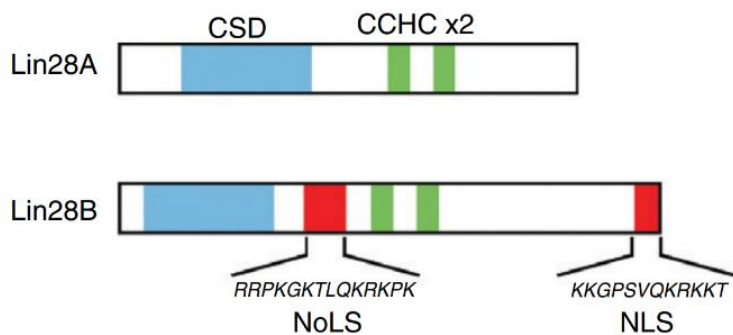


Figura 1. Dominios de las proteínas LIN28A y LIN28B. Ambos comparten una importante identidad de secuencia proteica y dominios comunes, incluyendo un dominio de choque frío (CSD, azul) y dedos de zinc CCHC

(verde). LIN28B contiene tanto una señal de localización nuclear (NLS) como una nucleolar (NoLS) (Thornton & Gregory, 2012).

Fisiológicamente, la sobreexpresión de ambos parálogos de LIN28 aumenta la capacidad de las células musculares para captar glucosa, provoca un aumento del tamaño total del cuerpo junto con un aumento proporcional del tamaño de los órganos, lo que probablemente se deba a un aumento de la proliferación celular. También retrasa el inicio de la pubertad, incluyendo el aplazamiento de la apertura vaginal. Mientras que su pérdida da lugar a la letalidad embrionaria, a la reducción del crecimiento, la acumulación de grasa, la reducción del tamaño del cerebro (Yang. *et al.*, 2015) y resistencia a la insulina (Shinoda. *et al.*, 2013).

Se sabe que LIN28 se expresa en fases tempranas del desarrollo acumulándose en cuerpos precursores nucleolares de ratones y humanos en la embriogénesis, sobre todo en tejidos indiferenciados (Vogt. *et al.*, 2012). A medida que el desarrollo avanza la expresión de esta proteína se limita solo a algunos tejidos como lo son algunas células epiteliales, incluidas las de los arcos branquiales, los pulmones, el riñón, células musculares cardíacas y el neuroepitelio (Yang y Moss, 2003). La expresión en el epitelio pulmonar va disminuyendo conforme va diferenciándose hasta estar totalmente ausente. Una vez completado el desarrollo, LIN28 sigue expresándose en el adulto en las células epiteliales del asa de Henle

y del conducto colector del riñón, en el músculo cardíaco, esquelético y en los eritrocitos (de Vasconcellos. et al., 2014). En la mayoría de los casos, LIN28 se expresa en tipos de células indiferenciadas y pluripotentes. También se expresa mucho en las células madre embrionarias (ESCs) y disminuye en respuesta a la diferenciación (Moss & Tang, 2003). En conjunto, LIN28 tiene un papel evolutivamente conservado que promueve los destinos celulares tempranos e indiferenciados y debido a esto es conocida como un marcador de pluripotencia. En consonancia con esto, la expresión de LIN28 en cáncer se ha asociado con tumores menos diferenciados y más agresivos (Tzialikas & Romer-Seibert, 2015).

Función de LIN28

Entre los miRNAs más antiguos evolutivamente y altamente conservados está la familia let-7. Ésta cual se caracteriza por favorecer la diferenciación de células madre, así como por su función como supresor de tumores. La regulación post-transcripcional de genes por medio de los miRNAs es un mecanismo que se encuentra involucrado en muchos procesos biológicos (Thornton & Gregory, 2012), incluyendo la oncogénesis, ya que se sabe que los tumores humanos muestran una reducción global de la expresión de miRNAs. Esto se debe a la inhibición de la vía de síntesis de los miRNAs por el bloqueo de las enzimas que llevan a cabo su procesamiento promoviendo así la transformación celular y la tumorigénesis (Viswanathan. et al., 2009). La regulación post-transcripcional de los genes por parte de los miRNAs es un mecanismo regulador cada vez más estudiado que interviene en casi todos los procesos biológicos de la vida multicelular. La vía de los miRNAs fue identificada por primera vez en el nematodo *C. elegans*, en donde los miRNAs se encargan de promover o retrasar la progresión de su desarrollo. Esta clase de miRNAs, incluyendo a la familia let-7 funciona dirigiendo la traducción de otros genes heterocrónicos como LIN28.

La familia let-7 de mamíferos comprende doce miembros expresados desde ocho *loci* distintos (let7a-1, -2, -3; let-7b; let-7c; let-7d; let-7e; let-7f-1, -2; let-7g; let-7i; miR-98) los cuales están distribuidos por todo el genoma y se expresan a niveles altos en células diferenciadas (Johnson, S.M. et al. 2005). Al estudiar la regulación de let-7, se observó que durante la diferenciación de ESC de ratón había una discrepancia entre la transcripción de

pri-let-7 y un retraso de la acumulación de let-7 maduro, lo que llevó a pensar que existía un factor regulador negativo que funcionaba sobre el procesamiento de let-7 en células indiferenciadas; diversos análisis de espectrometría de masas posteriores revelaron que las dos proteínas que interactúan y retardan el procesamiento de let-7 son LIN28A y LIN28B (Thornton & Gregory, 2012).

Previamente, se había reportado que la sobreexpresión de LIN28A/B en células diferenciadas reprime potente y específicamente los niveles de let-7 maduro. También se ha observado que el knockout de LIN28A en células indiferenciadas o de LIN28B en células cancerosas es suficiente para mitigar la represión del procesamiento de let-7 (Rybak, A. *et al.* 2008). Se concluyó que la regulación negativa de la expresión de let-7 maduro durante el desarrollo embrionario, la diferenciación de las células madre y varios tipos de cáncer se controla principalmente a través del bloqueo post-transcripcional de la biogénesis de let-7 por ambos parálogos de LIN28 (Thornton & Gregory, 2012). Es importante mencionar que los mRNAs de LIN28A/B son blancos de let-7, por lo que el eje LIN28/Let-7 representa una retroalimentación doblemente negativa entre ambos, promoviendo un destino celular diferenciado o embrionario, respectivamente (Rybak, A. *et al.* 2008). Este eje es fundamental para mantener un destino celular deseado y dirigir la proliferación, el crecimiento y la utilización de energía a nivel celular, así como el desarrollo y la homeostasis de los tejidos.

Vía dependiente de let-7. La regulación negativa de los miRNAs let-7 es por mucho el mecanismo mejor caracterizado de LIN28, el cual puede unirse tanto al pri- como al pre-let-7 *in vivo* y bloquear su procesamiento. Específicamente, LIN28A se une al motivo GGAG dentro de let-7, el cual es evolutivamente conservado. En mamíferos este motivo se encuentra en el bucle de tallo de let-7, mientras que en nematodos está en el transcrito primario, río abajo de pre-let-7. En el núcleo, LIN28A se une co-transcripcionalmente a pri-let-7 y bloquea su procesamiento por la enzima Drosha (procesamiento de miRNAs) (Van Wynsberghe. *et al.*, 2011). En ESC humanas y células madre/progenitoras neuronales, se ha demostrado que la proteína de unión a ARN musashi 1 (MSI1) aumenta la localización de LIN28A en el núcleo. MSI1 actúa de forma sinérgica con LIN28A para bloquear el procesamiento del pri-let-7, que se produce en el núcleo. Por el contrario, LIN28B secuestra

a pri-let-7 y bloquea aún más su procesamiento (Piskounova. et al., 2011). En el citoplasma, LIN28A se une a pri-let-7 para bloquear su procesamiento por Dicer e induce la oligouridilación del extremo 3' de pri-let-7. Una vez que sucede la oligouridilación, pre-let-7 se degrada rápidamente (fig. 2) (Tzialikas & Romer-Seibert, 2015).

Vía independiente de let-7. Diversos artículos de investigación han demostrado que al igual que en *C. elegans*, en mamíferos, LIN28 tiene la capacidad de llevar a cabo funciones independientes de let-7. Por ejemplo, en un estudio realizado por Balzer y colaboradores (2010), los ratones transgénicos que sobre expresaban LIN28A mostraron un aumento en el tamaño de sus órganos en comparación con sus compañeros de camada de tipo silvestre, incluso en los tejidos en los que la expresión de let-7 no se veía afectada. También se ha descrito que LIN28 altera la expresión genética durante la neurogliogénesis, antes de la regulación de let-7 (Balzer. et al. 2010). Otros dos estudios describieron que LIN28A promueve la proliferación de las ESCs mediante el aumento de la traducción de los mRNAs relacionados con el ciclo celular como la ciclina A/B, CDK4, CCNB1; también puede regular otros mRNAs que tienen función en procesos importantes como el metabolismo de la glucosa, entre ellos se encuentran receptores de insulina, receptores IGF, IRS2/4, HMGA2, entre otros sin alterar el procesamiento de let-7. Otros de sus blancos importantes son algunos componentes de histonas como la histona H2A, H4H y H1FX, así como genes de desarrollo embrionario como Peg3, Sall4, Oct4 y su homólogo LIN28B. En conjunto, está claro que las funciones independientes de let-7 de LIN28 son importantes en varios contextos del desarrollo (Tzialikas & Romer-Seibert, 2015).

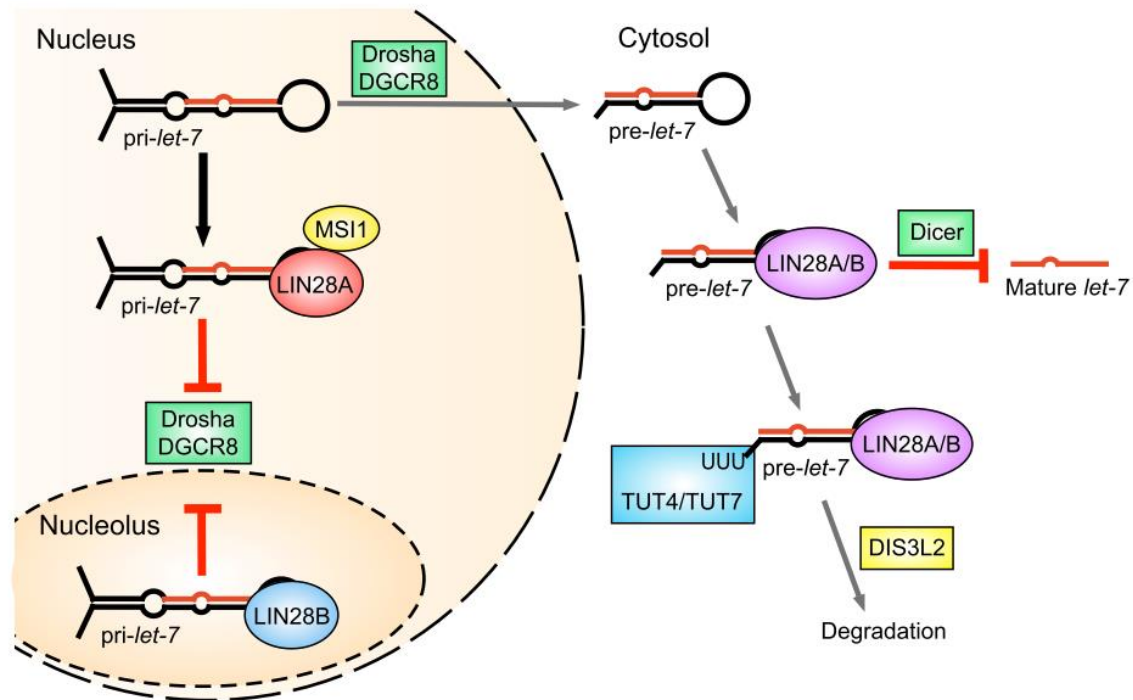


Figura 2. LIN28A/B se une tanto a pri-let-7 como a pre-let-7 in vivo y bloquea su procesamiento (Chang, et al., 2013).

Regulación de LIN28 a través de los factores de transcripción STAT3 y SP1

1. Factor de transcripción STAT3

La familia de los transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT) consta de siete miembros estructuralmente similares y altamente conservados, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6 (Furtek, S.L. et al. 2016). Estructuralmente cuentan con: un dominio N-terminal (NH₂), un dominio coiled-coil (CCD), un dominio de unión al ADN (DBD), un dominio linker (LD), un dominio de homología SRC 2 (SH2) y un dominio de transactivación (TAD) (fig. 3). Se ha evidenciado que STAT3 tiene dos isoformas principales, α y β que difieren por la longitud del TAD (~50 residuos en STAT3 α y ~7 residuos en STAT3 β). Las funciones biológicas de las dos isoformas han sido objeto de discusión desde su descubrimiento. Sin embargo, debido al elevado desorden que marca esta región proteica ha sido escasamente caracterizada desde el punto de vista estructural (Sgrignani, J. et al. 2018). Se ha observado que específicamente STAT3 está fuertemente sobreexpresado en

diversos tipos de cáncer como el cáncer de mama, por lo que se le considera un factor de transcripción oncogénico.

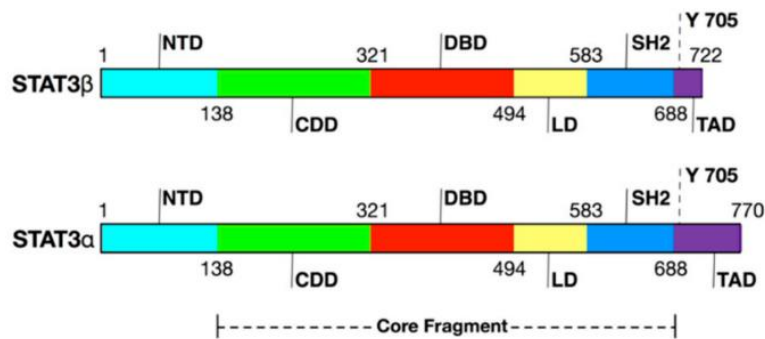


Figura 3. Esquemas de los dominios de STAT3 α y STAT3 β (Sgrignani, J. et al. 2018).

La activación de STAT3 puede estar dada a través de varias citoquinas como la interleucina 6 (IL-6) y la interleucina 10 (IL-10), así como factores de crecimiento como el epidérmico (EGF), el factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). En células cancerosas la vía de señalización más estudiada para la activación de STAT3 es la IL-6/STAT3, en donde IL-6 se une al receptor α de la IL-6 (IL-6R) unido a la membrana y al receptor β de la IL-6 (también conocido como gp130). El complejo IL-6/IL-6R/gp130 activa la fosforilación de las JAK, seguida de la fosforilación y activación de STAT3. Los factores de crecimiento, como el FGF, el IGF y el EGF, también pueden fosforilar STAT3 uniéndose a sus receptores de membrana correspondientes. A continuación, STAT3 fosforilada forma un homodímero y se transloca al núcleo para unirse a la región promotora de los genes diana y entonces puede activar o reprimir la transcripción (fig. 4) (Ma, JH. et al. 2020).

