



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**



**UBIMED**

Evaluación de la actividad de la ruta de señalización Wnt/ -catenina  
en un modelo celular de cáncer de mama triple negativo

**TESIS**

Que para obtener el título de:

**BIÓLOGO**

**Presenta:**

**Luis Brandon Cazares Orozco**

**Director de tesis:**

**DR. LUIS ENRIQUE ARIAS ROMERO**

**TLALNEPANTLA DE BAZ, EDO. DE MÉXICO**

**2017**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

En especial a mi madre Alejandra Orozco por apoyarme en todo, a enseñarme que todo se puede, solo hay que esforzarse mucho para lograrlo. Gracias por darme buenos consejos tanto en mi vida personal como académica, apoyarme moral y emocionalmente, porque siempre estas cuando te necesito; por ser un gran ejemplo de vida y superación. Espero que te encuentres orgullosa de mí; eres el impulso que un hijo necesita para seguir superándose y ser mejor día con día.

A mi padre Juan Luis Cazares por enseñarme que, si una persona de verdad te ama, te acepta con todos tus defectos; por enseñarme a ser una buena persona y que no hay que ser rencoroso, que se debe de luchar por lo que se quiere, aunque sea largo el camino y haya muchos obstáculos para llegar a la meta.

A mis hermanos Edgar, Braulio y Diego por estar presentes en los mejores años de mi vida y tener una buena infancia con ellos; en los juegos, los castigos y los bellos recuerdos; sé que siempre contare con ellos y ellos conmigo en las buenas y en las malas.

A mis compañeros de la carrera Alejandro, Rubén y Boris; porque con ellos pase estos cuatro años de carrera, entre prácticas, clases, fiestas, buenos y malos momentos y poder seguir frecuentándolos.

Al Doctor Luis Enrique Arias por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y apoyarme en la realización de los experimentos, así como la supervisión de esta tesis; por no desesperarse, aunque a veces no entendía las cosas a la primera.

Al Doctor Eloy Pérez, por ayudarme mucho en la supervisión de los experimentos, también dándome consejos para mejorar las técnicas o realizarlas correctamente, por ayudarme en la realización de esta tesis.

A mis abuelitos María, Mónica y Alejandro por apoyarme tanto emocional como económicamente en mis estudios y en mi vida, por tener el placer de tener unos

abuelitos tan buenos y cariñosos, que siempre me apoyen en mis decisiones y vean en mí una persona con un buen futuro.

A todos mis compañeros de laboratorio, en especial a Arturo y Norma por apoyarme en los experimentos, como se realizan las técnicas, las buenas charlas en el tiempo de espera de algunas de estas, por los buenos consejos que siempre me brindaron cuando los requería.

## INDICE

Apartado	Página
1. RESUMEN	9
2. INTRODUCCIÓN	10
2.1 CÁNCER	10
2.2 Estadísticas del cáncer a nivel mundial	11
2.3 Cáncer de mama	13
2.4 Cáncer de mama en México	14
2.5 Clasificación del Cáncer de mama	15
2.5.1 Subtipos Luminales	16
2.5.1.1 Luminal A	16
2.5.1.2 Luminal B	16
2.5.2 HER2 positivo	17
2.5.3 Triple Negativo	17
2.6 Modelos de estudio en el cáncer de mama	18
2.7 Vía Wnt/ -catenina en tejidos normales y en cáncer	19
2.8 Inhibidores farmacológicos de la Vía Wnt/ -catenina	21
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	23
5.1 OBJETIVO GENERAL	23
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1 Cultivo Celular	24

<b>6.2 Extracción de proteínas totales</b>	<b>24</b>
<b>6.3 Western Blot</b>	<b>24</b>
<b>6.4 Ensayos de viabilidad</b>	<b>25</b>
<b>6.5 Ensayos de proliferación celular</b>	<b>25</b>
<b>6.6 Ensayos de apoptosis</b>	<b>25</b>
<b>6.7 Inmunofluorescencia indirecta</b>	<b>26</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>26</b>
<b>7.1 Determinación de la actividad de la vía de Wnt/ -catenina en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo</b>	<b>26</b>
<b>7.2 Efecto de la inhibición de la vía Wnt/ -catenina en la supervivencia celular</b>	<b>28</b>
<b>7.3 Efecto de la inhibición farmacológica de la vía Wnt/ -catenina en la proliferación</b>	<b>29</b>
<b>7.4 Efecto de la inhibición de la vía Wnt/ -catenina en la apoptosis celular</b>	<b>31</b>
<b>7.5 Efecto de la inhibición farmacológica de -catenina en su localización celular y en la expresión de sus genes blanco</b>	<b>32</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b>	<b>37</b>
<b>10. REFERENCIAS</b>	<b>38</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Principales características del cáncer.	<b>11</b>
<b>Figura 2.</b> Principales causas de mortalidad por enfermedad a nivel mundial.	<b>12</b>
<b>Figura 3.</b> Los diez principales tipos de cáncer en mujeres.	<b>13</b>
<b>Figura 4.</b> Incidencia y mortalidad del cáncer en América Latina y otras regiones en mujeres.	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b> Mortalidad por tumores malignos dividida en grupos de edad.	<b>15</b>
<b>Figura 6.</b> Dendrograma con los 4 perfiles de expresión de los distintos subtipos y el perfil de expresión de tejido normal.	<b>15</b>
<b>Figura 7.</b> La vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina.	<b>20</b>
<b>Figura 8.</b> Inhibidores de la vía Wnt y sus distintas moléculas blanco.	<b>22</b>
<b>Figura 9.</b> Compuestos inhibidores de la actividad de $\beta$ -catenina en el núcleo.	<b>23</b>
<b>Figura 10.</b> Determinación de la actividad de la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina en líneas celulares de Cáncer de Mama Triple Negativo.	<b>27</b>
<b>Figura 11.</b> Efecto de la inhibición de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en la viabilidad celular.	<b>29</b>
<b>Figura 12.</b> Efecto de la inhibición de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en la viabilidad celular en la línea celular MCF10A.	<b>30</b>
<b>Figura 13.</b> Efecto de la inhibición de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en la viabilidad celular en la línea celular BT-20.	<b>30</b>
<b>Figura 14.</b> Efecto de la inhibición de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en la viabilidad celular en la línea celular MDA-MB-231.	<b>31</b>
<b>Figura 15.</b> Efecto de la inhibición de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en la apoptosis.	<b>31</b>
<b>Figura 16.</b> Efecto de la inhibición farmacológica de $\beta$ -catenina en su localización celular y en la expresión de sus genes blanco.	<b>34</b>

## ABREVIATURAS

<b>5-FU</b>	5-fluorouracilo
<b>AKT</b>	Proteína Cinasa B
<b>APC</b>	Poliposis Adenomatosa Coli
<b>ARNT</b>	Translocador Nuclear de Receptor de Hidrocarburo Aroli
<b>ASR</b>	Tasa Estandarizada por Edad
<b>BSA</b>	Albumina de Suero Bovino
<b>CCND1</b>	Ciclina D1
<b>CCR</b>	Cáncer Colorrectal
<b>CD24</b>	Clúster de Diferenciación 24
<b>CD44</b>	Clúster de Diferenciación 44
<b>CDK4</b>	Cinasa Dependiente de Ciclina 4
<b>CDKN2A</b>	Inhibidor de la Cinasa Dependiente de Ciclina 2A
<b>CDKN2C</b>	Inhibidor de la Cinasa Dependiente de Ciclina 2C
<b>CDR</b>	Dominio Rico en Cisteína
<b>C-JUN</b>	Oncogen del virus del sarcoma aviar 17
<b>CK1</b>	Casein Cinasa 1
<b>CK14</b>	Citoqueratina 14
<b>CK17</b>	Citoqueratina 17
<b>CK5/6</b>	Citoqueratinas 5/6
<b>C-MYC</b>	Homólogo celular del oncogén viral de la mielocitomatosis aviar
<b>DAPI</b>	4', 6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMEM</b>	Medio de Eagle Modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>Dvl</b>	Dishevelled
<b>ECL</b>	Quimioluminiscencia Aumentada
<b>EGFR</b>	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermico
<b>FDA</b>	Administración de Alimentos y Medicamentos
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FOSL1</b>	FOS Like 1



<b>FOXM1</b>	Caja de Horquilla M1
<b>Fzd</b>	Frizzled
<b>GATA3</b>	Proteína de Unión a GATA3
<b>GSK3-</b>	Cinasa de Glucógeno Sintetasa 3-
<b>HER2</b>	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2
<b>HIF1</b>	Factor Inducible por Hipoxia
<b>HRP</b>	Peroxidasa de Rábano
<b>iCRT</b>	Inhibidor de la Regulación de Transcripción Sensible de $\beta$ -catenina
<b>INPP4B</b>	Inositol Polifosfato-4-Fosfatasa Tipo II B
<b>Kras</b>	Gen homólogo de oncogén de sarcoma de rata.
<b>LDL</b>	Lipoproteína de Baja Densidad
<b>LEF-1/TCF</b>	Factor Potenciador Linfoide/ Factor de Células T
<b>LRP5/6</b>	Proteína relacionada con el receptor LDL 5/6
<b>MEK</b>	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos
<b>MAP3K1</b>	Cinasa de la Cinasa de la Proteína Activada por Mitógenos 1
<b>MDM2</b>	Murino doble minuto 2
<b>MTOR</b>	Diana de Rapamicina en Células de Mamífero
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>N.C.</b>	No Clasificables
<b>p53</b>	Proteína de 53 kDa
<b>PBS</b>	Solución Salina con Fosfato
<b>PI</b>	Yoduro de Propidio
<b>PIK3CA</b>	Subunidad catalítica de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa
<b>PIK3R1</b>	Subunidad 1 Reguladora de Fosfoinositido-3-Cinasa
<b>PORC</b>	Porcupina
<b>PPARD</b>	Receptor Activado por Proliferación de Peroxisoma Delta
<b>PTEN</b>	Homologo Fosfatasa y Tensin
<b>RB1</b>	Co-represor Transcripcional de Retinoblastoma 1
<b>RE</b>	Receptores a Estrógenos
<b>RP</b>	Receptores a Progesterona