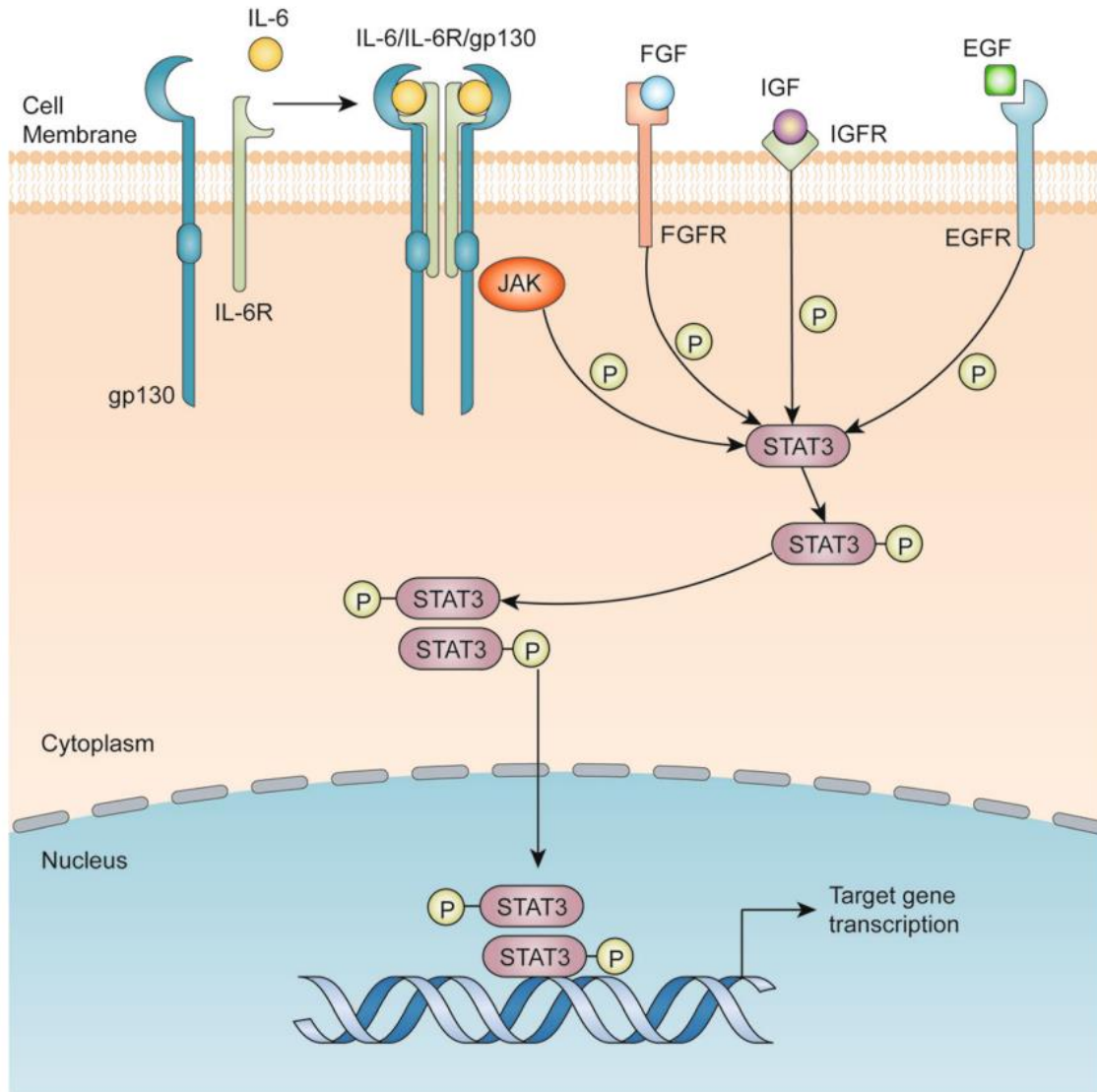


Figura 4. La vía de señalización clásica IL-6/STAT3 en células cancerosas (Ma, JH. et al. 2020).

La activación del oncogén STAT3 también puede funcionar como un importante punto de control inmunitario para diversas respuestas inmunitarias antitumorales. A pesar de que STAT3 es considerado un factor de transcripción directo, se ha demostrado que también puede regular la expresión génica a través de mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN y la modificación post-traducciona de las histonas (Yu H. et al. 2014).

En los últimos años, la investigación sobre STAT3 ha tenido lugar principalmente en su relación con la progresión, metástasis y resistencia a fármacos contra tumores cancerígenos (Siveen, K. et al. 2014). STAT3 tiene papel en estos fenómenos ya que fomenta la proliferación de células tumorales, así como la supervivencia. También tiene influencia en la

angiogénesis y la inmunosupresión, estos procesos puede llevarlos a cabo mediante la regulación positiva de diversos oncogenes como LIN28A.

Al estudiar las secuencias promotoras de LIN28A, Guo y colaboradores (2013) identificaron dos sitios consenso de STAT3, específicamente en el nt -2405 y -369 de la región 5'UTR de LIN28. Ellos confirmaron que STAT3 interactuaba físicamente con el promotor de LIN28 transfectando células MCF7 con un plásmido de expresión Flag.STAT3C y realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) utilizando un anticuerpo anti-flag. Los datos demostraron que efectivamente STAT3 podía unirse a ambos sitios de unión anteriormente mencionados (Guo, L. *et al.* 2013).

Un estudio reciente realizado por Xu y colaboradores (2021), propuso que STAT3 es capaz de reprimir la expresión de Let-7a en células A673 de Sarcoma de Erwin a través de la activación de LIN28. Ellos amplificaron el marco abierto de lectura (ORF) completo de STAT3 y LIN28 y lo clonaron en el vector pcDNA3.1 para crear construcciones de pcDNA3.1-STAT3 y pcDNA3.1-LIN28, respectivamente. Utilizaron un plásmido vacío de pcDNA3.1 como control negativo. En la figura 5A podemos observar como la RT-qPCR mostró que la expresión de let-7a en células A673-SP disminuía tras la transfección con pcDNA-STAT3; por el contrario, en la figura 5B la expresión de let-7a en las células A673-SP aumentó tras la transfección con si-STAT3. A nivel traduccional la evaluación por western blot mostró que la expresión de LIN28 en las células A673-SP aumentó tras la transfección con pcDNA-STAT3 (fig. 5C) y se suprimió tras la transfección con si-STAT3 (fig. 5D). Estos resultados confirmaron un circuito de retroalimentación putativo en donde let-7a suprime la expresión de STAT3, y STAT3 a su vez suprime la expresión de let-7a a través de LIN28. Ellos también exploraron los efectos de LIN28 en la expresión de Let-7a y STAT3 en la misma línea celular y establecieron que la sobreexpresión de LIN28 reprimía fuertemente la expresión de let-7a (fig. 4E); por el contrario, el knockdown de LIN28 aumentaba la expresión de let-7a (fig. 4F). Por otro lado, la expresión de STAT3 aumentó de forma correspondiente cuando se transfectó con pcDNA-LIN28 (fig. 4G), y la expresión se disminuyó tras la transfección con si-LIN28 (fig. 5H). Estos datos demuestran la importancia de la activación de LIN28 a través

de STAT3 para reprimir la expresión de Let-7a el cual como se mencionó anteriormente es un importante supresor de tumor.

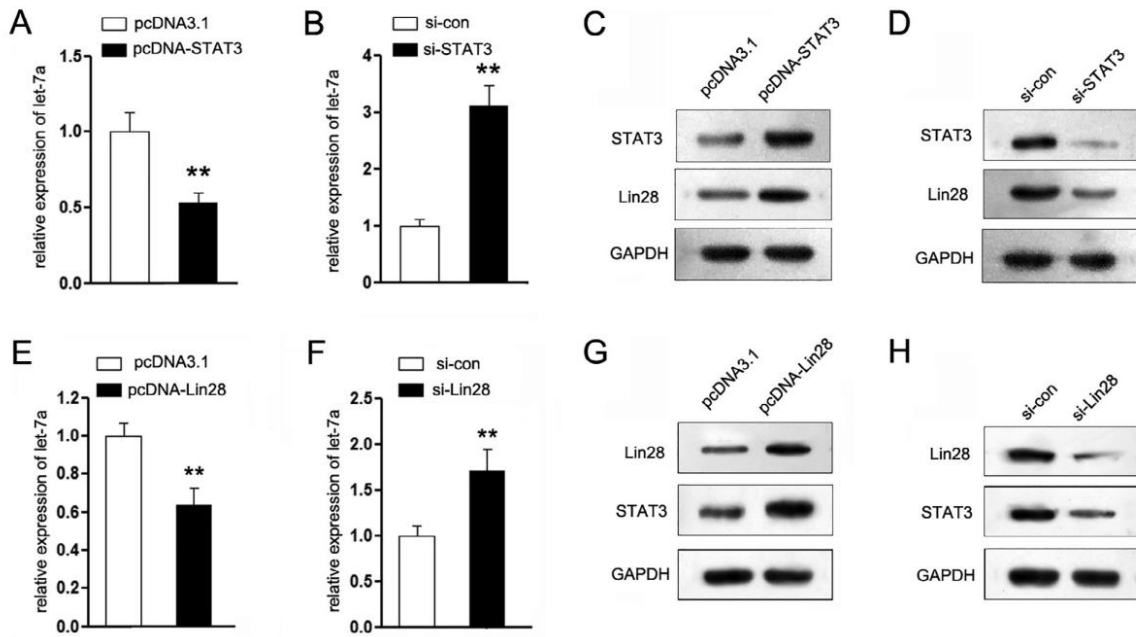


Figura 5. STAT3 inhibe la expresión de let-7a a través de LIN28 en células ES-SP. El pequeño U6 nuclear sirvió como gen de control endógeno y la evaluación de los niveles de expresión relativa se realizó mediante el enfoque 2-DDCt en la inspección RT-qPCR. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ (Xu. et al. 2021).

2. Factor de transcripción SP1

La proteína SP1, también conocida como Proteína de Especificidad 1, es un factor de transcripción que desempeña un papel crucial en la regulación de la expresión génica. Es miembro de la familia Sp/Krüppel-like factor (SP/KLF) y es ampliamente reconocida por su capacidad de unirse a regiones ricas en GC dentro de los promotores génicos. SP1 se une a secuencias específicas de ADN e interactúa con varios componentes de la maquinaria transcripcional. A través de estas interacciones, SP1 tiene participación varios procesos biológicos como la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis y las respuestas inmunitarias. SP1 está implicado en el control del ciclo celular, en particular en la transición de la fase G1 a la fase S, esta proteína regula positivamente la expresión de inhibidores de

quinasas dependientes de ciclinas, como p21 y p27, que participan en la detención del ciclo celular.

La proteína Sp1 tiene 785 aminoácidos y un peso molecular de 81 kDa. La figura 6 muestra la estructura co-cristalizada de Sp1, donde la proteína tiene tres regiones ricas en motivos de dedos de zinc de tipo C2H2 altamente homólogos. Esta región es responsable de la unión a motivos de ADN ricos en GC y de la regulación de la transcripción génica de un gran número de genes. Una de las modificaciones post-traduccionales más importantes que puede modular la actividad transcripcional de SP1 es la fosforilación, específicamente en los sitios Ser59, Ser101, Ser131, Thr278, Thr355 y Thr453, indicados en la figura 6 (Vellingiri, B. et al. 2020).

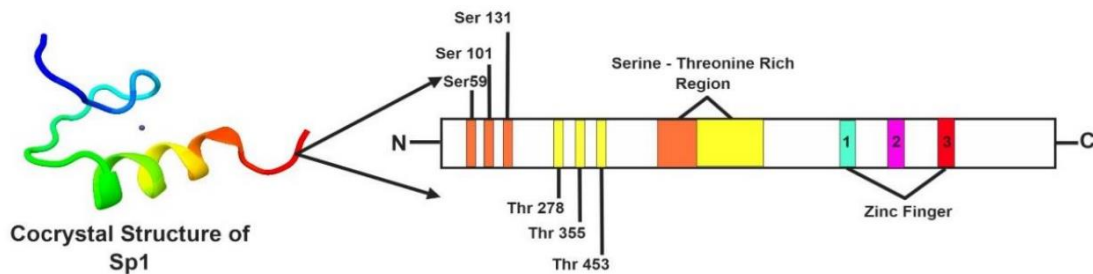


Figura 6. Estructura co-cristalizada de la proteína de especificidad 1 (Sp1; Vellingiri, B. et al. 2020).

La sobre-expresión de SP1 se ha observado en varios tipos de cáncer y se ha asociado con el inicio y la progresión de este, así como la metástasis y la resistencia a los medicamentos (Beishline, K. & Azizkhan-Clifford, J. 2015). Se ha demostrado que SP1 regula positivamente la expresión de varios oncogenes, como LIN28A/B, promoviendo así el crecimiento tumoral y la angiogénesis.

SP1 y LIN28 exhiben funciones conjuntas durante el desarrollo embrionario y el mantenimiento de las células madre. Se ha demostrado que SP1 activa la expresión de LIN28 durante la embriogénesis temprana. LIN28, a su vez, interactúa con SP1 para activar la expresión de factores clave de pluripotencia como OCT4, SOX2 y NANOG (Viswanathan et al., 2008). Esta interacción entre SP1 y LIN28 es crucial para el mantenimiento de la pluripotencia, lo cual en cáncer nos da como resultado un fenotipo más agresivo y propenso

a la recaída. En el 2014, You y colaboradores estudiaron si LIN28A/B estaban implicados en la hepatocarcinogénesis mediada por la proteína X del virus de la hepatitis B (HBx) y el mecanismo por el cual podría estarlo. Sus resultados indicaron que la sobreexpresión de HBx induce la expresión de LIN28A/B en líneas celulares de hepatoma HepG2/H7402 mediante transfección transitoria. Para conocer el mecanismo por el que ejercía esta acción descubrieron que la región promotora de LIN28A regulada por HBx se localizaba en el nt -235/-66 y que contenía los dos elementos de unión SP1 (nt -100 y -58). Anteriormente ya se había reportado que HBx tiene la capacidad de transactivar SP1 como mecanismo para regular la transcripción (Wu, HY. et al. 2011), esto los llevo a proponer que HBx podría activar el promotor de Lin28A a través de SP1. Ensayos RT-qPCR y western blot demostraron que la expresión de LIN28A disminuyo al transfectar las células con un siRNA de SP1 a nivel de mRNA y proteína, respectivamente (Figura 7). Con este y otros resultados alternos, ellos concluyeron que HBx activa LIN28A/B a través de SP1 en células de hepatoma y esto evidencia la clara relación entre SP1 y LIN28A/B (You, X. et al. 2014).

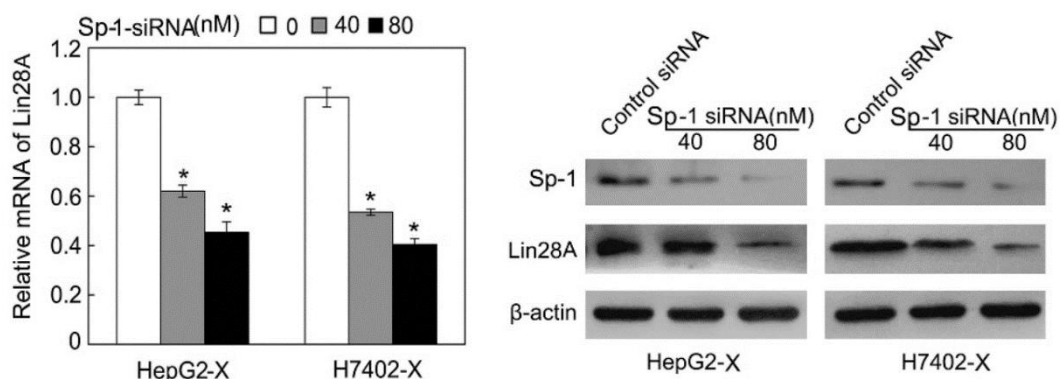


Figura 7. Los niveles relativos de expresión de mRNA y proteína de Lin28A o Sp-1 se detectaron mediante PCR en tiempo real y western blot en líneas celulares HepG2-X (o H7402-X) transfectadas con siRNA de control (o ARNsi de Sp-1), respectivamente (You. et al. 2014)

LIN28 en cáncer

LIN28, junto con otros genes de reprogramación como OCT4, SOX2 y NANOG, puede promover la transformación de una célula terminalmente diferenciada a una célula pluripotente, de este modo cuando LIN28A y LIN28B se sobre-expresan contribuyen al desarrollo de un tumor agresivo poco diferenciado y así afectar al desarrollo normal. Por lo

tanto, la sobre-expresión de cada uno de los parálogos de LIN28 en diferentes tipos de tumores da lugar a varias características del cáncer, incluyendo proliferación celular, invasión, metástasis y por lo tanto un peor pronóstico en los pacientes (Qin. et al., 2014). Es importante mencionar que los patólogos suelen utilizar el estado de diferenciación de un tumor como métrica para calificar la gravedad del cáncer. Así mismo, los cánceres que sobre-expresan LIN28 parecen depender de esta proteína para su crecimiento donde las células iniciadoras de tumores que sobreexpresan a LIN28 pueden persistir después de la quimioterapia y pueden provocar la recaída en algunos pacientes (Viswanathan & Daley, 2010). En particular en cáncer de mama, se ha reportado que la sobre-expresión de LIN28A aumenta la división y proliferación celular, lo que se ve reflejado en un crecimiento drástico del tumor.