<b>RPM</b>	Revoluciones por Minuto
<b>RIPA</b>	Ensayo de Radioinmunoprecipitación
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>SLC39A6</b>	Soluto Portador de la Familia 9 Miembro 6
<b>SLIMB</b>	Inducción de señal de ubiquitinación de I $\kappa$ B $\alpha$ por la proteína F-box
<b>TBS</b>	Solución Salina con Tris
<b>VIH</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana
<b>Wnt</b>	Wingless
<b>-Trcp</b>	Proteína que contiene repetidos de -Transducina

## 1. RESUMEN

El cáncer de mama es la primera causa de mortalidad por neoplasia en el sexo femenino. Las estadísticas reportadas por la Organización Mundial de la Salud, indican que a nivel mundial, una mujer muere aproximadamente cada 15 minutos por esta enfermedad y se calcula que 1 de cada 9 mujeres la desarrollar. En general, el cáncer de mama puede ser clasificado de acuerdo a su perfil de expresión genética en cuatro subtipos intrínsecos dependiendo de la expresión a receptores hormonales y al receptor HER2. El subtipo triple negativo o semejante al basal, se caracteriza por la ausencia en la expresión de los receptores antes mencionados, por ser altamente agresivo y por la falta de terapias dirigidas que lo combatan de manera efectiva. Entre las rutas de señalización afectadas en este tipo de tumores, se encuentra la de Wnt/ -catenina, la cual tiene un papel fundamental en la diferenciación celular, la proliferación y migración durante el desarrollo embrionario y se encuentra hiperactiva en algunos tipos de cáncer. Recientemente, esta vía de señalización ha comenzado a estudiarse en cáncer de mama y se le ha propuesto como un potencial blanco de intervención terapéutica.

En este trabajo, se determinaron los niveles de expresión y la actividad de distintos componentes de la vía canónica de Wnt/ -catenina en modelos celulares de cáncer de mama triple negativo, y se evaluó el efecto de la inhibición farmacológica de la actividad transcripcional de -catenina en procesos celulares como la proliferación, viabilidad, sobrevivencia, expresión de genes blanco de la vía. Los resultados obtenidos indican que la vía canónica de Wnt/ -catenina se encuentra constitutivamente activa en las líneas celulares de cáncer de mama utilizadas, y que la inhibición farmacológica de la vía afecta la viabilidad, reduce la proliferación celular e induce apoptosis en las células transformadas, pero no afecta estos procesos celulares en células de epitelio de glándula mamaria no transformado. Finalmente, observamos que la inhibición farmacológica de -catenina no afecta su localización celular, pero inhibe exclusivamente en las células transformadas la expresión de Ciclina D1, el cuál es un gen blanco de la vía que se encarga de favorecer la progresión del ciclo celular. Estos resultados sugieren que la vía canónica de Wnt/ -catenina es fundamental para la sobrevivencia y proliferación de las células de cáncer de mama triple negativas, lo que la convierte en un potencial blanco terapéutico.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **2.1 CÁNCER**

Se ha adjudicado el término “cáncer” a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte de un organismo; algunos factores extrínsecos, tales como el tabaco, organismos infecciosos, mala alimentación y algunos intrínsecos como mutaciones genéticas hereditarias, hormonas y condiciones inmunes pueden actuar por separado o en conjunto para ayudar a su progresión [1].

En un estado homeostático las células crecen y si es necesario se dividen, formando así nuevas células; cuando una célula se deteriora o envejecen, mueren y otra ocupa su lugar; esto está coordinado por cuatro programas esenciales, que son: la división celular, la diferenciación, la senescencia y la apoptosis [2]. Por otra parte las células cancerosas adquieren autonomía en el control de la señalización que regula los procesos ya mencionados, lo que causa un crecimiento irregular y propagación, con la capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos; si no son detectadas a tiempo y tratadas, pueden causar la muerte [3].

Las células cancerosas presentan diferentes características como son: evasión de supresores de crecimiento, evasión del sistema inmune, inmortalidad replicativa, inflamación, invasión y metástasis, inducción de la angiogénesis, inestabilidad genómica y mutaciones, resistencia a muerte celular, desregulación del metabolismo energético y autosuficiencia a señales de crecimiento [Figura 1]. Dichas alteraciones comunmente lleva a la proliferación celular, y la inactividad de supresores de las vías apoptóticas y tumorales [4].



**Figura 1.** Principales características del cáncer [4].

## 2.2 Estadísticas del cáncer a nivel mundial

El cáncer es una enfermedad con una alta incidencia entre los adultos, comparado con niños o jóvenes y se ha observado una diferencia en los tipos de cáncer que afectan a hombres y mujeres [5]. Es una de las causas principales de muerte tanto en países desarrollados como subdesarrollados [6]. Ciertos hábitos de vida aumentan los riesgos de desarrollar cáncer, entre los que se incluyen: el tabaquismo (asociado al desarrollo de cáncer de pulmón, colorrectal, estómago e hígado) mala alimentación e inactividad física que conllevan a sobrepeso (asociados al desarrollo de cáncer de mama y colorrectal) [7]. La Organización Mundial de la Salud en 2015 identificó que a nivel mundial los tumores malignos de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado son los más frecuentes en hombres, mientras que en mujeres lo son el de mama, el colorrectal, de pulmón, cérvico uterino y de estómago [8].



**Figura 2.** Principales causas de mortalidad por enfermedad a nivel mundial [6].

En el Informe Mundial de cáncer en 2014 las neoplasias malignas se encuentran en el primer lugar en muertes presentando 7.87 millones con respecto a la enfermedad isquémica del corazón (7.02 millones), infartos fulminantes (6.25 millones), infecciones del tracto respiratorio inferior (3.20 millones), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (2.97 millones), enfermedades diarreicas (1.89 millones), VIH/SIDA (1.59 millones), diabetes mellitus (1.39 millones), accidentes en carretera (1.26 millones) y complicaciones en el parto prematuro (1.17 millones) [Figura 2] [6].



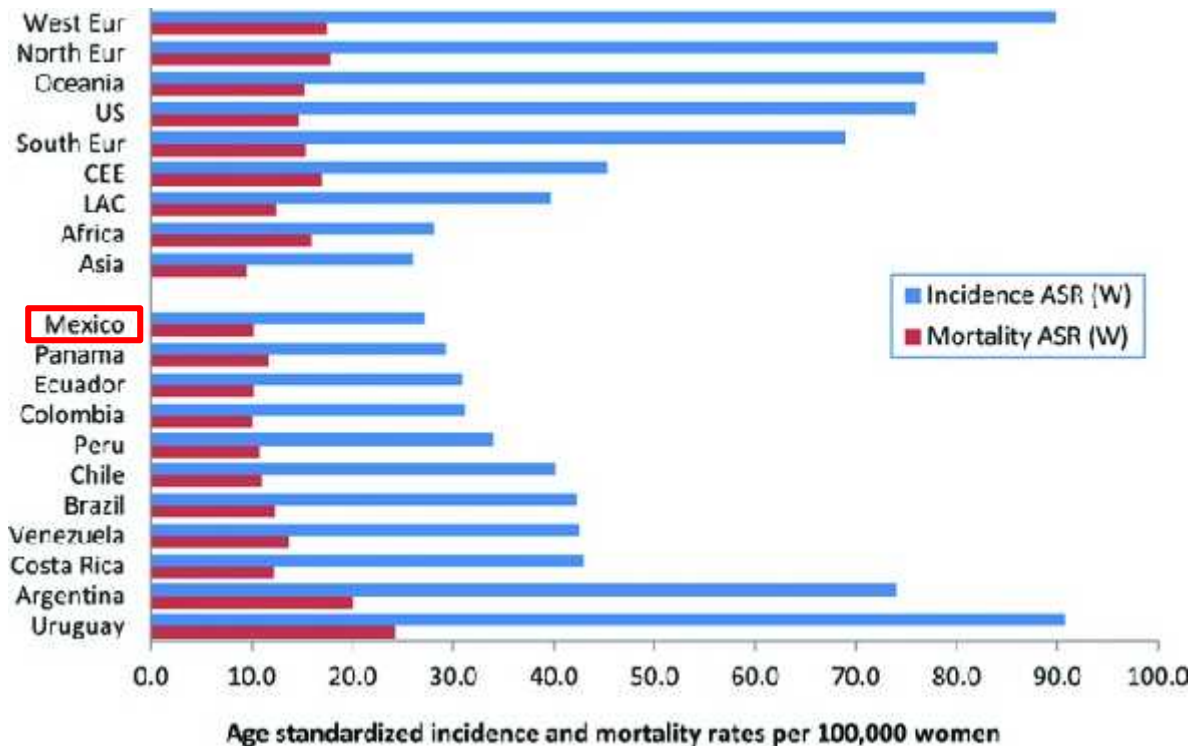
**Figura 3.** Los diez principales tipos de cáncer en mujeres, para nuevos casos y muerte [9].

### 2.3 Cáncer de mama

De acuerdo a las Estadísticas del cáncer; el cáncer de mama se encuentra en el primer lugar de incidencia presentando 252,710 nuevos casos y 71,280 muertes en Estados Unidos [Figura 3] [9].