Diversas líneas de investigación han demostrado el potencial de LIN28A como un oncogén debido a varias funciones, incluyendo el hecho de que let-7 es un regulador negativo de diversos oncogenes y LIN28A se encarga de inhibirlo. También LIN28 muestra la sinergia con otros oncogenes que son conocidos en la reprogramación de células somáticas (Hanna, J. et al. 2009); además, se ha demostrado que niveles altos de LIN28A se asocian con una mayor reincidencia del cáncer. Otros estudios han evidenciado que LIN28B está aumentado en un modelo de linfoma inducible mediado por Myc y esto conduce a una importante reducción de los niveles de let-7; Myc se une directamente al promotor de LIN28B e induce su expresión, mientras que la pérdida de LIN28B en este modelo interrumpe la transformación celular, debido a la recuperación de let-7 el cual posteriormente reprime a Myc. En resumen, se ha propuesto que el eje Myc/LIN28B/let-7 es necesario y suficiente para la transformación celular a un estado cancerígeno (Iliopoulos, D. et al. 2009). Sin embargo, la regulación de la expresión de LIN28A, sigue siendo en gran medida desconocida. En este sentido, un estudio reciente ha demostrado que la Tristetrapolina (TTP) es una proteína de unión al ARN que reconoce elementos en la secuencia del 3' UTR de LIN28A y facilita su degradación. Interesantemente la expresión de TTP correlaciona positivamente con la expresión de let-7 (Thornton & Gregory, 2012)

Resveratrol

Tras muchos trabajos de investigación se ha demostrado que los polifenoles, que se encuentran principalmente en frutas y verduras, tienen múltiples efectos benéficos en diferentes enfermedades crónicas, como el cáncer; uno de los ejemplos más claros y estudiados es el resveratrol. El resveratrol (3,5,4'-*trans*-trihidroxiestilbeno) es una fitoalexina polifenólica encontrada en la piel de las uvas, vino tinto, frutos rojos, cacahuates, entre otros. Este compuesto se aisló por primera vez en 1940 de las raíces del *Veratrum album* (elébore blanco) y posteriormente en 1963 fue extraído también de las raíces de la planta *Polygonum cuspidatum* (Centidonia japonesa) (Nomura, S. et al. 1963). Sin embargo, fue hasta 1997 cuando se volvió de interés como fármaco anti-cáncer cuando se publicó que el resveratrol tópico prevenía la tumorigénesis en un modelo de cáncer de piel de ratón (Jang, M. et al. 1997). Se ha encontrado que este compuesto tiene propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias así como un efecto protector contra desordenes metabólicos y enfermedades cardíacas (Jiang. et al., 2017). Este compuesto es sintetizado por más de 70 especies de plantas en respuesta a la infección, el estrés, las lesiones, las bacterias o las infecciones fúngicas y la irradiación UV. El resveratrol posee dos anillos de fenol unidos por un doble enlace de estireno y existe en formas isoméricas *cis* y *trans*; el *trans*-resveratrol es la forma natural más abundante y estable (fig. 8) (Galiniak. et al., 2019).

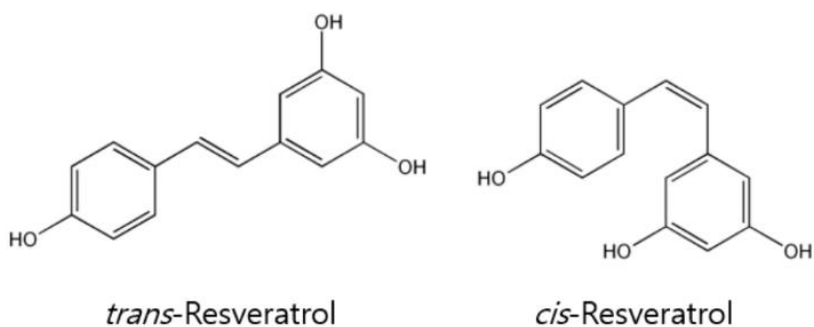


Figura 8. Estructura química de los dos isómeros del resveratrol

Hasta el momento este polifenol ha demostrado tener una amplia gama de propiedades biológicas que incluyen actividad de antiglicación, antioxidante, antiinflamatoria,

neuroprotectora, anticancerígena y antienviejecimiento en diversos modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* (Öztürk. et al., 2017). El resveratrol tiene la capacidad de inhibir directamente la proliferación y viabilidad de las células cancerígenas *in vitro* de forma dependiente a la dosis administrada y al tiempo. Este también ha demostrado tener propiedades importantes como agente quimiopreventivo ya que puede inducir la inhibición del crecimiento celular, arresto del ciclo celular y apoptosis en muchas líneas celulares de cáncer (Kumar, S., E. et al. 2017). Sin embargo, varios de los mecanismos por los que el resveratrol realiza todas estas actividades aun no están totalmente dilucidadas.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) (H_2O_2 , HOCl y los radicales libres) pueden dañar los ácidos nucleicos, los lípidos y las proteínas de las células; se ha demostrado que la mayoría de las células tumorales malignas tienen niveles elevados de ROS (Cao, L. et al. 2016). Como se mencionó anteriormente, el resveratrol tiene propiedades antioxidantes y éstas se dan ya que este compuesto puede aumentar la expresión de la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa en células normales y tumorales, esto conduce a la acumulación de H_2O_2 y así la apoptosis de las células cancerosas. Es importante mencionar que la inducción de la expresión de enzimas antioxidantes y la reducción del estrés oxidativo pueden explicar en si el efecto protector del resveratrol en células normales. Otro mecanismo de protección del resveratrol se ha observado en las células neuronales o endoteliales que sufren estrés oxidativo grave; en este caso, el resveratrol puede ayudar a evitar los daños causados por radiación y potencializa los efectos de fármacos citotóxicos mediante la reducción del estrés oxidativo y la activación de proteínas de supervivencia (Kim, M.Y. et al. 2009).

Por otro lado, varios estudios sugieren que las propiedades anticancerígenas del resveratrol se deben a su amplia gama de actividades, incluyendo la regulación positiva de la expresión de proteínas pro-apoptóticas. Los resultados de diferentes investigaciones indican que el resveratrol tiene un efecto protector en las células normales, mientras que induce la muerte en las células cancerosas. Esto puede asociarse a diferentes blancos celulares y vías metabólicas del resveratrol en las células sanas y cancerosas. Además, este patrón de acción del resveratrol depende de la dosis. Las concentraciones más bajas aumentan la expresión

de proteínas de supervivencia celular, mientras que las dosis más altas estimulan la apoptosis o la necrosis de las células, independientemente de si la célula es sana o patológica, a esto se le llama "efecto bifásico del resveratrol" (San Hipólito-Luengo. et al., 2017). El resveratrol a una dosis alta inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas, conduce a la alteración de la estructura de la cromatina y, finalmente, provoca la muerte celular (Galiniak. et al., 2019). Cabe mencionar que el efecto antitumoral del resveratrol también depende del tipo y estado de las células cancerosas, así como de la dosis administrada.

El resveratrol regula diversas vías celulares y tiene muchos mecanismos de acción por los cuales ejerce sus efectos, podemos ver algunos de ellos ejemplificados en la figura 9. (I) El resveratrol disminuye la expresión de la β -catenina y bloquea su translocación nuclear interfiriendo con el ARN largo no codificante MALAT1 (Ji, Q. et al. 2013); (II) El resveratrol también tiene la capacidad de suprimir la transición epitelio-mesénquima (EMT) inducida por TGF- β /Smad y el factor de transcripción Snail (Ji, Q. et al. 2015); (III) otro de sus mecanismos es mediante la disminución de TGF- β inducida por IKK, esto lleva a la inhibición de la proliferación de células cancerosas a través de la desactivación de NF- κ B (Buhrmann, C. et al. 2019); (IV) también puede inhibir la acumulación nuclear de FOXO3a mediada por p-PI3K/p-AKT (Su, JL. et al. 2007); (V) suprime la fosforilación de Src-STAT3 e induce apoptosis de células cancerosas (Kotha, A. et al. 2006); (VI) asimismo inhibe la activación de HIF-1 α inducida por AKT/MAPK y acelera la degradación de la proteína HIF-1 α por medio de ubiquitinación (Cao, Z. et al. 2004). Se ha demostrado que los efectos antitumorales del resveratrol se dan por mecanismos pleiotrópicos y no de un mecanismo de acción único (Ren B. et al. 2021).

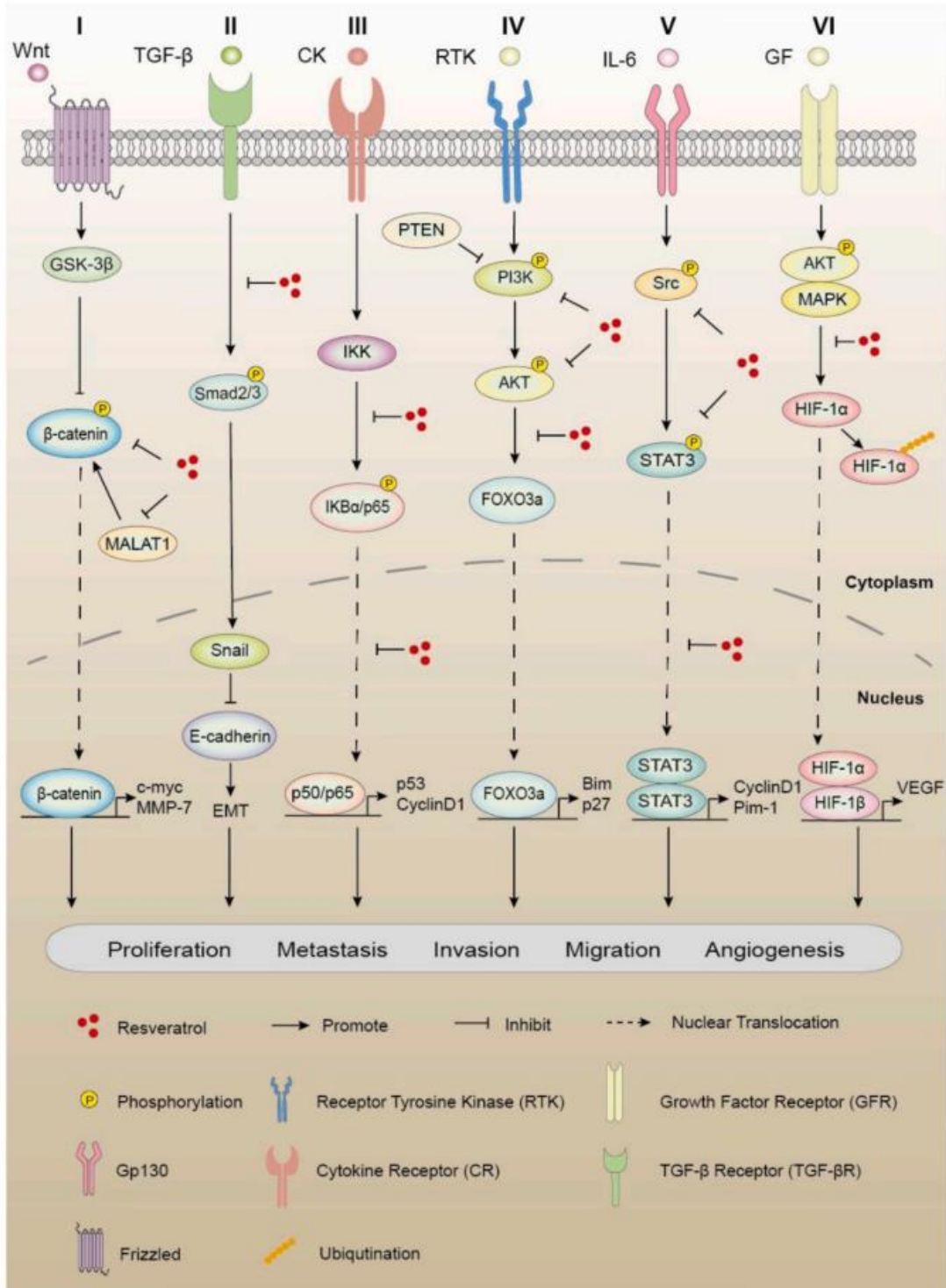


Figura 9. Representación esquemática de las diferentes vías de señalización a las que se dirige el resveratrol (Ren B. et al. 2021).

Otra de las funciones importantes del resveratrol es la quimiosensibilización de células cancerosas. Algunos mecanismos por los que realiza esta función se relaciona con la inhibición de la proliferación, metástasis, angiogénesis y la inducción de la apoptosis de células tumorales a través de las vías de señalización mencionadas anteriormente (Xu, J. Et al. 2017). En varios trabajos se ha reportado que combinar el resveratrol con tratamientos de radiación y quimioterapia puede aumentar significativamente la autofagia celular y la apoptosis, reducir la reparación del daño de DNA, causar senescencia prematura, reducir el volumen y el peso del tumor, en comparación con el tratamiento único *in vivo* (Jiang. et al., 2017). El resveratrol tiene efectos en las 3 etapas de la carcinogénesis (inicio, promoción y progresión del cáncer) y ha demostrado su eficacia para el tratamiento del cáncer tanto en modelos *in vitro* como en modelos *in vivo*, esto gracias a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales directas (Baek, SH. et al. 2016). Las funciones más relevantes del resveratrol durante el proceso de carcinogénesis se resumen en la figura 10. En resumen, con todos estos datos podemos decir que el resveratrol podría tener un papel importante en el tratamiento del cáncer a través de la modulación de distintos mecanismos y tiene un alto potencial como agente complementario a la quimioterapia convencional y otras estrategias de tratamiento contra el cáncer.

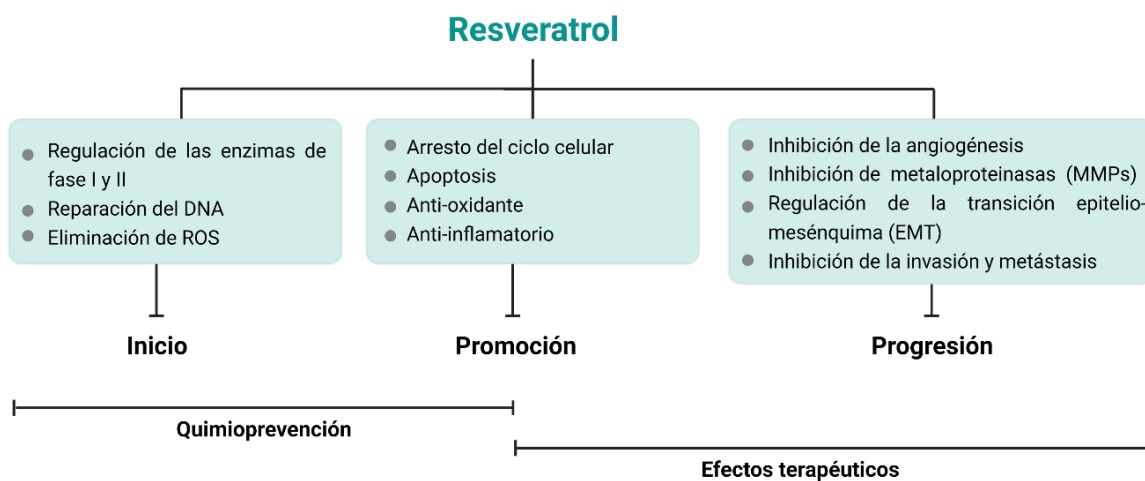


Figura 10. Principales mecanismos anti-cancerígenos en los que interfiere el resveratrol durante la carcinogénesis.

ANTECEDENTES

Zeng y colaboradores (2017) realizaron un estudio para evaluar los efectos anti-apoptóticos del resveratrol en células Müller de retina de ratas diabéticas, específicamente querían observar el efecto del resveratrol sobre el miRNA-29b y SP1. Esto debido a que miR-29b es podría mediar efectos neurotóxicos través de SP1, ya que SP1 es una de sus dianas principales. La expresión del mRNA de miR-29b y SP1 se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Para este estudio se utilizó la retina de ratas normales y diabéticas con o sin tratamiento con resveratrol (5 y 10 mg/kg/día) durante 1-7 meses. El modelo diabético se estableció inyectando a las ratas con 60 mg/kg de estreptozotocina (STZ) y los grupos experimentales se dividieron de la siguiente forma:

- (DM, n = 68): Ratas diabéticas no tratadas con STZ
- (DM + L-RSV, n = 68) ratas diabéticas tratadas con RSV 5 mg/kg/día inducidas con STZ
- (DM + H-RSV, n = 68) ratas diabéticas tratadas con RSV 10 mg/kg/día inducidas con STZ

Las ratas normales también se dividieron aleatoriamente en tres grupos:

- (CON, n = 68) ratas normales de control
- (CON + L-RSV, n = 68) ratas normales de control tratadas con 5 mg/kg/día de RSV
- (CON + H-RSV, n = 68) ratas normales de control tratadas con 10 mg/kg/día de RSV

En la figura 11 podemos observar que la expresión de miR-29b aumenta después de los tratamientos con 5 y 10 mg/kg/día de resveratrol en comparación con los grupos diabéticos no tratados y que este patrón es más evidente con el tratamiento de 10 mg/kg/día en las ratas de la misma edad en las cuatro fases estudiadas. La expresión del miR-29b en la retina de las ratas de control normales no se vio alterada con ninguna de las dos concentraciones utilizadas de resveratrol.

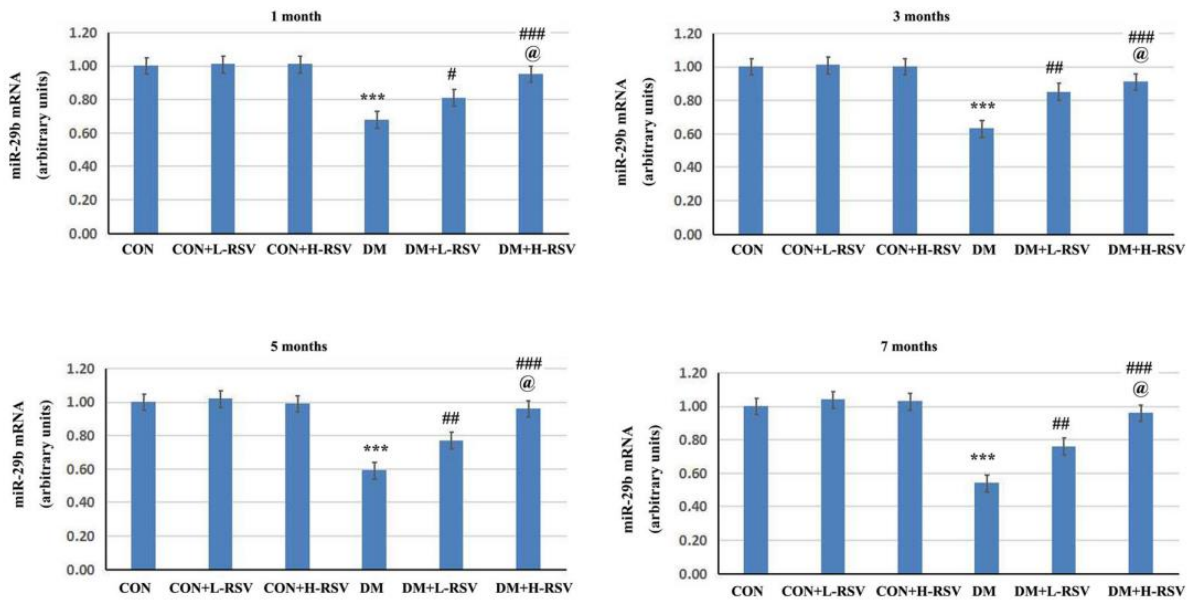


Figura 11. Efecto del resveratrol en la expresión del mRNA de miR-29b en la retina de ratas diabéticas (Zeng, K. et al. 2017).

Al contrario de lo observado con el miR-29b, la expresión de SP1 disminuyó en comparación con los controles normales en todas las etapas de tratamiento (fig. 12). Siendo el tratamiento de 10 mg/kg/día donde se observa la mayor reducción en la expresión del mRNA de SP1 en las cuatro etapas estudiadas.

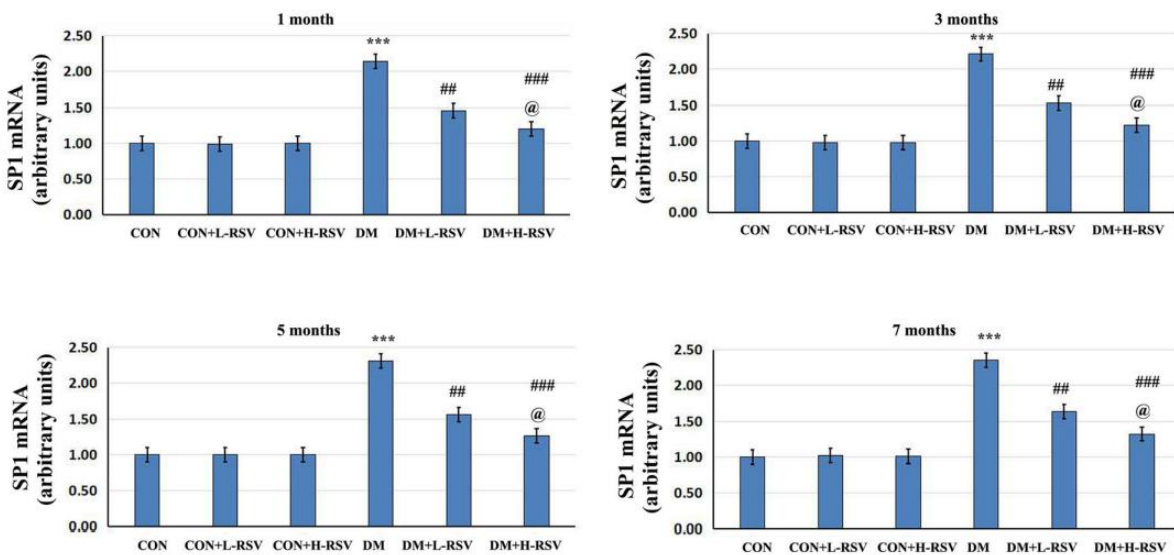


Figura 12. Efecto del resveratrol en la expresión de mRNA de la proteína de especificidad 1 (SP1) en la retina de ratas diabéticas (Zeng, K. et al. 2017).

Zeng y colaboradores (2017) demostraron en su sistema modelo que la disminución en la del miR-29b provocada por la diabetes y a su vez, la sobre-expresión de SP1 en el mismo padecimiento podría ser revertidos por el resveratrol, asimismo demostraron que la vía miR-29b/SP1 está influenciada por el resveratrol.

En cuanto a la relación entre el resveratrol y STAT3, Ahmad y colaboradores (2018) realizaron un estudio en ratones BTBR (modelo in vivo para estudio del autismo) para evaluar el papel del resveratrol sobre sobre la vía JAK/STAT3, la cual está asociada a distintos trastornos del neurodesarrollo ya que puede regular la plasticidad sináptica en el cerebro. En este estudio se trataron a las ratas con 20 y 40 mg/kg/día de resveratrol.

En la figura 13 podemos observar una disminución significativa de JAK1 tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína en comparación con los ratones control. Con esto podemos decir que el resveratrol si es capaz de inhibir la expresión de JAK1. En la figura 14A notamos que el tratamiento con resveratrol redujo significativamente los niveles de mRNA de STAT3 en ambos modelos de estudio. Del mismo modo, es notable como el nivel de proteína pSTAT3 se incrementó en los ratones control BTBR, mientras que el tratamiento con resveratrol disminuyó significativamente los niveles de proteína (Fig. 14B). Cabe recalcar que tanto para JAK1 como para STAT3, la disminución más drástica en la expresión del mRNA y los niveles de proteína se dio con el tratamiento más alto de resveratrol (40 mg/kg/día).

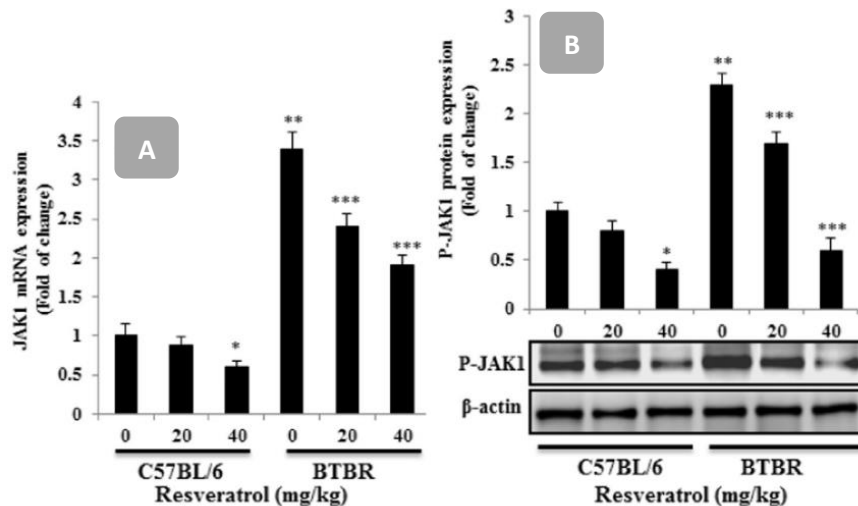


Figura 13. (A) Efecto del resveratrol sobre la expresión del mRNA JAK1, evaluada mediante RT-PCR cuantitativa en el tejido cerebral. (B) efecto del resveratrol sobre pJAK1, evaluado por western blot en el tejido cerebral (Ahmad, S.F. et al. 2018).

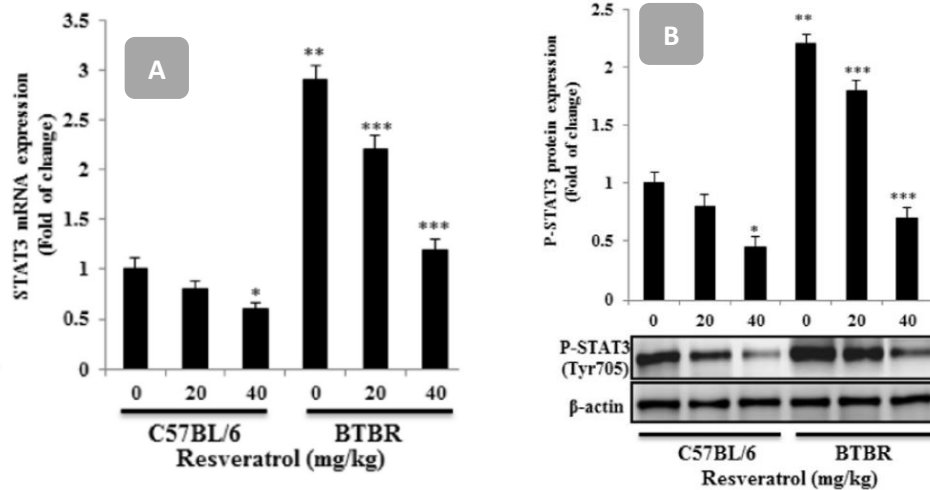


Figura 14. (A) La expresión del mRNA de STAT3 se evaluó mediante RT-PCR cuantitativa en el tejido cerebral. (B) El análisis de Western blot valida la expresión de la proteína pSTAT3 (Tyr705) en el tejido cerebral (Ahmad, S.F. et al. 2018).

Los resultados indicaron que el resveratrol tiene un efecto protector en ratones BTBR y podría tener un posible efecto beneficioso en el tratamiento del trastorno autista y otros trastornos neuroinmunes al disminuir la vía JAK1/STAT3, tanto a nivel de mensajero como de proteína.

Así mismo, en nuestro grupo de trabajo se han realizado diversos proyectos para evaluar la relación entre el resveratrol y LIN28. Por ejemplo, Arenas A.M (2018) evaluó el efecto del resveratrol sobre la inhibición de LIN28A en la línea celular de cáncer testicular NCCIT y observó que este compuesto tiene la capacidad de inhibir el mRNA de LIN28A a partir de una concentración de 25 μ M (fig. 15A). En este proyecto también se encontró que la proteína LIN28A mantiene una expresión alta con el tratamiento con resveratrol a 50 y 100 μ M, hasta llegar a una concentración de 150 μ M donde se observa la disminución de la expresión (fig. 15B). Se observó que esto ocurría incluso cuando las células eran tratadas por tiempos prolongados de hasta 96h con una concentración de 25 μ M (fig. 16).

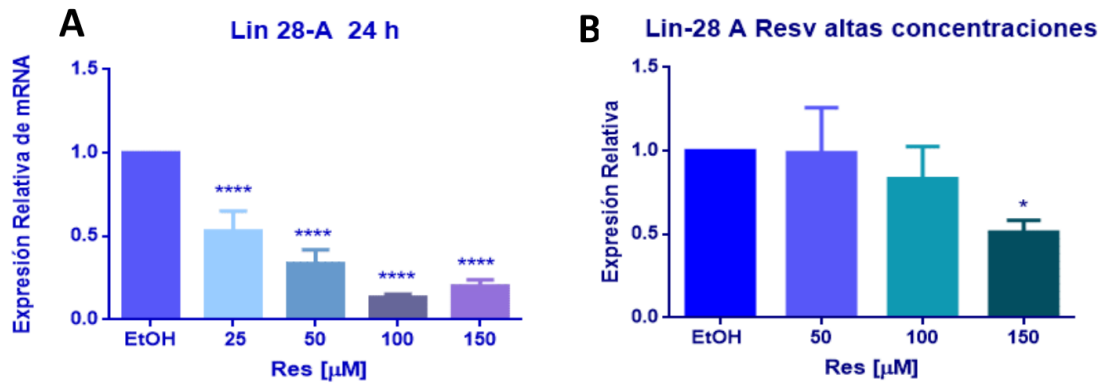


Figura 15. (A) Grafica donde se muestra la expresión relativa del mRNA de Lin28A a 24h a diferentes concentraciones de resveratrol (25, 50, 100 y 150 μM). (B) Grafica donde se muestra la expresión relativa de la proteína de Lin28A a 24h a diferentes concentraciones de resveratrol (50, 100 y 150 μM). Ambos evaluados en células NCCIT (Arenas A.M., 2018).

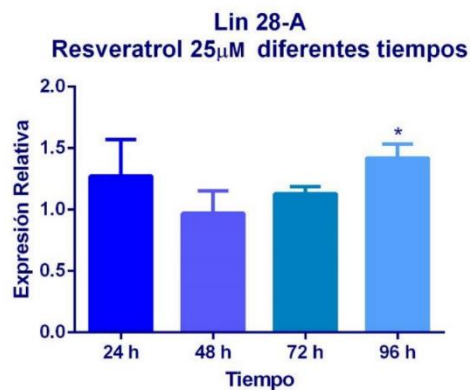


Figura 16. Grafica donde se muestra la expresión relativa de la proteína de Lin28A a 24, 48, 72 y 96 h, en células NCCIT tratadas con 25 μM de resveratrol. * representa cambio significativo obtenido por análisis t-student (*= $p < 0.05$) (Arenas A.M., 2018)

Un estudio posterior realizado por Cotino-Nájera (2020) logró demostrar mediante un ensayo MTT en células NCCIT con distintos tratamientos de resveratrol que al aumentar la concentración del resveratrol disminuía la viabilidad celular, donde la IC50 de esta línea celular fue de 130 μM (fig. 17). Sin embargo, el experimento donde podemos observar que el resveratrol tiene un efecto bifásico fue realizado analizando la cinética de degradación y la estabilidad de la proteína LIN28A a 25 y 150 μM . Esto se demostró mediante ensayos con ciclohexamida (inhibidor de la traducción), al observar que a una concentración baja de

resveratrol (25 μM) incrementa la estabilidad de la proteína de LIN28A en comparación con los controles, mientras que una alta concentración de resveratrol (150 μM) claramente disminuye la estabilidad de LIN28A (fig. 18) (Cotino-Nájera, S.P. 2020).

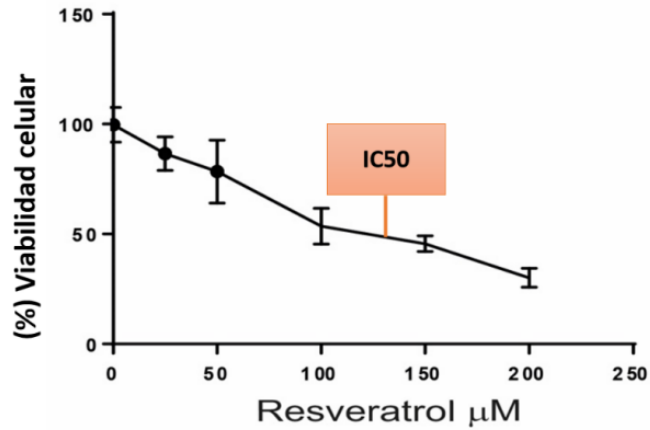


Figura 17. El resveratrol inhibe la proliferación en células NCCIT de manera dosis dependiente. Los porcentajes de viabilidad fueron normalizados en función a las células control tratadas con etanol (0.3% v/v). Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos distintos \pm DS.

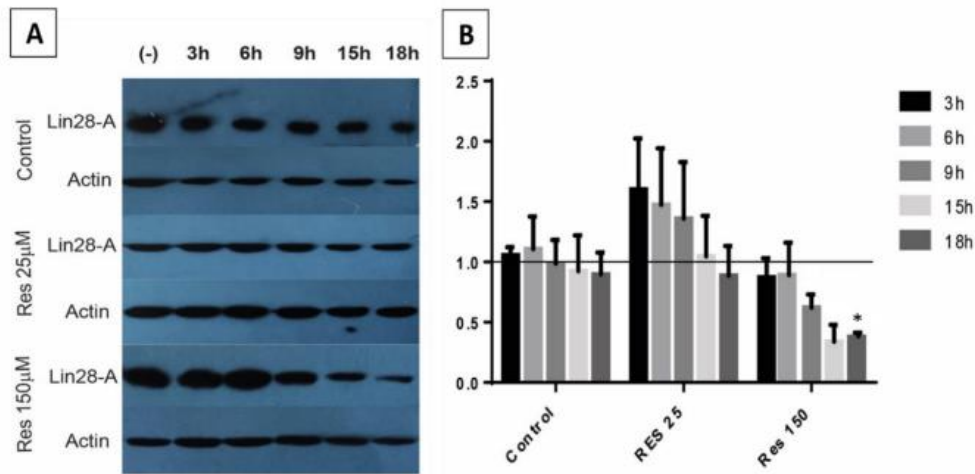


Figura 18. La estabilidad de la proteína de Lin28A es disminuida por Resveratrol (150 μM). A) Western Blot representativo de tratamientos a las 3, 6, 9, 15 y 18h. 1er grupo Control tratados sólo con ciclohexamida (CHX- 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 2do grupo tratado con CHX y 25 μM de resveratrol y 3er grupo tratado con CHX y 150 μM . 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 (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$, ****= $p < 0.0001$).*

JUSTIFICACIÓN

El nivel de la proteína LIN28A incrementa en muchos tipos de cáncer, como el carcinoma oral de células escamosas, cáncer de colon, carcinoma epitelial de ovario, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular, cáncer de mama y cáncer de esófago. Se ha sugerido que actúa como promotor de la transformación de las células tumorales y aumenta la progresión del cáncer. En diferentes estudios se ha observado que la inhibición de LIN28A en líneas celulares cancerígenas disminuye la progresión de carcinogénesis. Sin embargo, a pesar de conocer la relevancia de este oncogén, los mecanismos moleculares por los cuales LIN28A es reactivado y regulado de forma transcripcional en células diferenciadas durante la carcinogénesis es un campo poco estudiado.