El cáncer de mama es la segunda causa de muerte en mujeres de países desarrollados y la primera en países con un menor desarrollo económico. Se reportaron 1.7 millones de casos y 521,900 muertes en 2012 y en ese mismo año fue el cáncer más común diagnosticado, representando el 25.2% y causó el 15% de todas las muertes por cáncer [7,10]. Entre los factores de riesgo para el desarrollo de este cáncer están incluidos los reproductivos y hormonales, así como periodos largos de menstruación, uso de anticonceptivos vía oral y no haber tenido hijos [11]. Entre los factores de riesgo que pueden ser modificados están el aumento de peso pasando los 18 años, sobrepeso u obesidad

(cáncer de mama pasando la menopausia), uso de terapias hormonales para la menopausia (estrógeno y progestina en combinación), sedentarismo y consumo de alcohol [11,12].



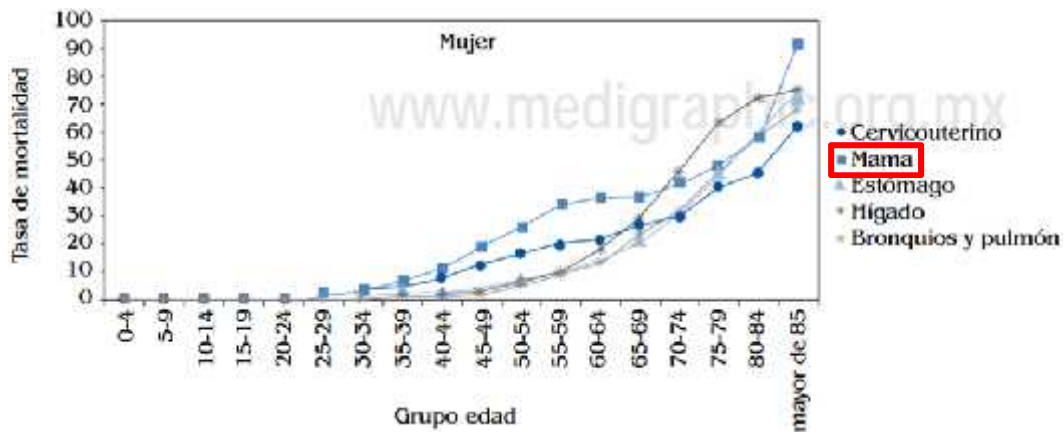
**Figura 4.** Incidencia y mortalidad del cáncer en América Latina y otras regiones en mujeres [13].

## 2.4 Cáncer de mama en México

México presenta una tasa de incidencia de cáncer de mama de alrededor de 27 casos por cada 100,000 mujeres, mientras que la tasa de mortalidad es de 10 muertes por cada 100,000 mujeres [ASR: tasa estandarizada por edad] (Figura 4) [13].

El diagnóstico de cáncer de mama en México se hace en etapas avanzadas (III, IV y N.C. [no clasificables]) en dos tercios de los pacientes y la mayoría son menores de 50 años [14]. En 2009 el Instituto Mexicano del Seguro Social reportó que más del 50% de las pacientes detectadas con cáncer de mama se encontraban en estadios metastásicos, lo que representa un gran problema de salud, ya que es más difícil tratarse en estos estadios que en otros menos avanzados [15].

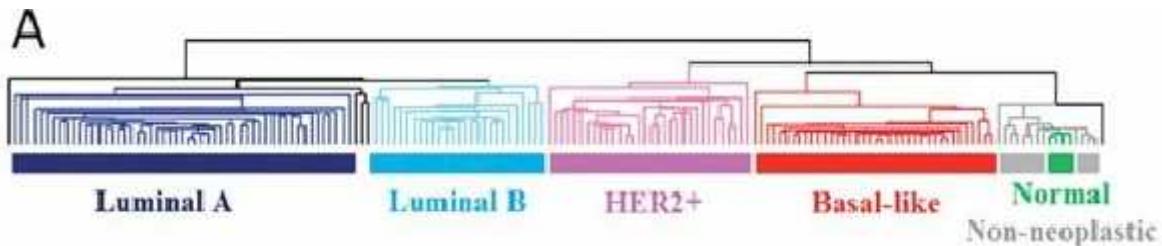




**Figura 5.** Mortalidad por tumores malignos dividida en grupos de edad de 2012, donde se observa que el cáncer de mama es la causa número uno de muerte en los rangos de edad de 25 a 69 años [16].

## 2.5 Clasificación del Cáncer de mama

Los tumores de mama son altamente heterogéneos y responden de diferente forma a los tratamientos; diversos investigadores realizaron una clasificación molecular del cáncer de mama de acuerdo a los perfiles de expresión genética de 65 muestras quirúrgicas de tumores de mama humanos [17].



**Figura 6.** El dendrograma cluster muestra los 4 perfiles de expresión de los distintos subtipos y el perfil de expresión de tejido normal localizados mediante expresión génica de cáncer de mama designados como luminal A, luminal B, HER2 positivo, de tipo basal o triple negativo, y normal (no neoplásico) [6].

Este análisis, permitió agrupar a los tumores de mama en al menos cuatro subtipos moleculares de cáncer de mama, los cuales presentan distintas características:

## **2.5.1 Subtipos Luminales**

Expresan receptores hormonales y presentan un patrón que se asemeja con el componente epitelial luminal de la glándula mamaria [17]. Expresa las citoqueratinas luminales 8/18, Receptores a Estrógenos y genes como LIV1 (SLC39A6 Solute Portador de la Familia 9 Miembro 6) y CCND1 (Ciclina D1) que son asociados con su activación [17,18]. Pocos presentan mutación en p53 (menos del 20%) y en su mayoría son de grado 1 [17]. Existen dos subtipos:

### **2.5.1.1 Luminal A**

Tiene una alta expresión de genes relacionados con RE (Receptores de Estrogenos), RP (Receptores de Progesterona) y baja expresión de genes relacionados con la proliferación celular [18,19]. En un estudio con 466 tumores el 87% fueron positivos al gen receptor de estrógeno, 7% es HER2 positivo, 12% presenta mutaciones en p53, el 14% presenta ganancia de MDM2, 49% mutaciones en PIK3CA, 13% pérdida o mutación de PTEN, pérdida de INPP4B en un 9%, amplificación de la ciclina D1 en un 29%, un 14% ganancia de CDK4, baja expresión de CDKN2C, alta expresión de RB1, un 14% presenta mutaciones en GATA3 y MAP3K [20]. Este subtipo es el más frecuente y representa el 67% de los tumores [21]. Los pacientes con este tipo de cáncer de mama tienen un buen pronóstico; la tasa de recaída es significativamente menor que la de los otros subtipos [22].

### **2.5.1.2 Luminal B**

Tiene un fenotipo más agresivo a comparación del luminal A; en este subtipo molecular el 87% es positivo a RE y RP; y a diferencia de subtipo luminal A, este presenta altos niveles de expresión de proteínas relacionadas con la proliferación celular incluyendo HER2 y EGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial), así como PI3K / AKT / MTOR [23], el 32% presenta mutaciones en p53, el 31% presenta ganancia de MDM2, 24% mutaciones o perdida de PTEN, un 16% presenta pérdida de INPP4B, amplificación de la ciclina D1 en un 58%, 25% ganancia de CDK4 y un 5% mutaciones en MAP3K1 [20]. Estos tumores tienden a ser de más alto grado de malignidad que el subtipo luminal A [24].

Debido a los subtipos luminales son positivos a RE se utiliza el tamoxifeno como una terapia para su tratamiento, ya que es un análogo a estrógenos.

### **2.5.2 HER2 positivo**

La principal característica del tumor es que presenta la sobre expresión y amplificación del gen que codifica a HER2 (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2) que es un receptor de membrana con actividad de tirosina cinasa , 75% presenta mutaciones en p53, 30% ganancia de MDM2, 42% presenta mutación o pérdida en PIK3CA, pérdida o mutación de PTEN en un 19%, pérdida de INPP4B en un 30%, amplificación de ciclina D1 en un 38%, ganancia de CDK4 en un 24% y 8% mutaciones en PIK3R1 [20]. Responde de manera positiva al tratamiento con anticuerpos monoclonales, entre los que se encuentra el Trastuzumab que evita la dimerización del receptor, evitando la activación de las rutas de señalización río abajo.

### **2.5.3 Triple Negativo**

Se caracteriza por la falta de expresión de RE, RP, HER2; aunque presentan un aumento en la expresión de citoqueratinas de alto peso molecular tales como CK5/6, CK14 y CK17, vimentina, p-caderina, b cristalina, caveolinas 1 y 2, así como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), ganancia de CD44 y pérdida de CD24 [25].

Tiene un perfil de expresión genética similar al de las células epiteliales basales y mioepiteliales normales del tejido mamario [17]. El 84% presenta mutaciones en p53, el 14% ganancia de MDM2, 7% mutaciones en PIK3CA, pérdida o mutación de PTEN, pérdida de INPP4B, mutación o pérdida de RB1, amplificación de la Ciclina E1 en un 9%, alta expresión de CDKN2A, baja expresión de RB1, hiperactividad de FOXM1, C-MYC y HIF1 / ARNT [20].

Debido a la falta de receptores de hormonas o sobreexpresión de HER2, las terapias dirigidas contra estos receptores no presentan eficacia [25]. Es un subtipo agresivo y de metástasis prematura, con limitadas opciones de tratamiento y mal pronóstico [21,26]. De aproximadamente 1 millón de casos de cáncer de mama diagnosticados al año en el mundo, se tiene calculado que más de 170,000 albergará el fenotipo triple negativo [27]. Lo que nos

deja con la necesidad de desarrollar tratamientos con mayor eficacia para los pacientes con este subtipo de cáncer de mama [28].

## **2.6 Modelos de estudio en el cáncer de mama**

Las líneas celulares de cáncer humano son una buena herramienta para el estudio de la biología, la genética, en muchos modelos de tumores, donde se incluye el cáncer de mama. Las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo son útiles para el estudio de aberraciones moleculares y el estudio de las vías de señalización afectadas ya que conservan varias de las características de los tumores de donde fueron aisladas tanto morfológica como molecularmente [29]. La línea celular más antigua de este subtipo de cáncer es BT-20, establecida de un derrame pleural en los años 50's y muchas otras de las líneas comúnmente empleadas como MDA-MB-231 se establecieron en la década de los 70's. La línea celular BT-20 fue obtenida de un carcinoma ductal infiltrante, de una mujer caucásica de 74 años, presenta mutación en P53 y PIK3CA y amplificación EGFR; mientras que MDA-MB-231 fue obtenida de un adenocarcinoma, de una mujer caucásica de 51 años y presenta mutaciones en P53 y KRas [29].

Hay seis líneas celulares no tumorigénicas; un ejemplo de estas líneas celulares es MCF10A, la cual fue inmortalizada de tejido mamario benigno de una mujer que tenía una enfermedad fibroquística y es derivada de la mastectomía por enfermedad benigna [29,30]. Esta línea celular tiene una definida morfología epitelial y en modelos de cultivos tridimensionales recrea la arquitectura de los ductos de una glándula mamaria normal [31].

En los modelos de líneas celulares se han estudiado una gran variedad de procesos celulares y se ha establecido que son regulados por vías de señalización.

Varias vías de señalización que se encuentran implicadas en la progresión del ciclo celular y la supervivencia se encuentran desreguladas en cáncer de mama, algunos ejemplos son las vías de Notch, Wnt y Sonic Hedgehog; por esta razón se han propuesto a proteínas señalizadoras clave dentro de estas vías como posibles blancos de intervención terapéutica [32]. De las distintas rutas de señalización antes mencionadas, la vía de Wnt ha llamado la atención desde hace algunos años, ya que se encuentra constitutivamente activa en un porcentaje importante de tumores de colon, recientemente se ha descrito que también está activa en tumores de mama.

## 2.7 Vía Wnt/ $\beta$ -catenina en tejidos normales y en cáncer

La vía Wnt/  $\beta$ -catenina tiene un papel fundamental en la diferenciación celular, la proliferación y migración durante el desarrollo embrionario, y se ha reportado que algunos componentes de esta vía presentan mutaciones en algunos tipos de cáncer, lo que mantienen constitutivamente activa a esta ruta de señalización y promueve el desarrollo y progresión tumoral, incrementando las tasas de proliferación, angiogénesis, supervivencia y metástasis; por lo que se le ha propuesto como un potencial blanco de intervención terapéutica [33].

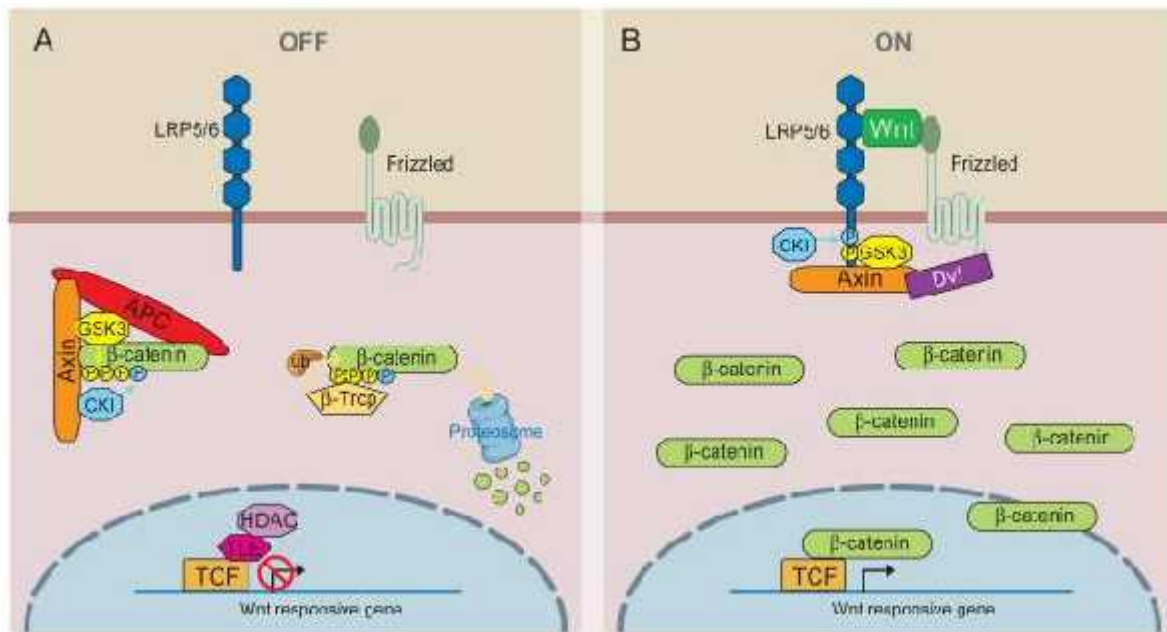
Las vías de Wnt están constituidas por distintas moléculas señalizadoras, las cuales se encargan de transmitir las señales que recibe la célula en su membrana plasmática hacia el interior de la célula. En general, estas rutas de señalización se clasifican en tres distintos tipos: la vía no canónica de polaridad celular planar, la vía no canónica dependiente de calcio y la vía canónica. De estas tres, la más estudiada es la vía canónica, que es en la que está enfocada este trabajo [33].

La vía canónica de Wnt se activa cuando alguno de sus ligandos se encuentra presente en el contexto celular, se une al dominio rico en cisteína (CDR) en el extremo amino de un receptor con siete dominios transmembranales llamado Frizzled (Fz/Fzd) [34] y una lipoproteína de baja densidad (LDL) relacionada con el receptor 5/6 (LRP5/6) [Figura 7] [35], esto produce que proteínas cinasas localizadas cerca de este complejo fosforilen a LRP5/6 y a otra proteína llamada Dishevelled; favoreciendo el reclutamiento del complejo de regulación negativa de  $\beta$ -catenina, formado por las proteínas Axina, APC (Poliposis Adenomatosa Coli), CK1 (Casein Quinasa 1), GSK3 $\beta$  (Cinasa de Glucógeno Sintetasa 3 $\beta$ ), impidiendo la fosforilación, ubiquitinación y degradación de  $\beta$ -catenina.

Una vez activada,  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma y posteriormente es transportada al núcleo para formar un complejo con los factores de transcripción LEF-1/TCF (Factor Potenciador Linfocitario/ Factor de Células T), adoptando la función de co-activador para inducir la transcripción de los genes blanco. Entre los que se encuentran: c-Myc, c-Jun, ciclina D1 (CCND1), receptor activado por proliferación de peroxisoma delta (PPARD), FOS

Like 1 (FOSL1), entre otros; los cuales están asociados con la proliferación, diferenciación, supervivencia, apoptosis, y la motilidad celular [36].

En ausencia del ligando Wnt,  $\beta$ -catenina es fosforilada en la serina 45 por CK1 y en treonina 41, serina 37 y serina 33 por GSK3- [37], marcándola para que sea reconocida y ubiquitinada por la proteína que contiene repeticiones beta-transducina ( $\beta$ -Trcp/SLIMB) que ubiquitinan con la ligasa E3 en las lisinas 19 y 49; [37,38] para su posterior degradación por la vía del proteasoma, y por lo tanto evitar la transcripción de los genes blanco de TCF/LEF/  $\beta$ -catenina [39–42].



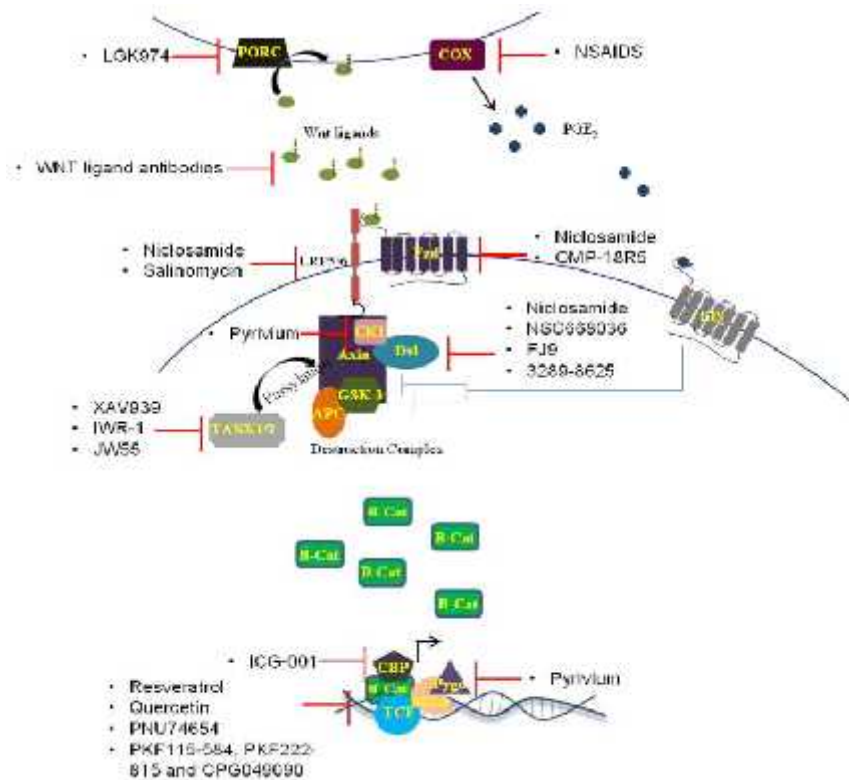
**Figura 7.** La vía canónica de Wnt/  $\beta$ -catenina inactiva (OFF) y activa (ON). A) Se observa que el ligando Wnt no se encuentra presente y no se une a su receptor de membrana Frizzled y a LRP5/6, por lo que el complejo regulador de  $\beta$ -catenina (formado por Axina, APC, GSK3 y CK1) fosforila a  $\beta$ -catenina para su posterior ubiquitinación por  $\beta$ -Trcp y degradación mediante el proteasoma, lo que impide la unión de  $\beta$ -catenina con los factores de transcripción LEF-1/TCF. B) Cuando el ligando Wnt se une al receptor de membrana Frizzled y a LRP5/6, esto produce que proteínas cinasas localizadas cerca de este complejo fosforilen a LRP5/6 y a otra proteína llamada Dishevelled; favoreciendo el reclutamiento del complejo de regulación negativa de  $\beta$ -catenina, impidiendo la fosforilación de  $\beta$ -catenina, una vez activa,  $\beta$ -catenina se acumula en el citoplasma y posteriormente es transportada al núcleo para formar un complejo con los factores de transcripción LEF-1/TCF y así inducir la transcripción de los genes blanco [43].