Como hemos mencionado anteriormente, el resveratrol es un compuesto con propiedades que ayudan a prevenir la aparición del cáncer y a tratarlo una vez que ya se tiene la enfermedad. La capacidad que tiene el resveratrol para actuar en distintas etapas de la carcinogénesis, así como sus múltiples blancos moleculares y mecanismos de acción han contribuido a que combinado con otras terapias sea capaz de mejorar los efectos quimioterapéuticos y sensibilizar a las células tumorales resistentes a la citotoxicidad. Además, es capaz de proteger a las células sanas de los efectos adversos de los agentes terapéuticos, debido a todo esto es considerado un compuesto terapéutico con mucho potencial.

Hoy en día la investigación sobre el cáncer y su progresión ha mejorado mucho, sin embargo, la tasa de mortalidad por este padecimiento sigue siendo alta. Para superar esto es necesario identificar nuevas estrategias o agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer que tengan como dianas a los oncogenes clave para la tumorigénesis, como LIN28A y conocer el mecanismo por el cual ejercen su acción.

En nuestro grupo de trabajo hemos observado que el resveratrol disminuye la expresión de LIN28A, tanto a nivel de mensajero como de proteína, pero no conocemos los mecanismos por los cuales ejerza su acción a nivel transcripcional. Con la evidencia anteriormente mencionada, en este proyecto se pretende encontrar si el resveratrol regula a la baja a LIN28A a través de los factores de transcripción STAT3 y SP1, en la línea celular T47D.

HIPOTESIS

El resveratrol inhibe la expresión de LIN28A a través de los factores de transcripción STAT3 y SP1 en la línea celular de cáncer de mama T47D.

OBJETIVOS

General: Determinar si el mRNA de LIN28A es regulado negativamente por el compuesto natural resveratrol en la línea celular de cáncer de mama T47D a través de los factores de transcripción STAT3 y SP1.

Particulares:

1. Determinar la viabilidad celular de T47D a diferentes concentraciones del resveratrol (0, 10, 25, 50, 100 y 150 μ M) utilizando el ensayo MTT.
2. Analizar la expresión del mRNA de LIN28A durante 24, 48, 72, y 96h de tratamiento con resveratrol a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 100 y 150 μ M).
3. Analizar la expresión de los genes STAT3 y SP1 durante 24, 48, 72, y 96h de tratamiento con resveratrol a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 100 y 150 μ M).
4. Observar el efecto del resveratrol sobre la expresión de la proteína LIN28A después de 24, 48, 72 y 96h de tratamiento a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 100 y 150 μ M).

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO

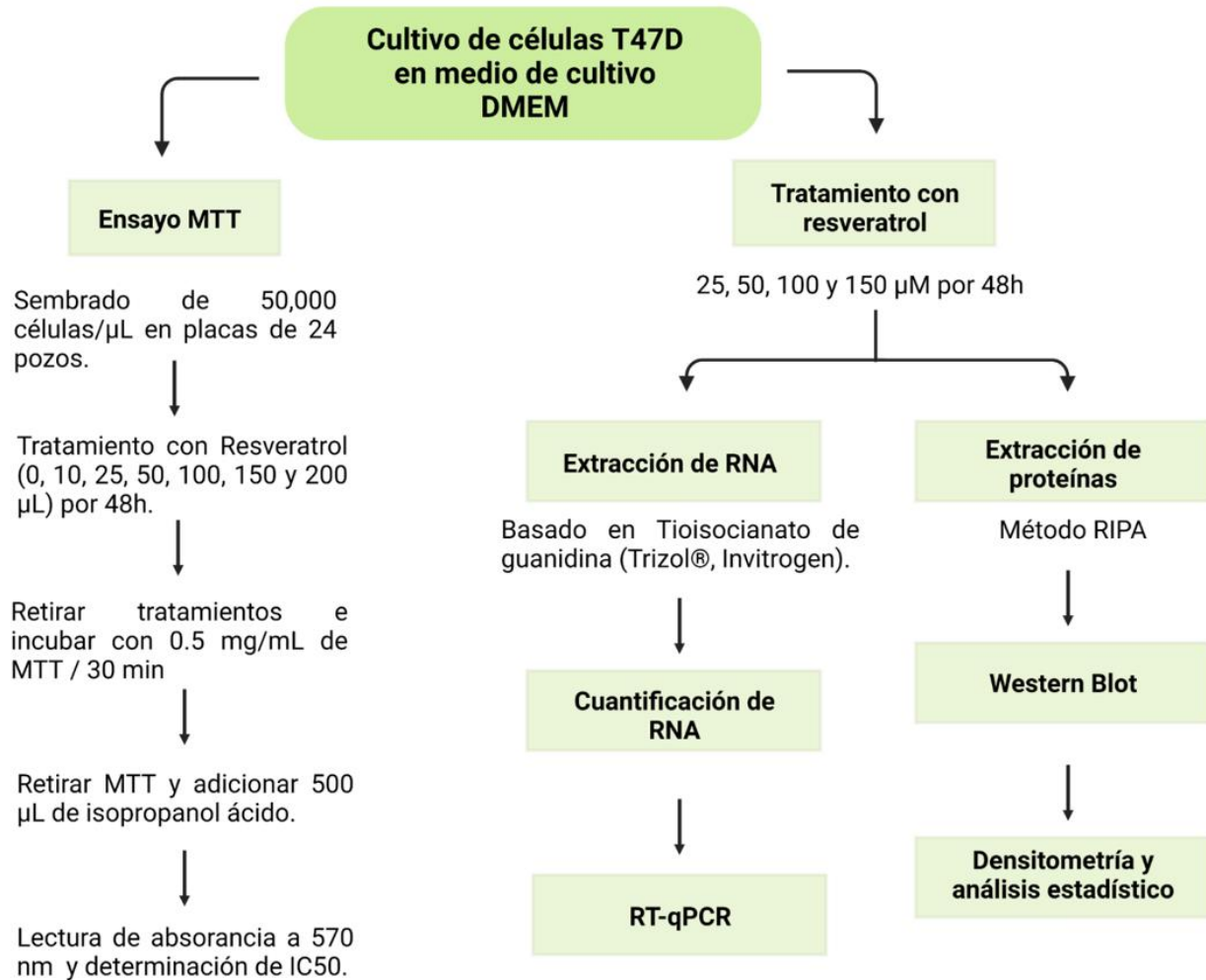


Figura 19. Diagrama de trabajo general

METODOLOGÍA

Cultivo de líneas celulares

Para la realización de este proyecto se cultivó la línea celular T47D (carcinoma mamario) en medio DMEM (Sigma®) enriquecido con 10% de suero fetal bovino y 1140 μL de antibiótico por cada 100 mL de medio en cajas adherentes a 37°C con 5% de CO₂ a una concentración de 50,000 cel/ μL.

Ensayo de proliferación celular (MTT)

La línea celular T47D se sembró en placas de 24 pozos a una densidad de 10,000 células por pozo. Después de 24h las células se trataron con concentraciones de 0, 25, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{M}/\text{mL}$ de **resveratrol (Sigma-Aldrich)** disuelto en etanol, el cual también fue usado para tratar las células control. Posteriormente, a las 48h de tratamiento el medio se retiró y las células se incubaron por 30 minutos con 0.5mg/mL de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT; Sigma Aldrich) a 37°C y 5% de CO₂. El medio se retiró y los cristales de formazán precipitados fueron solubilizados con 500 μL de isopropanol ácido (3.4 μL HCl/mL Isopropanol). Por último, la absorbancia de la reacción colorimétrica se leyó a 570 nm de longitud de onda en un lector de Elisa Sunrise Tecan y el porcentaje de crecimiento fue calculado considerando la lectura del control como el 100% y se determinó la IC₅₀ por interpolación usando el programa GraphPad Prism 8.

Tratamientos con resveratrol

Después de 24h de sembrar las células T47D en cajas de 60 mm de diámetro, se les dio tratamiento con Resveratrol (Sigma®) por 24, 48, 72 y 96h. Las células control fueron tratadas con EtOH absoluto, ya que este fue el vehículo en el que se disolvió el resveratrol. El protocolo a seguir para llevar a cabo los tratamientos fue el siguiente:

1. El resveratrol fue pesado en balanza analítica para preparar el stock.
2. Dentro de la campana de flujo laminar en oscuridad y procurando mantener el resveratrol en hielo el mayor tiempo posible, se disolvió en EtOH absoluto utilizando vortex para llegar a una concentración de 80mM.
3. A cada caja con células T47D se le etiquetó debidamente de acuerdo al tratamiento al que correspondían. Se les retiró el medio del día anterior, se lavaron con PBS y se les adicionó 3mL de medio de cultivo a cada una.
4. Posteriormente, a cada caja se le dio el tratamiento indicado en la tabla 1.
5. Las cajas se guardaron en incubadora a 37° C y 5% de CO₂ durante el respectivo tratamiento y posteriormente se realizó la extracción de RNA o proteína.

Es importante mencionar que a partir del paso 3 este proceso se repitió cada 24h, dependiendo del tiempo de tratamiento correspondiente. Del mismo modo, el proceso completo se repitió un mínimo de 3 veces.

Tabla 1. Relación de tratamientos con resveratrol

Concentración de tratamiento	25µM	50 µM	100 µM	150 µM
Cantidad de resveratrol	0.95 µL	1.9 µL	3.8 µL	5.6 µL

Extracción de RNA por método de TRizol®

Dentro de la campana de flujo laminar se retiró el medio con tratamiento a las células (procurando hacerlo desde las cajas control hasta las de mayor concentración) y se agregaron 500 µL de PBS para lavar. Posteriormente el PBS se retiró, se adicionaron 500 µL de TRizol® Reagent (Thermo Fisher Scientific), se recuperaron las células en dicho compuesto en tubos eppendorf de 1.5 mL debidamente etiquetados y se les dio vortex suave. Fuera de la campana se le agregaron 200 µL de cloroformo a cada tubo y se mezcló por inversión cada 5 min durante 15 min. A continuación, se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C; la fase acuosa superior se recuperó en tubos eppendorf de 1.5 mL, a estos se les añadió 500 µL de isopropanol y se incubaron a -20°C por 20 min. Una vez pasado este tiempo las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 14,000 rpm a 4°C, se decantó el sobrenadante y se le agregó a cada tubo 1mL ETOH 70% (diluido en agua DEPC) a cada muestra. Los tubos volvieron a centrifugarse, esta vez a 7500 por 5 min a 4°C. A continuación, se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla; una vez que la pastilla se tornó transparente se resuspendió en 26 µL de agua DEPC y se le agregó 1 µL de DNAsa I libre de RNAsa y 3 µL de Buffer de reacción (Ambion®). Por último, se incubó la

reacción por 30 min a 37°C y después 10 minutos a 70°C en thermoblock. Todas las muestras se guardaron a -70°C para mantener la integridad del RNA obtenido.

Cuantificación de RNA

El RNA obtenido de la extracción fue cuantificado por espectrofotometría, para esto se realizó una dilución de cada una de las muestras mezclando 1 µL de RNA en 99 µL de agua DEPC. Cada muestra se leyó en espectro UV-vis 260/280 para conocer la cantidad de RNA obtenido.

Síntesis de cDNA (Retrotranscripción)

Para este procedimiento se utilizó el kit First Strand cDNA (Thermo Scientific®) para obtener 20 µL de cDNA. Se ajustó la cantidad de RNA a utilizar con la intención de obtener 3 µg/µL para la reacción, para esto se hicieron diluciones 1:10 a las muestras con una concentración igual o mayor a 3 µg/µL. Posteriormente se preparó el primer mix de la siguiente forma:

- Oligo DT: 1 µL
- RNA: Lo necesario de cada muestra para llegar a 3 µg/ µL
- Se llevó a un volumen de 11 µL utilizando agua libre de nucleasas.

Este mix se incubó 65° C por 5 minutos. Posterior a este tiempo se realizó un spin en la centrifuga y preparo el segundo mix de la siguiente forma:

- Buffer de reacción 5x: 4 µL
- Ribolock: 1 µL
- dNTP mix: 2 µL
- Retrotranscriptasa: 2 µL

Se añadieron 9 µL del mix en cada tubo de reacción, se incubaron a 37°C por 1 hora y posterior a este tiempo a 70°C por 5 min. Todas las muestras fueron almacenadas a -70°C. Cabe mencionar que las cantidades de cada mix aquí representadas están diseñadas para una sola reacción, estas deben multiplicarse según la cantidad de muestras a tratar.

qPCR

Para esta técnica se usó SYBR Green qPCR Master Mixes (Thermo Scientific®) y se preparó el máster mix de acuerdo a lo siguiente:

- Sybr Green: 5 µL
- Oligo: 1 µL
- Agua libre de nucleasas: 3 µL

Se colocaron 9 µL de master mix en cada pozo de la placa para qPCR + 1 µL de cDNA de cada una de las muestras, los oligos que se usaron fueron LIN28A, STAT3, SP1 y β-2-Microglobulina (β2M) como control endógeno, todos estos de la marca PrimeTime® qPCR Primers de IDT. En la tabla 2 podemos observar las secuencias de los primers.

Tabla 2. Secuencias de primers utilizados en este proyecto.

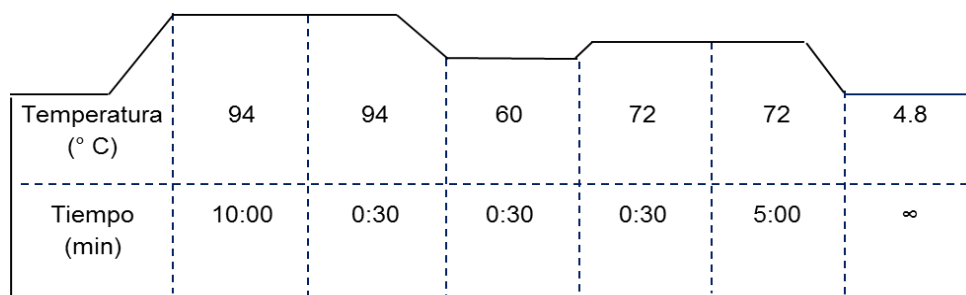
Nombre del gen	Primer	Secuencia
LIN28A	<i>Primer Forward</i>	5'-CATCTGTAAGTGGTTCAACGTG-3'
	<i>Primer Reverse</i>	5'-CCCTTCCATGTGCAGCTTA-3'
STAT3	<i>Primer Forward</i>	5'-TTTTAGCAGGATGGCCCAAT-3'
	<i>Primer Reverse</i>	5'-GCCGCATATGCCCAATCT-3'
SP1	<i>Primer Forward</i>	5'-GCACCCCCTTGAGCTTGT-3'
	<i>Primer Reverse</i>	5'-GCCACCAACTCCTTTTTCAATT-3'
B2M	<i>Primer Forward</i>	5'-ACCTCCATGATGCTGCTTAC-3'

	Primer Reverse	5'-GGACTGGTCTTTCTATCTCTTGT-3'
--	----------------	-------------------------------

El termociclador se programó con 40 ciclos y un volumen de 10 µL en cada pozo de reacción; en el diagrama inferior podemos observar las temperaturas y tiempos programados para la reacción.

Extracción de Proteína por el método de RIPA

Dentro de la campana de flujo laminar se retiró el medio de cultivo a cada caja y estas se lavaron con 1 mL de PBS frío, el cual también se retiró posteriormente. Se añadió 1 mL de PBS frío nuevamente, pero esta vez se utilizó para despegar las células mecánicamente; con ayuda de una micropipeta se retiró el PBS con las células y se recuperaron en un tubo de 1.5 mL previamente etiquetado. Los tubos fueron centrifugados a 10,000 rpm por 5 minutos a 4° C. A continuación, se absorbió el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 250 µL de Buffer RIPA previamente suplementado con inhibidor de proteasas (40 µL de IP complet por cada mL de RIPA) y las muestras se dejaron incubando el hielo durante 30 min en total, dando vortex cada 10 min. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugaron a 14,000 rpm



5 min a 4° C. Por último, el sobrenadante (fracción proteica) se recuperó en tubos eppendorf debidamente etiquetados y se almacenaron a -70°C.

Gel de integridad de Proteínas

Se hizo un gel delgado al 12% preparado para verificar la integridad y cantidad de las proteínas extraídas, el cual fue preparado de la siguiente forma:

Gel separador

- Buffer L (pH 8.8): 0.9 μ L
- H₂O bidestilada y estéril: 2.1 μ L
- Solución N (Acrilamida): 1.5 μ L
- Temed: 4 μ L
- APS 10%: 70 μ L

Gel concentrador

- Buffer M (pH 6.8): 0.2 μ L
- H₂O bidestilada y estéril: 1.5 μ L
- Solución N (Acrilamida): 0.3 μ L
- Temed: 3.5 μ L
- APS 10%: 60 μ L

Para la preparación de las muestras se mezclaron 10 μ L de proteína + 3 μ L de buffer de carga 5X en microtubos de 0.6 mL y se pusieron a hervir durante 5 min. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugaron a 8000 rpm por 3 min y se cargaron las muestras en los pozos del gel, el cual se corrió a 100 volts usando el buffer de corrida (Tris-base/glicina/SDS). Se dejó correr hasta que el frente de corrida quedó al final del gel.

Tinción de azul de coomasie

Una vez terminada la electroforesis, se colocó el gel en agitación con solución fijadora por 5 min, posteriormente se retiró la solución fijadora y se agregó azul de comassie hasta cubrir por completo el gel, este se dejó en agitación otros 5 min. Transcurrido este tiempo se recuperó el colorante y el gel volvió a ponerse en agitación con solución fijadora 5 minutos más. Por último, se recuperó la solución y se añadió desteñidor, este se dejó reposar durante 24h para poder observar adecuadamente las bandas proteicas.

Western Blot

Se realizó el mismo proceso que en la preparación del gel para verificar la integridad de proteínas mencionado anteriormente, esta vez añadiendo marcador de peso molecular en el pozo 1. Una vez terminada la electroforesis se realizó la electrotransferencia en membrana de nitrocelulosa a 30 V y 4°C durante 1 hora utilizando buffer de transferencia (tris-base/glicina/metanol). Pasado este tiempo la membrana se tiñó con rojo de Ponceau durante 3 min en agitación para verificar la calidad de la transferencia, la membrana se lavó con PBS 1X hasta eliminar todo el colorante y se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos a la membrana con ayuda de albúmina 10% durante 1 hora en agitación. Al terminar el bloqueo se realizaron 3 lavados (1 con PBS 1X y 2 con PBS TWEEN 1X) de 3 minutos cada uno y se dejó incubando la membrana con el anticuerpo LIN28A Monoclonal Antibody HRP conjugate (MA1-016-HRP) Thermo Scientific® durante 18h.

Posteriormente, se recuperó el anticuerpo y se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS TWEEN 1X para eliminar los restos de anticuerpo. La membrana se incubó con luminol por 5 min y se reveló en placas fotográficas en un intervalo de tiempo de 2s-2min dependiendo de la señal en la membrana. Como control de carga se utilizó la actina, la membrana se lavó con PBS 1X para eliminar el luminol residual y se incubó con el anticuerpo Monoclonal Anti- β -Actin-Peroxidase antibody (A3854) Sigma® durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, se hicieron 3 lavados de 10 min con PBS TWEEN 1X y se incubó con luminol por 5 min para su posterior revelación en el cuarto de revelado.

RESULTADOS

El resveratrol ejerce un efecto anti-proliferativo dosis dependiente en células T47D

Para determinar la viabilidad celular de las células T47D con diferentes concentraciones de resveratrol (0, 25, 50, 100, 150 y 200 μ M) se realizó un ensayo MTT. Como resultado obtuvimos una IC50 de 83.94 μ M (fig. 20).

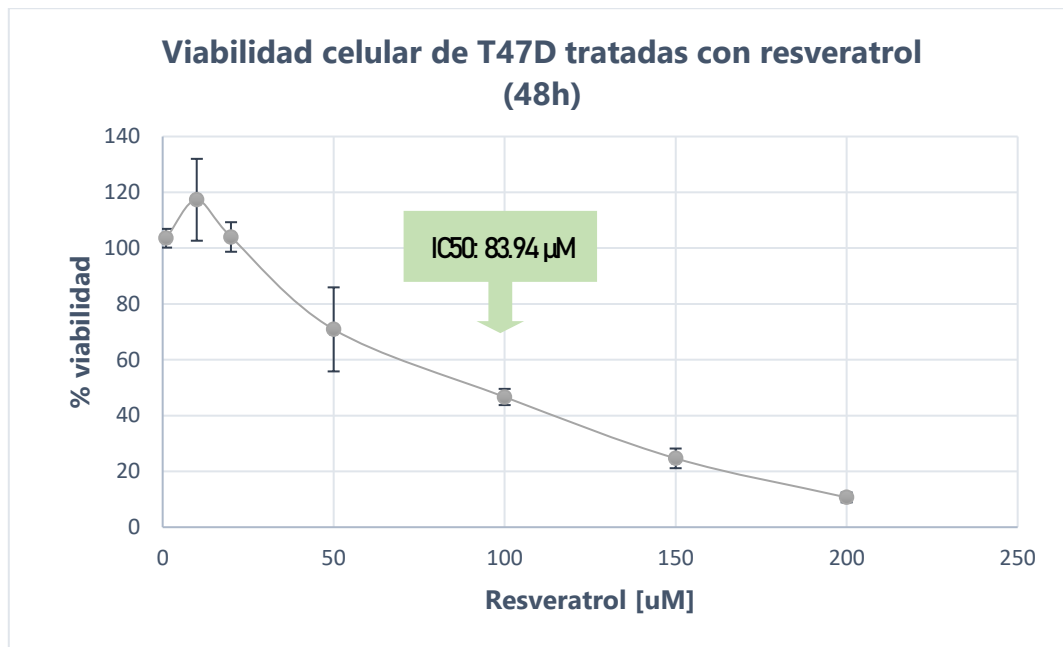


Figura 20. Porcentaje de viabilidad de células T47D tratadas con resveratrol en gradiente de concentración (0-200 μ M) durante 48h de exposición a resveratrol. Los porcentajes de viabilidad fueron normalizados en función a las células control tratadas con etanol (0.3% v/v). Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos distintos \pm DS.

Efecto del resveratrol sobre el mRNA de LIN28A, STAT3 y SP1

Posteriormente, se realizaron los tratamientos con resveratrol a cuatro concentraciones diferentes: 25, 50, 100 y 150 μM (fig. 21 A, B, C, y D, respectivamente), durante 24, 48, 72 y 96h, las células control se trataron únicamente con etanol. Se extrajo RNA y se retrotranscribió a cDNA para determinar la expresión relativa del gen LIN28A mediante una RT-qPCR. En la Figura 21A, se puede apreciar que a una concentración de 25 μM de resveratrol, la expresión relativa de LIN28A aumenta a medida que se incrementan las horas de exposición al compuesto. Este patrón se repite de manera parcial en los tratamientos con 50 μM y 100 μM de resveratrol, como se muestra en las Figuras 21B y 21C. Sin embargo, en estos dos últimos casos, se observa una disminución en la expresión a las 72 horas. En cuanto al tratamiento con la concentración más alta de resveratrol evaluada en este estudio, 150 μM , presenta un comportamiento diferente al del resto. La expresión relativa alcanza su punto máximo a las 24 horas y disminuye progresivamente hasta las 96 horas.

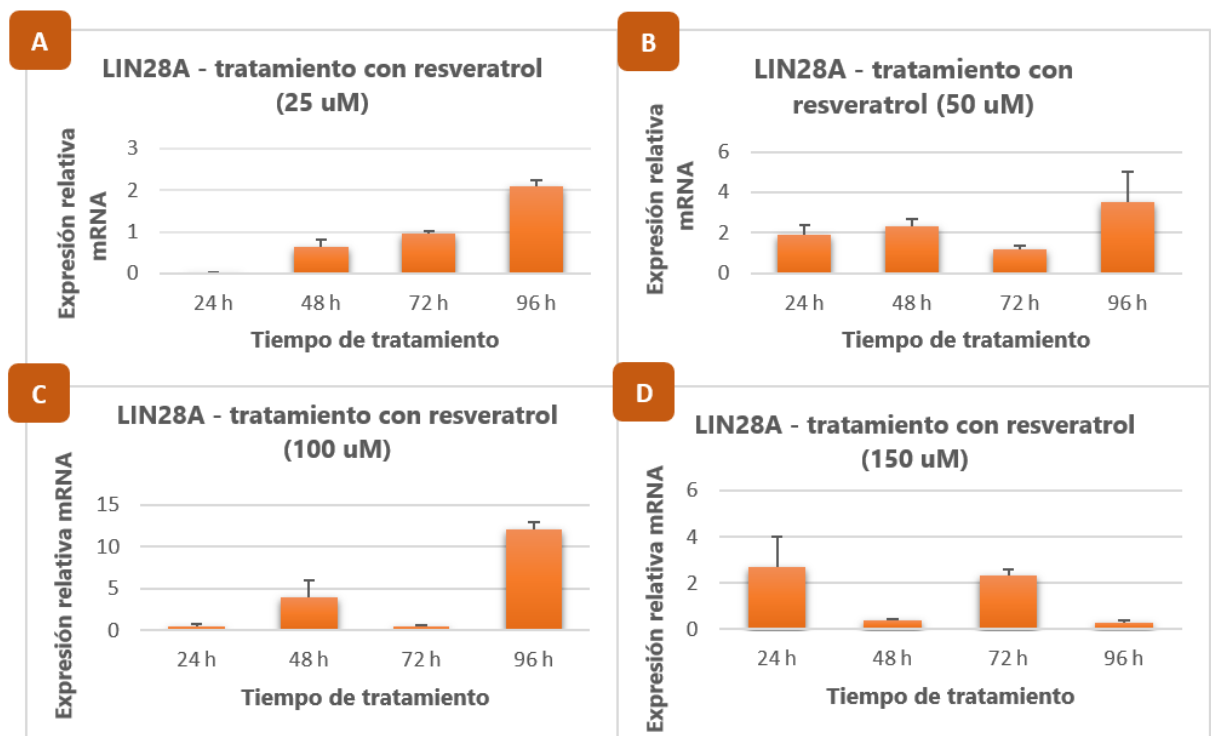


Figura 21. Expresión de **LIN28A** en células T47D tratadas con resveratrol a **25 μM (A)**, **50 μM (B)**, **100 μM (C)** y **150 μM (D)**, durante 24, 48, 72 y 96h de tratamiento a exposición constante.

A continuación, también se realizó RT-qPCR para determinar la expresión relativa de los genes STAT3 y SP1 (fig. 22 y 23, respectivamente). Se llevaron a cabo los tratamientos con resveratrol a cuatro concentraciones diferentes: 25, 50, 100 y 150 μM (fig. 22 y 23 A, B, C, y D, respectivamente), durante 24, 48, 72 y 96h de exposición.

En la figura 22, correspondiente a la expresión relativa del mRNA de STAT3 bajo las condiciones anteriormente mencionadas, podemos observar que a tiempos cortos de 24 y 48h, la expresión del mensajero de STAT3 tiende a aumentar con respecto al control y es hasta los tiempos largos (72 y 96h) donde la expresión comienza a disminuir considerablemente, este comportamiento se mantiene estable bajo todas las concentraciones de resveratrol utilizadas.

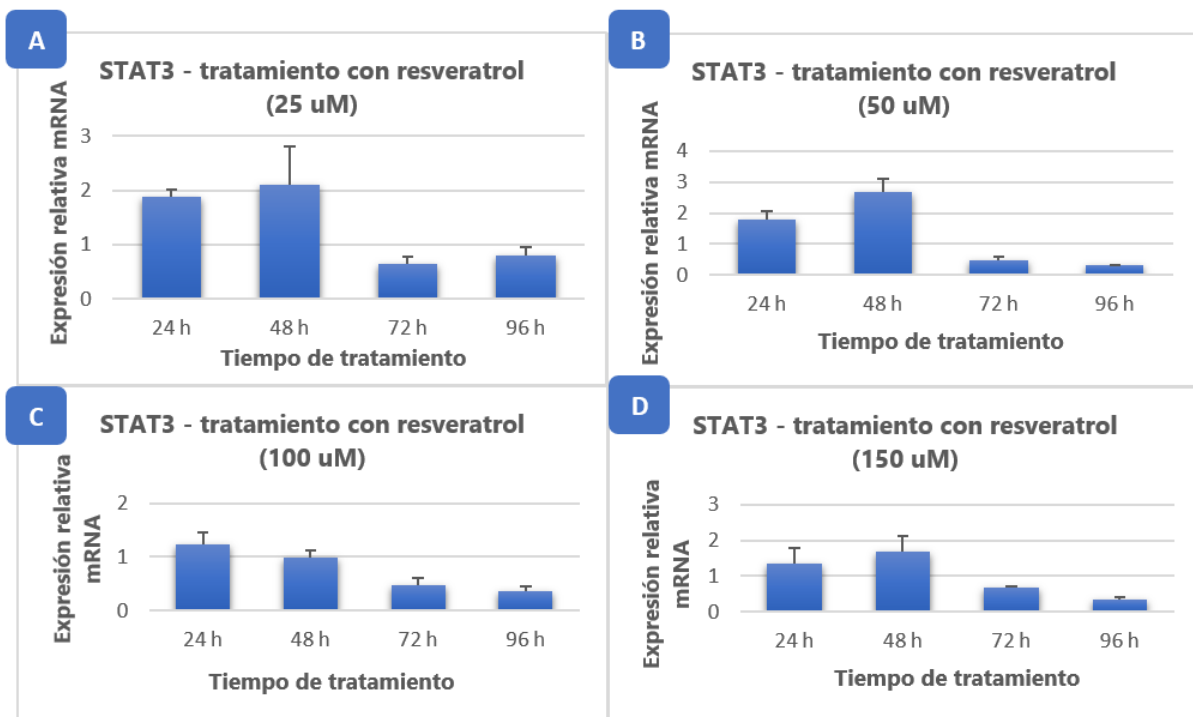


Figura 22. Expresión de **STAT3** en células T47D tratadas con resveratrol a 25 μM (A), 50 μM (B), 100 μM (C), 150 μM (D), durante 24, 48, 72 y 96h de tratamiento a exposición constante.

En relación con la expresión relativa del mRNA de SP1 (fig. 23), se observa un patrón de comportamiento distintivo. La expresión aumenta de manera marcada a medida que aumenta el tiempo de exposición al resveratrol, alcanzando su punto máximo a las 72 horas; es a partir de las 96 horas donde se observa una disminución importante, en contraste con lo que sucede con STAT3, donde se observa una disminución desde las 72 horas de tratamiento. Este comportamiento se mantiene bajo todas las concentraciones de resveratrol trabajadas.

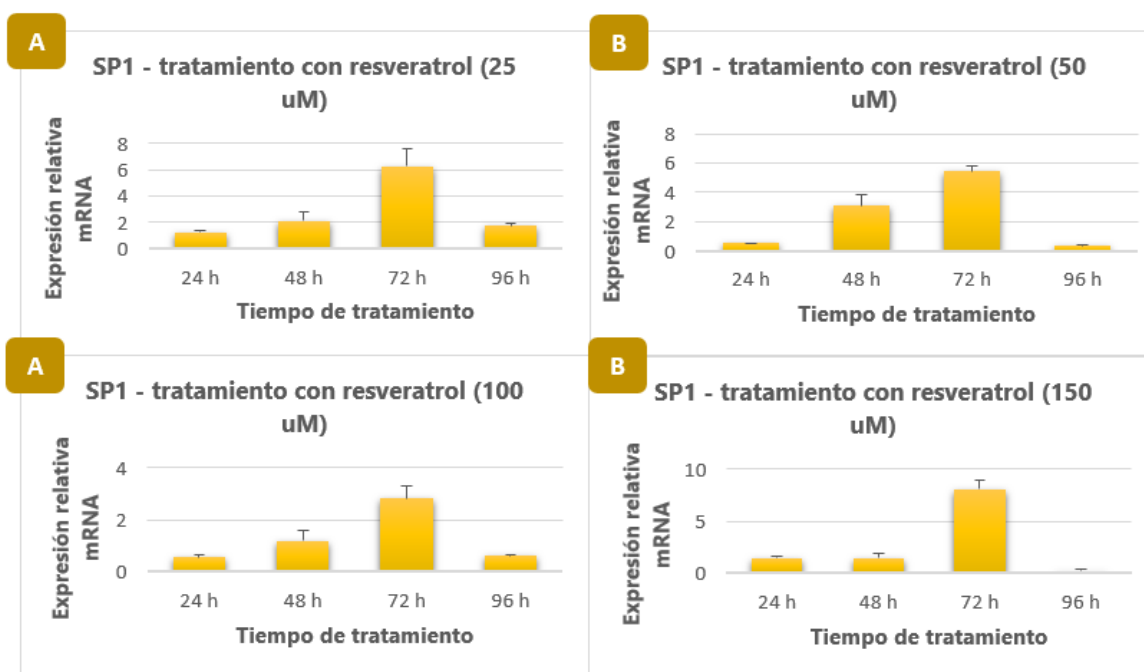


Figura 23. Expresión de SP1 en células T47D tratadas con resveratrol a 25 uM (A), 50 uM (B), 100 uM (C), 150 uM (D), durante 24, 48, 72 y 96h de tratamiento a exposición constante.