Algunos estudios han mostrado que la vía de señalización Wnt/  $\beta$ -catenina se encuentra hiperactiva en un subgrupo de tumores de cáncer de mama triple negativo altamente invasivos y está asociado con una mala evolución clínica [39–42,44], lo que sugiere que esta vía de señalización juega un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer de mama triple negativo [40].

Un estudio realizado por Blagodatski y colaboradores en 2014 mostró que, de 245 carcinomas de mama invasivo, un subgrupo presenta un fenotipo triple negativo, y se observó que en estos tumores,  $\beta$ -catenina se acumula en el núcleo [42], donde ejerce su función de factor de transcripción de genes involucrados en proliferación, migración y sobrevivencia.

## **2.8 Inhibidores farmacológicos de la Vía Wnt/ $\beta$ -catenina**

Recientemente se han identificado varios inhibidores de esta vía; entre los que se encuentran anticuerpos neutralizantes, inhibidores de poli (ADP ribosilación) e inhibidores de cinasas entre otros, y los cuales se muestran en la figura 8; un aspecto importante para la selección del inhibidor que se va a emplear, es el proceso celular que se pretende estudiar, ya que  $\beta$ -catenina tiene importancia en otras funciones biológicas e incluso pueden participar en otras rutas de señalización, un ejemplo es que interactúa con E-cadherina en las uniones célula a célula y es de vital importancia para el mantenimiento de la polaridad celular [33], una alteración en la estabilidad de las uniones adherentes afecta la polaridad celular y la estructura del tejido, lo que favorece que las células en lugar de mantenerse unidas entre sí, adquiriendo un fenotipo migratorio [45]. Por tal motivo es importante identificar compuestos que solo impidan la función transcripcional de  $\beta$ -catenina sin interferir con sus otras funciones biológicas.



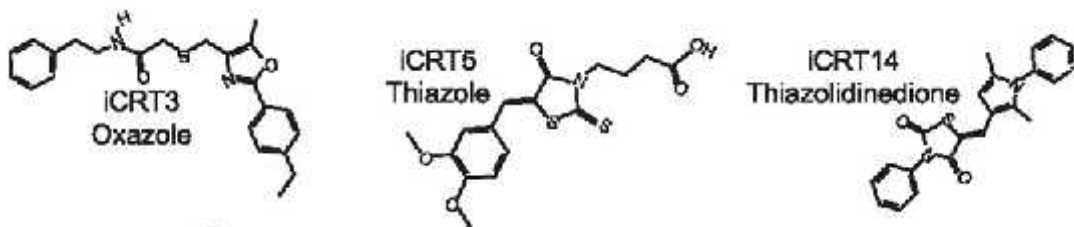
**Figura 8.** Inhibidores de la vía Wnt y sus distintas moléculas blanco. Esta figura nos muestra la mayoría de inhibidores de esta vía, donde se encuentran desde los secretores del ligando Wnt, como LGK947 que inhibe PORC; hasta los blancos transcripcionales de Wnt, como el Reveratrol y Quercetin entre otros, que inhiben la unión del complejo TCF/LEFT/ -CATENINA con el ADN [33].

Recientemente, Gonsalves y colaboradores sintetizaron una serie de compuestos a los que llamaron iCRTs los cuales tienen la propiedad de bloquear la unión de -catenina con TCF/LEF, inhibiendo la actividad transcripcional de -catenina sin afectar otras de sus funciones biológicas. Entre este grupo de compuestos se encuentran iCRT3 que pertenece a la clase del oxazol, iCRT5 estrechamente relacionado con el tiazol e iCRT14 que es de la clase de las tiazolidindionas [Figura 9] [45].

Es importante mencionar que este estudio se determinaron los efectos citotóxicos de iCRTs en líneas celulares de cáncer de colon humano y se encontró una eficacia comparable a la de fármacos contra el cáncer aprobados por la FDA, tales como 5-FU [45].

En otros trabajos se ha comprobado que las tiazolidindionas tienen un efecto directo sobre -catenina, suprimiendo su señalización en células cancerosas de próstata [46].





**Figura 9.** Compuestos inhibidores de la actividad de  $\beta$ -catenina en el núcleo [45].

### 3. JUSTIFICACIÓN

Aunque la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina ha sido ampliamente estudiada y caracterizada en algunos tipos tumorales, principalmente en cáncer colorrectal (CCR), es poco lo que se sabe sobre su participación en cáncer de mama y particularmente en el subtipo triple negativo, se ha sugerido que esta ruta de señalización podría ser un atractivo blanco terapéutico para el tratamiento de este subtipo de cáncer [35,47] y los efectos biológicos directos sobre las células de cáncer de mama triple negativo que tienen los iCRT's no han sido estudiados. Por lo que el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la inhibición de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en un modelo celular de Cáncer de Mama Triple Negativo.

### 4. HIPÓTESIS

La inhibición farmacológica de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina tiene un impacto negativo en la sobrevivencia y proliferación de líneas celulares de Cáncer de Mama Triple Negativo.

#### 5.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de la inhibición de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en un modelo celular de Cáncer de Mama Triple Negativo.

#### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar mediante western blot la actividad y los niveles de expresión de algunas de las proteínas de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en distintas líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.

- Evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de la vía de Wnt/ -catenina en la proliferación y supervivencia de líneas celulares de Cáncer de Mama Triple Negativo.
- Evaluar el efecto de la inhibición farmacológica de la vía Wnt/ -catenina en la localización celular de esta proteína y en la expresión de algunos de sus genes blanco.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

**6.1 Cultivo Celular.** Todas las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron obtenidas de ATCC. Las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo BT20 y MDA-MB-231, fueron cultivadas en DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y una mezcla de antibiótico/antimicótico al 1%. La línea celular MCF10A de epitelio de glándula mamaria no transformado, fue cultivada en DMEM/F12 suplementado con SFB al 10% y una mezcla de antibiótico/antimicótico al 1%. Todos los cultivos celulares fueron mantenidos en una incubadora a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5%.

**6.2 Extracción de proteínas totales.** Las proteínas totales de las distintas líneas celulares se obtuvieron a partir de cultivos celulares confluentes hechos en cajas confluentes de 10 cm de diámetro. Brevemente, las células fueron lavadas una vez con 3 ml de PBS y lisadas en 200 µl de buffer RIPA que contenía una mezcla 1X de inhibidores de proteasas y fosfatasas COMPLETE® (Roche Pharma). Con la ayuda de un gendarme los lisados fueron transferidos a tubos eppendorf y se centrifugaron a 13000 RPM durante 10 minutos, después se recuperó el sobrenadante y se transfirió a tubos nuevos. Posteriormente las proteínas se cuantificaron mediante la técnica de Lowry empleando el kit DC protein assay® (Bio Rad).

**6.3 Western Blot.** Para analizar los niveles de las proteínas que participan en la vía Wnt/ -catenina, usando extractos de proteínas totales obtenidos de las líneas celulares MCF10A, MDA-MB-231 y BT-20, se empleó el protocolo descrito por Towbin et al [48]. Brevemente, 50 µg de proteínas fueron separados en geles de poliacrilamida entre el 7.5 y 12% por electroforesis a 120 V durante 1hr 30 min y posteriormente se transfirieron a una membrana Immun-Blot PVDF® (BIO RAD) durante 2 hrs a 350 mA. Para verificar que las proteínas se hubieran transferido a la membrana de PVDF, se tiñó la membrana con una solución de

rojo de Ponceau 0.5% en ácido acético al 2% durante 5 minutos en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas con leche al 5% en TBS-Tween 20 al 0.5% durante 1 hr a temperatura ambiente en agitación. A continuación las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas APC (1:1500), GSK-3 total (1:1000), P-Ser 9 GSK3 (1:1000), -catenina activa (no fosforilado) (1:1000), -catenina total (1:100) y actina (1:5000), durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente las membranas se lavaron 3 veces con TBS – Tween 20 al 0.5% durante 15 minutos en agitación a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron en presencia de los anticuerpos secundarios respectivos, los cuales estaban acoplados a HRP. El anticuerpo anti-conejo se utilizó a una dilución 1:10,000, el anti-cabra a una dilución 1:10,000 y el anti-ratón a dilución 1:10,000 todos ellos de Cell Signaling Technology, en TBS-Tween 20 al 0.5% con leche al 5% durante 1 hr a temperatura ambiente, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-Tween 20 al 0.5%. La inmunodetección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia, empleando el kit Clarity ECL Western Substrate (Bio Rad). Todos los Western Blot se hicieron al menos tres veces de manera independiente.

**6.4 Ensayos de viabilidad.** Los ensayos de viabilidad se hicieron empleando la técnica de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). En primer lugar, se sembraron 2,000 células por pozo en placas de 96 pozos, las células fueron tratadas con iCRT-3, 1  $\mu$ M durante 48 horas en un volumen final de 100  $\mu$ l; posteriormente se agregó 60  $\mu$ l de MTT por pozo, las células se incubaron durante 4 horas, y posteriormente se retiró el medio y se agregaron 100  $\mu$ l de DMSO, la placa se incubó 15 minutos en oscuridad y la absorbancia se determinó usando un Epoch de BioTek a 590 nm. Como control de viabilidad las células fueron tratadas como fue descrito usando el vehículo DMSO al 0.5%.