Efecto del resveratrol sobre la proteína de LIN28A

Por último, se revisó la expresión de la proteína de LIN28A mediante western blot después de tratar las células T47D con 25, 50, 100 y 150 μ M de resveratrol durante 24, 48, 72 y 95h.

En la cuantificación densitométrica de la proteína de LIN28A después de los tratamientos con resveratrol durante 24h (fig. 24A) podemos notar que la expresión relativa de LIN28A se mantiene estable bajo todas las concentraciones utilizadas, a 150 μM podemos observar un ligero aumento, sin embargo, este no fue estadísticamente significativo. Esto mismo podemos observarlo en los tratamientos por 48h (fig. 24B), donde la expresión de la proteína se mantuvo estable en todas las condiciones de tratamiento con resveratrol.

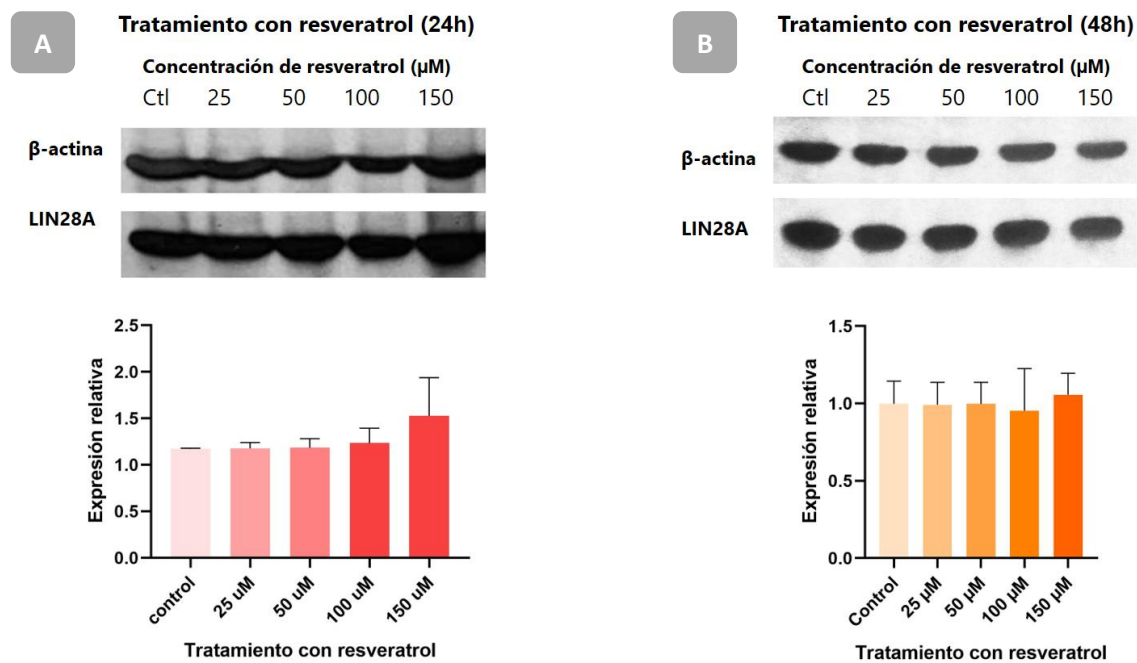


Figura 24. Expresión de la proteína LIN28A en células T47D posterior a tratamientos con resveratrol a distintas concentraciones (25, 50, 100 y 150 μM), a tiempos cortos. A) Western blot y gráfica de densitometría a las 24h. B) Western blot y gráfica de densitometría a las 48h. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos distintos $\pm\text{DS}$.

En los tratamientos a tiempos largos (72 y 96h) podemos observar que llega a haber una disminución estadísticamente significativa en la expresión de LIN28A después del tratamiento con la dosis más alta de resveratrol utilizada en este proyecto, 150 μM (fig. 25A y B).

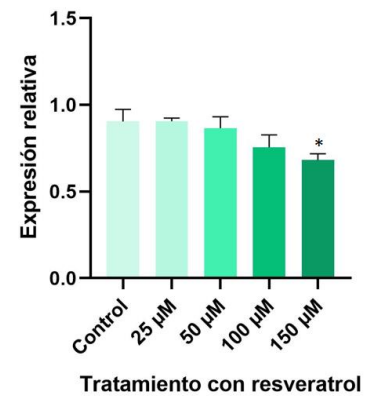
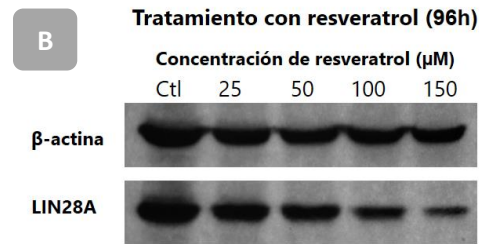
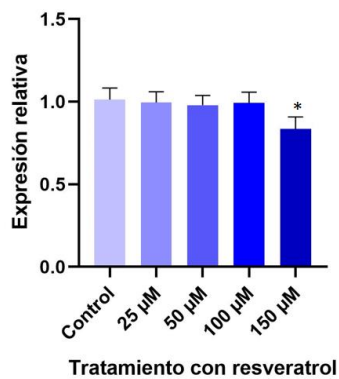
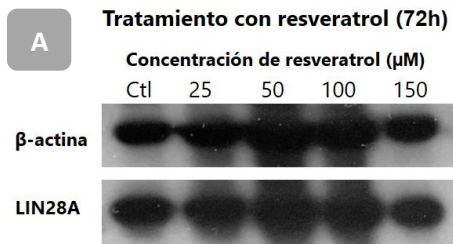


Figura 25. Expresión de la proteína LIN28A en células T47D posterior a tratamientos con resveratrol a distintas concentraciones (25, 50, 100 y 150 μM), a tiempos LARGOS. A) Western blot y gráfica de densitometría a las 72h. B) Western blot y gráfica de densitometría a las 96h. Los valores representan el promedio de al menos 3 experimentos distintos \pm DS.

DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en este trabajo proporcionan una visión importante del comportamiento de LIN28A, tanto a nivel de mensajero como proteico, ante el tratamiento con resveratrol a diferentes tiempos (24, 48, 72 y 96h) y concentraciones (25, 50, 100 y 150 μM), así como la expresión del mRNA de STAT3 y SP1, dos factores de transcripción considerados oncogénicos y que regulan positivamente a LIN28.

La determinación de la concentración inhibitoria media (IC50) es importante para evaluar la eficacia de un compuesto terapéutico al ponerse en contacto con diversas líneas celulares. En este trabajo, se realizó el ensayo de viabilidad MTT para analizar la respuesta de las células T47D al tratamiento con resveratrol a diferentes concentraciones (de 0, 25, 50, 100, 150 y 200 $\mu\text{M}/\text{mL}$) durante 48h. Nuestros resultados demuestran que la IC50 de las células T47D ante el tratamiento con resveratrol es de aproximadamente 83.9 μM (fig. 20); si lo comparamos con los resultados obtenidos por Cotino-Nájera (fig. 17) donde las células NCCIT (línea celular de cáncer testicular trabajada en nuestro laboratorio) muestran una IC50 de 130 μM , lo que indica esta variabilidad es que las células T47D son más sensibles al tratamiento con resveratrol que las NCCIT. Esto puede deberse a múltiples factores, incluyendo las características intrínsecas de las líneas celulares y sus perfiles genéticos y epigenéticos únicos. Así mismo, las células T47D podrían estar expresando receptores específicos o estar involucradas en vías de señalización que aumenten su susceptibilidad al resveratrol, en comparación con las células NCCIT.

En cuanto a los resultados obtenidos de la expresión del mRNA de LIN28A en respuesta al tratamiento con resveratrol hemos encontrado que la variación de la concentración del compuesto y el tiempo de tratamiento tiene efectos notoriamente diferenciales sobre la expresión de LIN28A, lo que sugiere que podría haber una regulación compleja y dependiente de múltiples factores. En primer lugar, el aumento en la expresión del mensajero de LIN28A en relación con el tratamiento de 25 μM conforme van aumentando las horas de exposición al resveratrol indica una relación no lineal entre la concentración de resveratrol y la expresión de LIN28A a esta dosis (fig. 21A). El efecto del resveratrol en la

expresión de LIN28A puede estar mediada por vías de señalización que podrían responder de manera específica a bajas concentraciones del compuesto. Cabe mencionar que el resveratrol es muy conocido por tener un efecto hormético. La hormesis se da cuando hay respuestas bifásicas de una célula/organismo a un producto químico u otros estresores externos y se caracteriza por una estimulación a dosis bajas (normalmente asociada a efectos beneficiosos), en donde se estimula la expresión de proteínas de supervivencia celular y una inhibición a dosis altas (normalmente a efectos tóxicos), en donde se estimula la apoptosis independientemente si la célula está sana. Con el resveratrol este efecto es muy dependiente de la dosis administrada, al tiempo del tratamiento y también a la línea celular en donde se ha estudiado (Shaito, A. et al. 2020). En 2017 San Hipólito-Luengo y colaboradores estudiaron la influencia de un rango de concentración 1-100 μM de resveratrol en la proliferación y muerte de la línea celular de adenocarcinoma colorrectal, HT-29. Sus resultados demostraron que el resveratrol tiene un comportamiento bifásico en esta línea celular, ya que después de 48h de tratamiento, las concentraciones más bajas utilizadas de resveratrol (1 y 10 μM) promovieron un aumento del número de células, perdiéndose este efecto con las concentraciones de 25 y 50 μM . Sin embargo, el aumento de la concentración de resveratrol hasta 100 μM dio lugar a una reducción del número de células, probablemente como una consecuencia de citotoxicidad. Cuando el tratamiento se prolongó hasta las 96h, se observó una reducción mucho más significativa del número de células a 50 μM (San Hipólito-Luengo et al., 2017). En este mismo trabajo de investigación realizaron un ensayo MTT como segundo método para determinar la viabilidad y proliferación de las células HT-29 en respuesta al resveratrol. El patrón bifásico del resveratrol se vio atenuado en este experimento en comparación al anterior pero aun así se observó un efecto proliferativo después de 96h de tratamiento en todas las concentraciones trabajadas (1-100 μM).

Con esta información podemos decir que la divergencia en el comportamiento de la expresión de LIN28A entre la concentración más baja de tratamiento (25 μM) y la concentración más alta (150 μM) es indicativa del efecto bifásico del resveratrol sobre las células T47D (fig. 21A y D, respectivamente). El aumento en la expresión de LIN28A a 25 μM

podría estar relacionada con mecanismos compensatorios que las células T47D emplean como respuesta al estrés inducido por el resveratrol a esta concentración. Por otro lado, el descenso de la expresión de LIN28A a 150 μ M con respecto al tiempo de tratamiento podría reflejar la transición hacia un estado citotóxico, donde los mecanismos de autorregulación celular se ven sobrepasados por los efectos anticancerígenos del compuesto. Como se mencionó anteriormente el efecto hormético del resveratrol es altamente dependiente de diversos factores como el tipo de células utilizadas para el estudio, el tiempo y la concentración del tratamiento. En conclusión, la expresión relativa del mRNA de LIN28A bajo los tratamientos a distintas concentraciones y distintos tiempos de exposición al resveratrol sugieren que al menos en las células T47D, la expresión de LIN28A está influenciada tanto por la duración como por la concentración del tratamiento con resveratrol (fig. 21).

Con relación a los resultados obtenidos en la medición de la expresión relativa del gen STAT3 posterior a los tratamientos con resveratrol se observó un aumento en los niveles del mRNA de STAT3 a tiempos cortos de 24 y 48h en todas las concentraciones (fig. 22). Esta inducción temprana de la expresión de STAT3 puede deberse a que el resveratrol a tiempos cortos actuaría de forma beneficiosa para la proliferación celular en lugar de desencadenar procesos que ataquen o contrarresten oncogenes como STAT3. Por otro lado, a tiempos largos (72 y 96h) se observa una disminución de los niveles de mRNA de STAT3 en todas las concentraciones. Esto podría sugerir la activación de mecanismos reguladores negativos que limiten la expresión de STAT3 conforme la exposición al resveratrol va aumentando, por ejemplo, se conoce que uno de los mecanismos por los que el resveratrol puede regular negativamente la expresión de STAT3 es a través de la activación de PIAS3 (E3 SUMO-proteína ligasa), SOCS3 (supresor de la señalización de citoquinas 3), SHP1 (tirosin fosfatasa 1) y SHP2 (tirosin fosfatasa 2), ya que todos estos son reguladores negativos de STAT3. De hecho, la sobreexpresión de PIAS3 inhibe el crecimiento de células de glioblastoma mediante la reducción de STAT3 y las actividades supresoras de tumores de SHP1 y SHP2 se producen principalmente a través de su inactivación de STAT3. También se ha visto que el resveratrol puede interferir con la fosforilación de STAT3, impidiendo que se active y no pueda cumplir su función normal de activar la transcripción de sus genes blanco como

LIN28A (Wu, M. et al. 2023). Los detalles de estos mecanismos negativos requerirían investigaciones adicionales, pero este patrón nos demuestra primero que la regulación de STAT3 por parte del resveratrol es un proceso más dependiente del tiempo que de la concentración utilizada a comparación de LIN28A que parece depender de ambas. Y segundo, que a pesar de observar cambios notables en la expresión de STAT3 a diferentes intervalos de tiempo, la respuesta de LIN28A no siempre siguió un patrón concordante con las fluctuaciones de STAT3. Dada la naturaleza de STAT3 como factor de transcripción, es crucial considerar no solo los niveles de su mRNA, sino también la expresión relativa de su proteína en respuesta al resveratrol. Las proteínas y sus modificaciones post-traduccionales son los mediadores finales de las respuestas celulares, y la presencia o ausencia de una proteína en particular es la que realmente ejerce un efecto directo sobre los procesos biológicos.

Por otro lado, analizamos la expresión de SP1, ya que este al igual que STAT3 es un regulador positivo de LIN28A. En la figura 23 podemos observar que la expresión relativa de SP1 va en aumento en todas las gráficas presentadas hasta las 72h de tratamiento y no es hasta las 96h donde observamos un descenso importante en la expresión de SP1, podríamos decir que este patrón es similar al de LIN28B, por lo menos hasta el tratamiento con 100 μ M (fig. 21A, B y C). La disminución significativa en la expresión del mRNA de SP1 a las 96h de tratamiento con resveratrol podría sugerir que el efecto del resveratrol sobre el mensajero de SP1 está fuertemente influenciado por la duración del tratamiento, más que por la concentración del mismo, al igual que lo observado con STAT3. Esto podría deberse a que los mecanismos de regulación de SP1 se ven alterados a largo plazo, por ejemplo, se ha visto que el resveratrol puede influir en las modificaciones post-traduccionales de SP1, como la fosforilación y la O-GlcNAcilación; estas modificaciones por pueden conducir a la degradación acelerada o a la reducción de la capacidad de SP1 para unirse a secuencias de ADN y promover la transcripción. Del mismo modo el resveratrol también puede afectar las vías de señalización intracelular que regulan la expresión de SP1, este compuesto puede inhibir la activación de la vía de proteína quinasa C (PKC), que se ha asociado con la

regulación positiva de SP1 en algunos contextos. Al bloquear estas vías de señalización, el resveratrol puede reducir la expresión de SP1.

Por último, estudiamos la respuesta de la proteína de LIN28A ante el resveratrol para conocer si el resveratrol tenía el mismo efecto inhibitor sobre el mRNA de LIN28A como de su proteína. Tras someter a las células T47D a diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento podemos observar que a las 24h (fig. 24A) el resveratrol no ejerce un efecto importante sobre la expresión de la proteína LIN28A. Sin embargo, es importante destacar que a concentraciones más altas (150 μM) se observa un aumento en la expresión de la proteína, mismo que podemos reafirmar con la gráfica de densitometría mostrada en la figura 24A. A las 48h de tratamiento no hubo cambio en la expresión de la proteína en comparación al control, estos hallazgos están respaldados por el análisis densitométrico, que confirma la ausencia de cambios significativos en la expresión proteica en este intervalo de tiempo (fig. 24B). En contraste en los tratamientos de tiempos prolongados (72 y 96h) es donde se comienzan a observar una disminución en la expresión de LIN28A en respuesta al resveratrol. A partir de 72h, el tratamiento con 100 μM induce una disminución en la expresión de LIN28A en comparación con el control. Este efecto fue más notorio a 96h donde se observó una disminución significativa de la proteína en los tratamientos con 150 μM (fig. 25A y B).