**6.5 Ensayos de proliferación celular.** Para determinar el efecto de la inhibición de -catenina en la proliferación y sobrevivencia de líneas celulares de Cáncer de Mama Triple Negativo se empleó el inhibidor farmacológico iCRT3, el cual impide la unión de -catenina a TCF/LEF y por lo tanto bloquea su actividad transcripcional. Brevemente, 3000 células de las distintas líneas de Cáncer de Mama Triple Negativo fueron sembradas en placas de 24 pozos, tratadas con vehículo (DMSO) o con 1  $\mu$ M de iCRT3 y contadas utilizando una cámara de Neubauer, cada 24 horas durante un periodo de 96 horas. Todos los experimentos fueron hechos por triplicado en al menos tres veces de manera independiente.

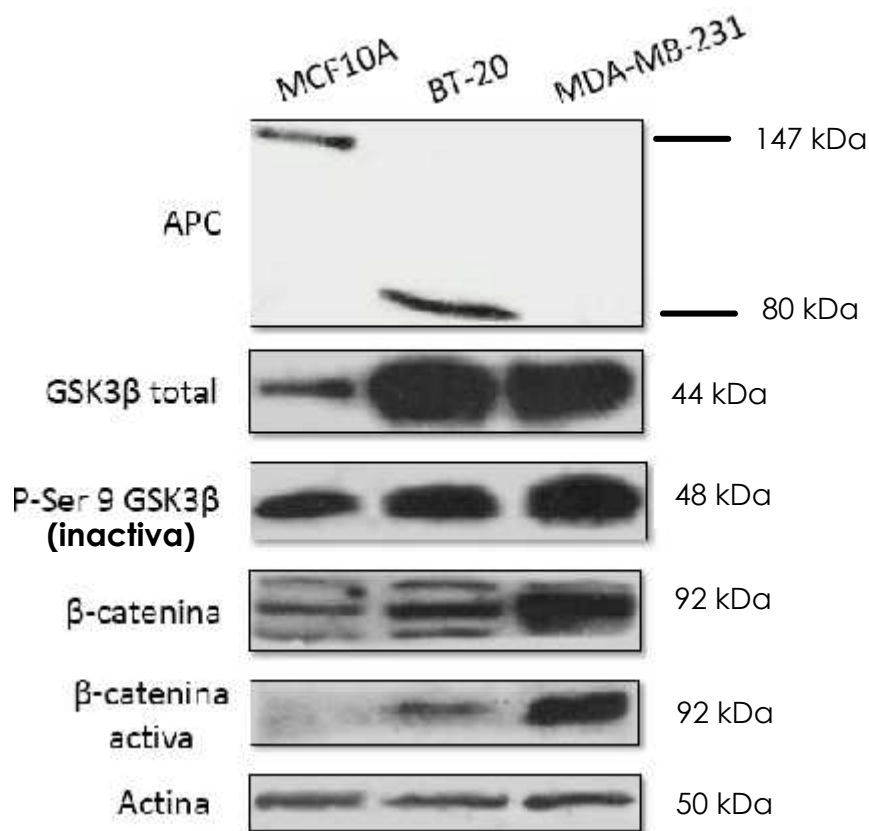
**6.6 Ensayos de apoptosis.** Para determinar el efecto de la inhibición de la vía de Wnt en sobrevivencia de las distintas líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, se realizaron ensayos de apoptosis empleando el kit Annexin V/Dead Cell Apoptosis de BD Biosciences de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor. Las células fueron tratadas con DMSO o 1 $\mu$ M de iCRT3 durante 48 hrs. Las células se lavaron con PBS e incubaron con tripsina al 0.04% durante 5 minutos. Posteriormente se transfirieron a tubos eppendorf, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante, se agregó 2.5  $\mu$ l de FITC annexin V y 0.5  $\mu$ l del Yoduro de propidio (PI) a una concentración de 100  $\mu$ g/ $\mu$ l, se incubaron durante 15 minutos a oscuridad, y las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo Attune® NxT Acoustic Focusing.

**6.7 Inmunofluorescencia indirecta.** Las líneas celulares MCF10A, BT-20 y MDA-MB-231 se sembraron en cubreobjetos estériles colocados en una placa de 6 pozos y se dejaron establecer durante 24 horas. Posteriormente fueron tratadas con 1  $\mu$ M de iCRT durante 48 horas. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con Tritón X - 100 al 0,1% durante 15 minutos a 4 °C. Posteriormente se bloquearon con BSA al 1% durante una hora y media, se incubaron con el anticuerpo monoclonal de conejo que reconoce específicamente a  $\beta$ -catenina activa a una dilución 1:200 durante 1 hr a temperatura ambiente. Después las laminillas se lavaron tres veces con PBS- Tritón X - 100 al 0.05% durante 15 minutos. A continuación, las células se incubaron con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado Alexa Fluor® 594 a una dilución de 1: 1.000 y con Faloidina Rodamina a una dilución 1:500 durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Las muestras se lavaron tres veces con PBS- Tritón X100 al 0.05% durante 15 minutos. Finalmente, los cubreobjetos se montaron en un portaobjetos con 25  $\mu$ l de Vectashield con DAPI y se sellaron con barniz. Las células se visualizaron utilizando Leica TCS SP5 X microscopio confocal. Las imágenes se adquirieron con el software LAS X 2017.

## **7. RESULTADOS**

**7.1 Determinación de la actividad de la vía de Wnt/  $\beta$ -catenina en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.** La regulación de la vía Wnt se ha visto implicada en la biología del cáncer [49]. En el cáncer de mama se ha reportado que en el subtipo triple negativo esta vía puede estar activa y se ha sugerido que es relevante para el desarrollo

de este tipo de cáncer [39–42,44]. Con el propósito de determinar la actividad de la vía de Wnt en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, se analizaron mediante Western Blot los niveles de expresión de las proteínas APC, GSK-3 y  $\beta$ -catenina; así como los niveles de fosforilación de GSK-3 y  $\beta$ -catenina, para determinar su actividad [Figura 10].



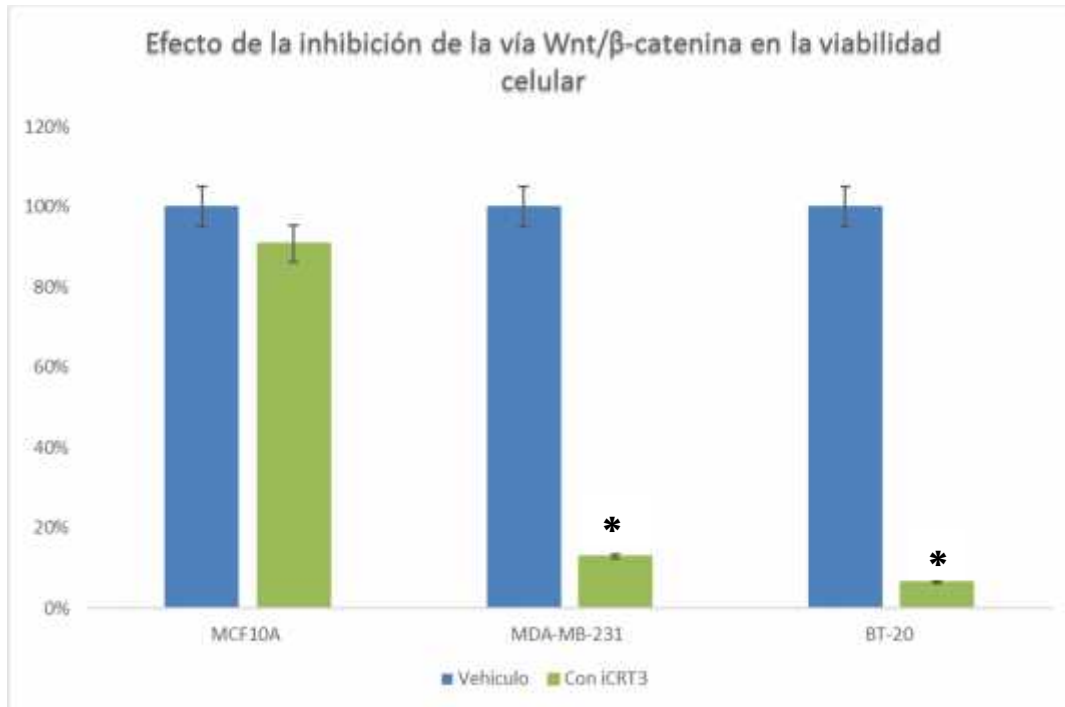
**Figura 10.** Determinación de la actividad de la vía de Wnt/  $\beta$ -catenina en líneas celulares de Cáncer de Mama Triple Negativo.

Los resultados obtenidos muestran los extractos totales de células MCF10A expresan a la proteína APC completa, con un peso molecular estimado de 140 kDa, también se observa la expresión de GSK3 y los niveles basales de su forma activa, en el caso de  $\beta$ -catenina, se observa su expresión, pero esta no se encuentra activa.

De manera interesante, se observa que en la línea celular BT-20, APC se encuentra truncada (en un peso aproximado de 80 kDa) y en la línea celular MDA-MB-231 no se expresa, en la línea celular BT-20 los niveles de GSK3 se encuentran incrementados aproximadamente 7 veces y en la línea celular MDA-MB-231 6.5 veces con respecto a la

línea no transformada. Los resultados también muestran que en la línea celular BT-20, GSK3 se encuentra aproximadamente 1.5 veces más fosforilada que en la línea no transformada, mientras que en la línea celular MDA-MB-231 se encuentra 2.18 veces más fosforilada; lo que indica que se encuentra inactiva en ambas líneas celulares. Con respecto a  $\beta$ -catenina, se puede observar que en la línea celular BT-20, hay 1.6 veces más y en MDA-MB-231, hay 2.6 veces más de esta proteína a comparación de la línea no transformada, lo que concuerda con la inactividad de GSK3 mencionada previamente. Finalmente, se pudo observar que, en ambas líneas celulares de cáncer de mama,  $\beta$ -catenina se encuentra mucho más activa que en la línea celular no transformada, aproximadamente 2.26 veces más en BT-20 y 6 veces más en MDA-MB-231.

**7.2 Efecto de la inhibición de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina en la sobrevivencia celular.** La vía de señalización Wnt/  $\beta$ -catenina está implicada en la diferenciación celular, la proliferación y migración [35]. Se sabe que estos procesos son regulados por la expresión de genes blancos transcripcionales de  $\beta$ -catenina. Algunos de estos son c-Myc, c-Jun, ciclina D1 (CCND1), receptor activado por proliferación de peroxisoma delta (PPARD), FOS Like 1 (FOSL1) [36]. Para investigar el efecto de la inhibición farmacológica de la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina, las líneas celulares MCF10A, BT-20 y MDA-MB-231, se incubaron en presencia del inhibidor iCRT3 durante 48 horas y se evaluó su viabilidad empleando el ensayo de MTT. Como control negativo se utilizó el vehículo en el cual estaba resuspendido el inhibidor.

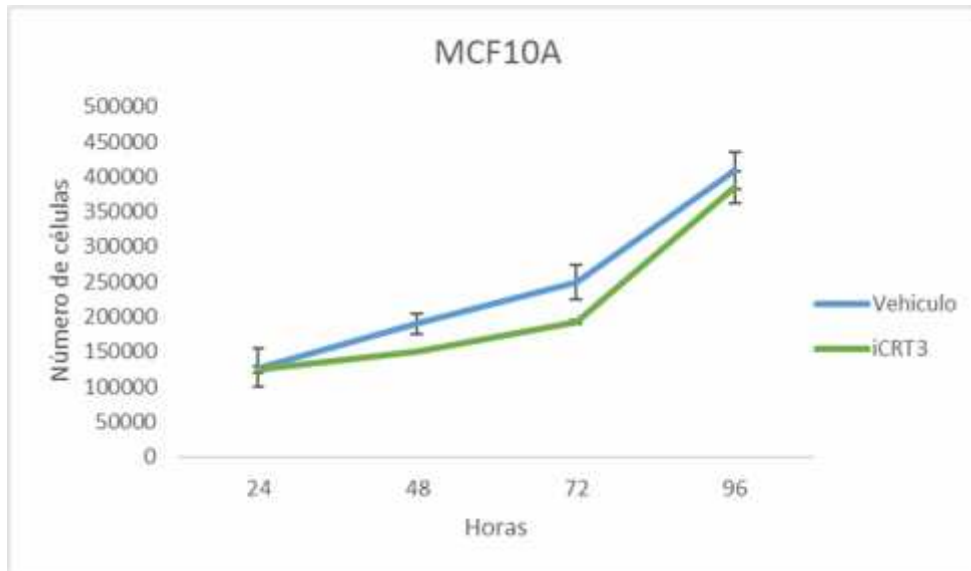


**Figura 11.** Efecto de la inhibición de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina en la viabilidad celular. Las gráficas muestran el efecto de la inhibición de  $\beta$ -catenina en la viabilidad de las líneas celulares MCF10A; MDA-MB-231 y BT-20 incubadas con vehículo (barras azules) o tratadas con iCRT3 (barras verdes). Los resultados expresados como porcentaje  $\pm$  desviación estándar (\* $P$  0.001).

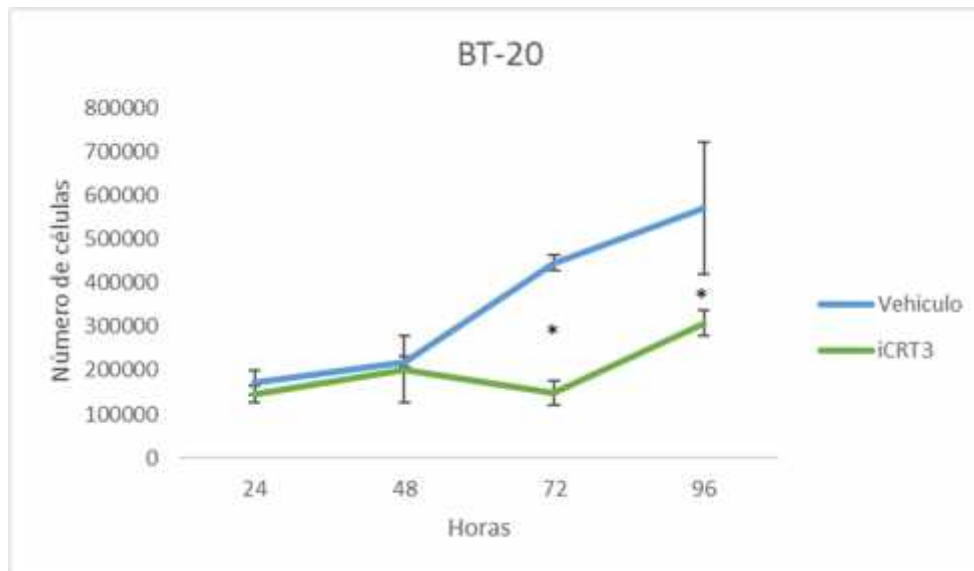
Los resultados obtenidos en este experimento demostraron que las líneas celulares MDA-MB-231 y BT-20 son altamente sensibles a la inhibición farmacológica de  $\beta$ -catenina, ya que su viabilidad disminuye en más del 90%. En contraste, en la línea celular no transformada MCF10A, sólo se observa una disminución entre el 5 y el 8% en presencia del inhibidor [Figura 11].

### 7.3 Efecto de la inhibición farmacológica de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en la proliferación.

Con el propósito de determinar si además de presentar un efecto citotóxico, la inhibición farmacológica de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina tiene un efecto anti proliferativo, las líneas celulares MCF10A, BT-20 y MDA-MB-231 se incubaron en presencia del inhibidor iCRT3 durante 24, 48, 72 y 96 horas, los cuales se hicieron en cámara de Neubauer. Los resultados nos indican que se presentó una disminución en el número de células con iCRT3 en las dos líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y BT-20 y en la línea celular no transformada no se presentaron cambios.

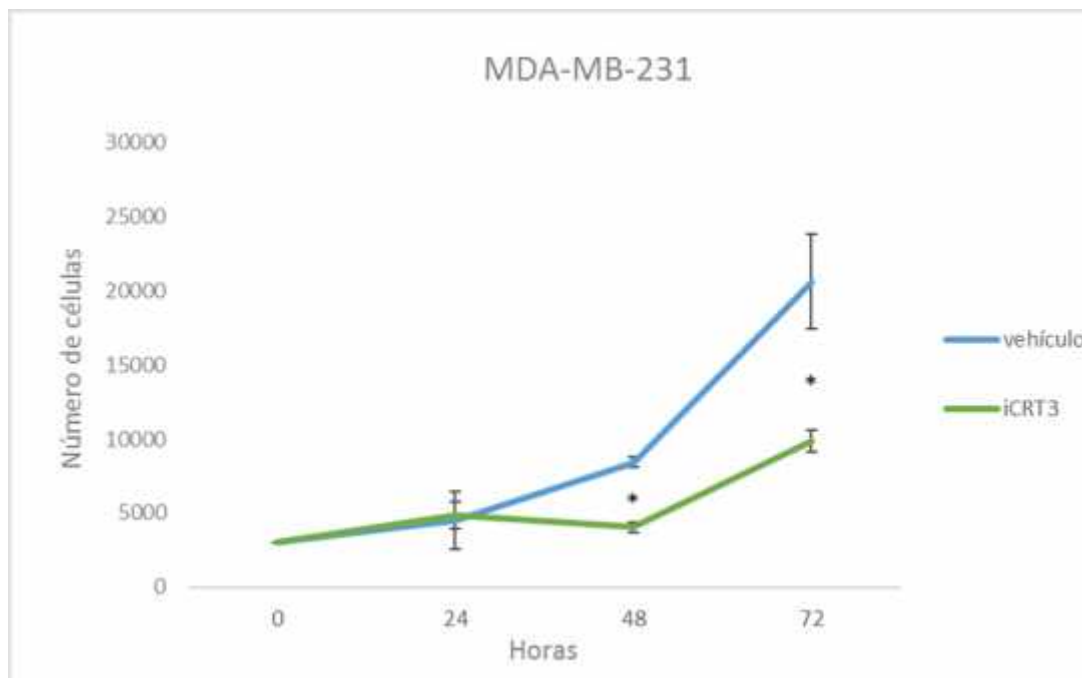


**Figura 12.** Efecto de la inhibición farmacológica de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina en la proliferación. La gráfica muestra el efecto de la inhibición de  $\beta$ -catenina en la proliferación de la línea celular MCF10A incubadas con vehículo (línea azul) o tratadas con iCRT3 (línea verde). Los resultados son expresados como porcentaje  $\pm$  desviación estándar.