Estos resultados son comparables con los obtenidos por Arenas A.M. (2018) donde al tratar células NCCIT con diferentes concentraciones y observar tanto el mensajero como la proteína de LIN28A, concluyo que esta última era notoriamente menos sensible a tratamiento de resveratrol, ya que no era hasta la concentración de 150 μM donde se observaba una disminución en su expresión. Del mismo modo, en el trabajo realizado por Cotino-Nájera (2020) en nuestro laboratorio, se observó que a 150 μM la proteína LIN28A perdía estabilidad y comienza a degradarse. Tanto sus resultados como los obtenidos en este proyecto sugieren que la exposición al resveratrol puede ejercer una influencia negativa en la expresión de la proteína de LIN28A únicamente a tiempos prolongados y concentraciones altas.

En resumen, estos resultados resaltan la complejidad de la respuesta de la expresión del mRNA y la proteína de LIN28A al tratamiento con resveratrol en las células T47D, así como de los factores de transcripción STAT3 y SP1. El análisis de la expresión de estos oncogenes bajo diferentes condiciones han proporcionado una visión de la posible interacción del resveratrol. Futuras investigaciones podrían enfocarse en la identificación de las vías de señalización involucradas en la regulación de LIN28A y en comprender cómo estas respuestas son influenciadas por la interacción entre la concentración y el tiempo de tratamiento con resveratrol.

CONCLUSIONES

- Las células T47D son más sensibles al resveratrol que las células NCCIT (otra línea celular estudiada en nuestro laboratorio).
- El tratamiento con resveratrol a la concentración más baja (25 μ M) aumenta la expresión del mensajero de LIN28A, mientras que a la concentración más alta (150 μ M) lo disminuye significativamente.
- Los tratamientos con resveratrol a tiempos cortos inducen el aumento del mRNA de STAT3, mientras que a tiempos largos se observa una disminución en el mismo.
- La regulación hormética o bifásica mediada por el resveratrol sobre STAT3 y SP1 depende más del tiempo de tratamiento que de la concentración utilizada.
- A pesar de que el resveratrol tiene un efecto notorio sobre los mensajeros de LIN28A, STAT3 y SP1, no hay un estándar de comportamiento entre estos tres, por lo que hasta el momento no podríamos decir que la regulación transcripcional del resveratrol hacia LIN28A este mediada por estos dos factores de transcripción, sería interesante estudiar el efecto del tratamiento con resveratrol sobre las proteínas de STAT3 y SP1 y observar su comportamiento.

PERSPECTIVAS

- Estudiar la expresión relativa de la proteína de STAT3 y SP1 en la línea celular T47D.
- Analizar el efecto del tratamiento con resveratrol sobre otros factores reguladores positivos o negativos de LIN28A.
- Medir la expresión del miRNA let-7 ya que este podría estar teniendo un papel clave en la regulación de LIN28A por el tratamiento con resveratrol.

BIBLIOGRAFÍA

Ahmad SF, Ansari MA, Nadeem A, Bakheet SA, Alzahrani MZ, Alshammari MA, Alanazi WA, Alasmari AF, Attia SM. Resveratrol attenuates pro-inflammatory cytokines and activation of JAK1-STAT3 in BTBR T+ Itpr3tf/J autistic mice. *Eur J Pharmacol.* 2018 Jun 15;829:70-78. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.04.008. Epub 2018 Apr 11. PMID: 29654783.

Arenas-Hernández, AM. (2018). Evaluación del efecto del resveratrol sobre la expresión de los gens LIN28-A Y LIN28-B en las líneas celulares NCCIT y T47D. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

Baek SH, Ko JH, Lee H, Jung J, Kong M, Lee JW, Lee J, Chinnathambi A, Zayed ME, Alharbi SA, Lee SG, Shim BS, Sethi G, Kim SH, Yang WM, Um JY, Ahn KS. Resveratrol inhibits STAT3 signaling pathway through the induction of SOCS-1: Role in apoptosis induction and radiosensitization in head and neck tumor cells. *Phytomedicine.* 2016 May 15;23(5):566-77. doi: 10.1016/j.phymed.2016.02.011. Epub 2016 Feb 27. PMID: 27064016.

Balzer, E. and Moss, E. G. (2007). Localization of the developmental timing regulator LIN28 to mRNP complexes, P-bodies and stress granules. *RNA Biol.* 4, 16-25.

Beishline K, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and the 'hallmarks of cancer'. *FEBS J.* 2015 Jan;282(2):224-58. doi: 10.1111/febs.13148. Epub 2015 Jan 8. PMID: 25393971.

Buhrmann C, Yazdi M, Popper B, Shayan P, Goel A, Aggarwal BB, Shakibaei M. Evidence that TNF- β induces proliferation in colorectal cancer cells and resveratrol can down-modulate it.

Exp Biol Med (Maywood). 2019 Jan;244(1):1-12. doi: 10.1177/1535370218824538. Epub 2019 Jan 19. PMID: 30661394; PMCID: PMC6362535.

Cao Z, Fang J, Xia C, Shi X, Jiang BH. trans-3,4,5'-Trihydroxystibene inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. Clin Cancer Res. 2004 Aug 1;10(15):5253-63. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0588. PMID: 15297429.

Cao, L., X. Chen, X. Xiao, Et al. (2016). Resveratrol inhibits hyperglycemia-driven ROS-induced invasion and migration of pancreatic cancer cells via suppression of the ERK and p38 MAPK signaling pathways. Int. J. Oncol. 49: 735–743.

Cotino Nájera, S. P. (2020). Regulación negativa de la proteína Lin28A a través de la inhibición de USP28 por el compuesto natural resveratrol en células NCCIT. Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV).

Cotino-Nájera, S.P. (2020). Regulación negativa de la proteína LIN28A a través de la inhibición de USP28 por el compuesto natural resveratrol en células NCCIT. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).

de Vasconcellos, J. F., Fasano, R. M., Lee, Y. T., Kaushal, M., Byrnes, C., Meier, E. R., Anderson, M., Rabel, A., Braylan, R., Stroncek, D. F. Et al. (2014). LIN28A expression reduces sickling of cultured human erythrocytes. PLoS ONE 9, e106924.

Fernandes, M.S., F. Carneiro, C. Oliveira, Et al. 2013. Col-orectal cancer and RASSF family—a special emphasis on RASSF1A. Int. J. Cancer 132: 251–258.

Furtek SL, Backos DS, Matheson CJ, Reigan P. Strategies and Approaches of Targeting STAT3 for Cancer Treatment. ACS Chem Biol. 2016 Feb 19;11(2):308-18. doi: 10.1021/acscchembio.5b00945. Epub 2016 Jan 15. PMID: 26730496.

Galiniak, S., Aebisher, D., & Bartusik-aebisher, D. (2019). Health benefits of resveratrol administration. 66(1), 13–21.

Guo L, Chen C, Shi M, Wang F, Chen X, Diao D, Hu M, Yu M, Qian L, Guo N. Stat3-coordinated Lin-28-let-7-HMGA2 and miR-200-ZEB1 circuits initiate and maintain oncostatin M-driven epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*. 2013 Nov 7;32(45):5272-82. doi: 10.1038/onc.2012.573. Epub 2013 Jan 14. PMID: 23318420.

Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997 Jan 10;275(5297):218-20. doi: 10.1126/science.275.5297.218. PMID: 8985016.

Ji Q, Liu X, Fu X, Zhang L, Sui H, Zhou L, Sun J, Cai J, Qin J, Ren J, Li Q. Resveratrol inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via MALAT1 mediated Wnt/ β -catenin signal pathway. *PLoS One*. 2013 Nov 11;8(11):e78700. doi: 10.1371/journal.pone.0078700. PMID: 24244343; PMCID: PMC3823921.

Ji Q, Liu X, Han Z, Zhou L, Sui H, Yan L, Jiang H, Ren J, Cai J, Li Q. Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- β 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression. *BMC Cancer*. 2015 Mar 5;15:97. doi: 10.1186/s12885-015-1119-y. PMID: 25884904; PMCID: PMC4362662.

Jiang, Z., Chen, K., Cheng, L., Yan, B., Qian, W., Cao, J., Li, J., Wu, E., Ma, Q., & Yang, W. (2017). Resveratrol and cancer treatment: Updates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1403(1), 59–69. <https://doi.org/10.1111/nyas.13466>

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), 1–36. <https://doi.org/10.3390/ijms18122589>

Kotha A, Sekharam M, Cilenti L, Siddiquee K, Khaled A, Zervos AS, Carter B, Turkson J, Jove R. Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein. *Mol Cancer Ther*. 2006 Mar;5(3):621-9. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0268. PMID: 16546976.

Li, Q., Huan, T., Ye, L. J., Li, J., Shi, J. L., & Huang, Q. S. (2014). Concentration-dependent biphasic effects of resveratrol on human natural killer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(45), 10928–10935. <https://doi.org/10.1021/jf502950u>

Ma JH, Qin L, Li X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Commun Signal*. 2020 Feb 28;18(1):33. doi: 10.1186/s12964-020-0527-z. PMID: 32111215; PMCID: PMC7048131.

Nonomura S, Kanagawa H, Makimoto A. [Chemical constituents of polygonaceous plants. I. Studies on the components of ko-j o-kon. (*Polygonum cuspidatum* sieb. Et zucc.)]. *Yakugaku Zasshi*. 1963 Oct;83:988-90. Japanese. PMID: 14089847.

Ocadiz-Delgado, R., Castañeda-Saucedo, E., Indra, A. K., Hernandez-Pando, R., Flores-Guizar, P., Cruz-Colin, J. L., Recillas-Targa, F., Perez-Ishiwara, G., Covarrubias, L., & Gariglio, P. (2012). RXR α deletion and E6E7 oncogene expression are sufficient to induce cervical malignant lesions in vivo. *Cancer Letters*, 317(2), 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.11.031>

Ren B, Kwah MX, Liu C, Ma Z, Shanmugam MK, Ding L, Xiang X, Ho PC, Wang L, Ong PS, Goh BC. Resveratrol for cancer therapy: Challenges and future perspectives. *Cancer Lett*. 2021 Sep 1;515:63-72. doi: 10.1016/j.canlet.2021.05.001. Epub 2021 May 28. PMID: 34052324.

Saito Y, Koya J, Kataoka K. Multiple mutations within individual oncogenes. *Cancer Sci*. 2021 Feb;112(2):483-489. doi: 10.1111/cas.14699. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33073435; PMCID: PMC7894016.

San Hipólito-Luengo, Á., Alcaide, A., Ramos-González, M., Cercas, E., Vallejo, S., Romero, A., Talero, E., Sánchez-Ferrer, C. F., Motilva, V., & Peiró, C. (2017). Dual Effects of Resveratrol on Cell Death and Proliferation of Colon Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 69(7), 1019–1027. <https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1359309>

Sgrignani J, Garofalo M, Matkovic M, Merulla J, Catapano CV, Cavalli A. Structural Biology of STAT3 and Its Implications for Anticancer Therapies Development. *Int J Mol Sci*. 2018 May 28;19(6):1591. doi: 10.3390/ijms19061591. PMID: 29843450; PMCID: PMC6032208.

Shaito A, Posadino AM, Younes N, Hasan H, Halabi S, Alhababi D, Al-Mohannadi A, Abdel-Rahman WM, Eid AH, Nasrallah GK, Pintus G. Potential Adverse Effects of Resveratrol: A Literature Review. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 18;21(6):2084. doi: 10.3390/ijms21062084. PMID: 32197410; PMCID: PMC7139620.

Siveen KS, Sikka S, Surana R, Dai X, Zhang J, Kumar AP, Tan BK, Sethi G, Bishayee A. Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Apr;1845(2):136-54. doi: 10.1016/j.bbcan.2013.12.005. Epub 2014 Jan 2. PMID: 24388873.

Su JL, Yang CY, Zhao M, Kuo ML, Yen ML. Forkhead proteins are critical for bone morphogenetic protein-2 regulation and anti-tumor activity of resveratrol. *J Biol Chem.* 2007 Jul 6;282(27):19385-98. doi: 10.1074/jbc.M702452200. Epub 2007 May 18. PMID: 17513867.

Suhail, Y., Cain, M. P., Vanaja, K., Kurywchak, P. A., Levchenko, A., Kalluri, R., & Kshitiz. (2019). Systems Biology of Cancer Metastasis. *Cell Systems*, 9(2), 109–127. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2019.07.003>

Thornton, J. E., & Gregory, R. I. (2012a). How does Lin28 let-7 control development and disease? *Trends in Cell Biology*, 22(9), 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.06.001>

Thornton, J. E., & Gregory, R. I. (2012b). How does Lin28 let-7 control development and disease? *Trends in Cell Biology*, 22(9), 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.06.001>

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

Vellingiri B, Iyer M, Devi Subramaniam M, Jayaramayya K, Siama Z, Giridharan B, Narayanasamy A, Abdal Dayem A, Cho SG. Understanding the Role of the Transcription Factor Sp1 in Ovarian Cancer: from Theory to Practice. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 9;21(3):1153. doi: 10.3390/ijms21031153. PMID: 32050495; PMCID: PMC7038193.

Vervandier-Fasseur, D., & Latruffe, N. (2019). The potential use of resveratrol for cancer prevention. *Molecules*, 24(24). <https://doi.org/10.3390/molecules24244506>

Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*. 2008 Apr 4;320(5872):97-100. doi: 10.1126/science.1154040. Epub 2008 Feb 21. PMID: 18292307; PMCID: PMC3368499.

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., Beroukhi, R., Azam, M., Teixeira, J., Meyerson, M., Hughes, T. P., Llovet, J. M., ... Daley, G. Q. (2009a). Lin28 promotes transformation and is associated with advanced human malignancies. *Nature Genetics*, 41(7), 843–848. <https://doi.org/10.1038/ng.392>

Wu HY, Chang CI, Lin BW, Yu FL, Lin PY, Hsu JL, Yen CH, Liao MH, Shih WL. Suppression of hepatitis B virus x protein-mediated tumorigenic effects by ursolic Acid. *J Agric Food Chem*. 2011 Mar 9;59(5):1713-22. doi: 10.1021/jf1045624. Epub 2011 Feb 11. PMID: 21314126.

Wu M, Song D, Li H, Ahmad N, Xu H, Yang X, Wang Q, Cheng X, Deng S, Shu X. Resveratrol Enhances Temozolomide Efficacy in Glioblastoma Cells through Downregulated MGMT and Negative Regulators-Related STAT3 Inactivation. *Int J Mol Sci*. 2023 May 29;24(11):9453. doi: 10.3390/ijms24119453. PMID: 37298405; PMCID: PMC10253519.

Xu J, Zhang Z, Huang L, Xiong J, Zhou Z, Yu H, Wu L, Liu Z, Cao K. Let-7a suppresses Ewing sarcoma CSCs' malignant phenotype via forming a positive feedback circuit with STAT3 and lin28. *J Bone Oncol*. 2021 Nov 30;31:100406. doi: 10.1016/j.jbo.2021.100406. PMID: 34917467; PMCID: PMC8645918.

Xu, J., D. Liu, H. Niu, Et al.2017. Resveratrolreverses Dox- orubicin resistance by inhibiting epithelial–mesenchymal transition (EMT) through modulating PTEN/Akt signaling pathway in gastric cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 36: 19.

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

of hepatoma cells. *Oncogene*. 2014 Jan 23;33(4):449-60. doi: 10.1038/onc.2012.618. Epub 2013 Jan 14. PMID: 23318446.

Yu H, Lee H, Herrmann A, Buettner R, Jove R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions. *Nat Rev Cancer*. 2014 Nov;14(11):736-46. doi: 10.1038/nrc3818. PMID: 25342631.

Zeng K, Wang Y, Yang N, Wang D, Li S, Ming J, Wang J, Yu X, Song Y, Zhou X, Deng B, Wu X, Huang L, Yang Y. Resveratrol Inhibits Diabetic-Induced Müller Cells Apoptosis through MicroRNA-29b/Specificity Protein 1 Pathway. *Mol Neurobiol*. 2017 Aug;54(6):4000-4014. doi: 10.1007/s12035-016-9972-5. Epub 2016 Jun 16. PMID: 27311771.

Zeng K, Wang Y, Yang N, Wang D, Li S, Ming J, Wang J, Yu X, Song Y, Zhou X, Deng B, Wu X, Huang L, Yang Y. Resveratrol Inhibits Diabetic-Induced Müller Cells Apoptosis through MicroRNA-29b/Specificity Protein 1 Pathway. *Mol Neurobiol*. 2017 Aug;54(6):4000-4014. doi: 10.1007/s12035-016-9972-5. Epub 2016 Jun 16. PMID: 27311771.

Zhang, J., Xu, A., Miao, C., Yang, J., Gu, M., & Song, N. (2019). Prognostic value of Lin28A and Lin28B in various human malignancies: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Cell International*, 19(1), 0–8. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0788-z>