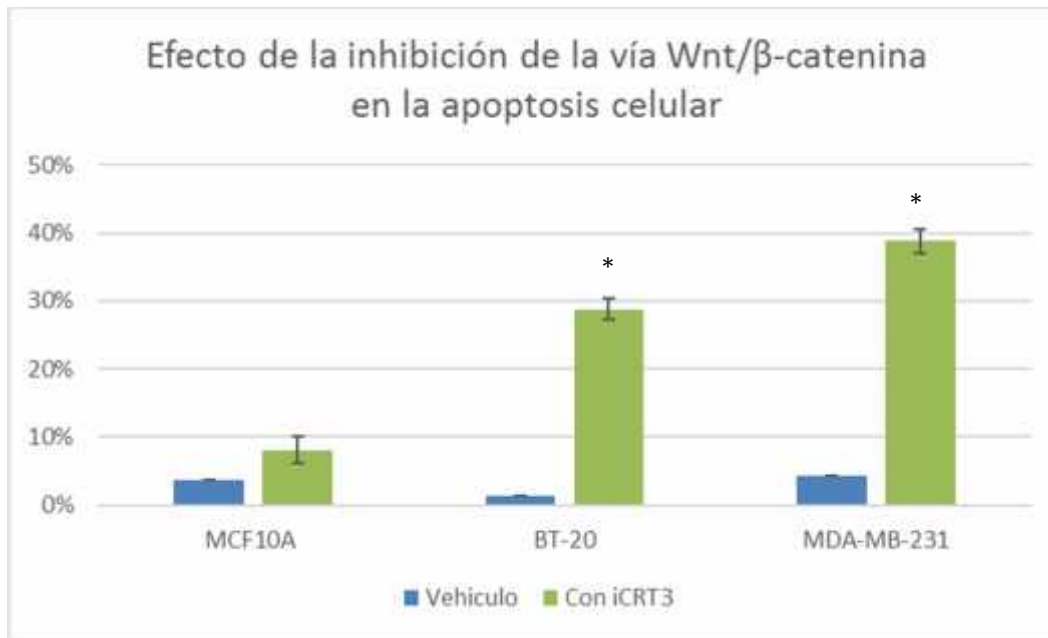
**Figura 13.** Efecto de la inhibición farmacológica de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina en la proliferación. La gráfica muestra el efecto de la inhibición de  $\beta$ -catenina en la proliferación de la línea celular BT-20 incubadas con vehículo (línea azul) o tratadas con iCRT3 (línea verde). Los resultados son expresados como porcentaje  $\pm$  desviación estándar (\* $P$  0.001).





**Figura 14.** Efecto de la inhibición farmacológica de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina en la proliferación. La gráfica muestra el efecto de la inhibición de  $\beta$ -catenina en la proliferación de la línea celular MDA-MB-231 incubadas con vehículo (línea azul) o tratadas con iCRT3 (línea verde). Los resultados son expresados como porcentaje  $\pm$  desviación estándar (\* $P < 0.001$ ).

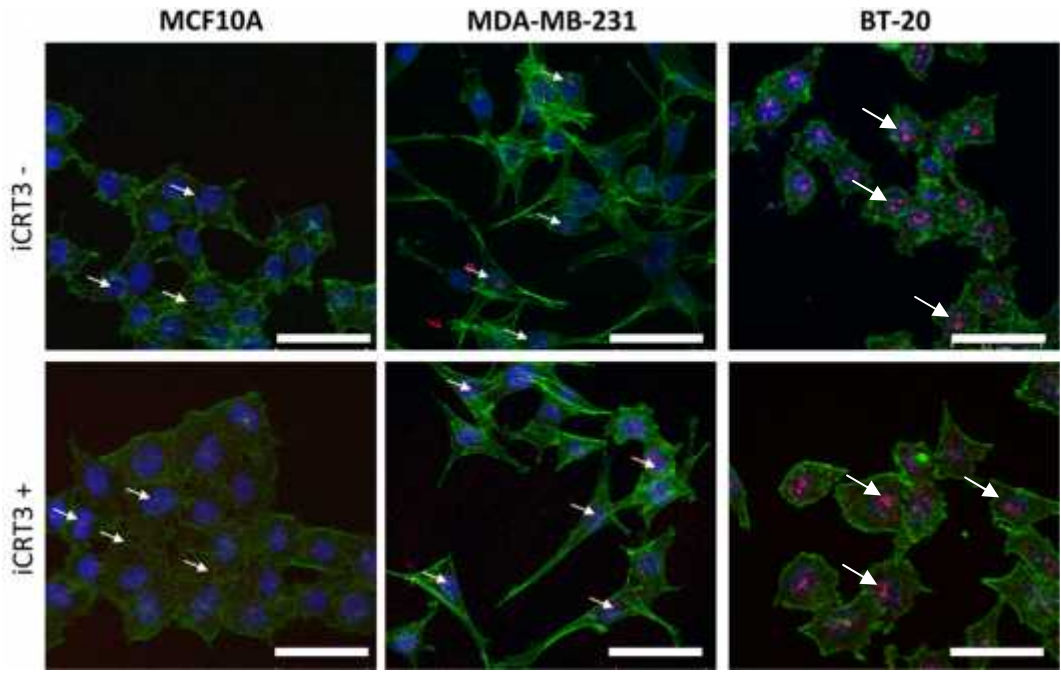
**7.4 Efecto de la inhibición de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina en la apoptosis celular.** Debido a que la vía de Wnt/  $\beta$ -catenina también está involucrada en la resistencia a la apoptosis [35], se evaluó si su inhibición induce la muerte celular programada de las líneas celulares en las cuales se encuentra hiperactiva. Para esto, las líneas celulares se incubaron en presencia de vehículo o del inhibidor iCRT3 durante 48 horas y se determinó el porcentaje de células apoptóticas mediante su tinción con Anexina V y Yoduro de propidio. Los resultados obtenidos, indican que la inhibición farmacológica de la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina induce la apoptosis en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, pero no en las células epiteliales de glándula mamaria no cancerosas [Figura 14].



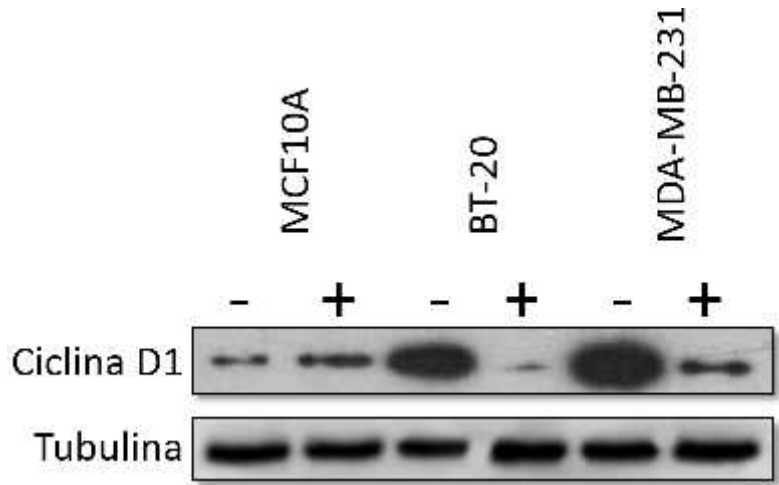
**Figura 15.** Efecto de la inhibición de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina en la apoptosis. Las gráficas muestran el efecto de la inhibición de  $\beta$ -catenina en la inducción de la apoptosis en las líneas celulares MCF10A, MDA-MB-231 y BT-20 incubadas con vehículo (barras azules) o tratadas con iCRT3 (barras verdes). Los resultados son expresados como porcentaje  $\pm$  desviación estándar (\*  $P < 0.001$ ).

**7.5 Efecto de la inhibición farmacológica de  $\beta$ -catenina en su localización celular y en la expresión de sus genes blanco.** Para determinar el efecto de la inhibición de  $\beta$ -catenina en su localización celular y en la expresión de sus genes blanco, las líneas celulares fueron crecidas sobre cubreobjetos e incubadas en presencia de vehículo o del inhibidor iCRT3 durante 24 horas, y la localización celular de  $\beta$ -catenina se observó mediante microscopía confocal. Los resultados obtenidos indican en la línea celular no transformada MCF10A, que un porcentaje reducido de las células son positivas a la tinción nuclear de  $\beta$ -catenina, mientras que, en ambas líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, hay un número mucho mayor de células en las que  $\beta$ -catenina se encuentra presente en el núcleo [Figura 15A]. En ninguna de las líneas celulares se observaron diferencias significativas con respecto a sus controles, en cuanto al número de células con tinción nuclear de  $\beta$ -catenina en presencia del inhibidor, lo cual no resulta inesperado si consideramos que este inhibidor únicamente interfiere con la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina, sin afectar sus otras funciones celulares. Para comprobar que los efectos celulares anteriormente observados son efecto de la inhibición transcripcional de  $\beta$ -catenina, se analizaron los niveles de

expresión de Ciclina D1, la cual es uno de los blancos transcripcionales de  $\beta$ -catenina, en las tres líneas celulares incubadas en presencia de vehículo o de iCRT3. Los resultados obtenidos y mostrados en la figura 15B demuestran que la expresión de Ciclina D1 únicamente se ve disminuida de una manera significativa, en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, con 17 veces menos en la línea celular BT-20 y 4 veces menos en la línea celular MDA-MB-231 pero no en la línea celular no transformada.



A



B

**Figura 16.** Efecto de la inhibición farmacológica de  $\beta$ -catenina en su localización celular y en la expresión de sus genes blanco. En el panel A, se muestra la distribución celular de la forma activa de  $\beta$ -catenina, en donde se observa que esta proteína se encuentra presente en los núcleos de las líneas celulares BT-20 y MDA-MB-231 en presencia y ausencia del inhibidor sin observarse cambios significativos. El panel B muestra el efecto de la inhibición de  $\beta$ -catenina en la expresión de su blanco

transcripcional, Cclina D1, observándose que en ambas líneas celulares de cáncer de mama hay una disminución considerable en su expresión.

## 8. DISCUSIÓN

La vía Wnt/  $\beta$ -catenina se ha asociado en la regulación de diferentes procesos celulares como la proliferación, la sobrevivencia, diferenciación, migración y evasión de la apoptosis [50]. Se ha reportado que los tumores de cáncer de mama del subtipo triple negativo tienen hiperactivación de esta vía [39]; y esto se correlaciona con un peor pronóstico [27]. El marcador clásico de la activación de esta vía es la localización de la proteína  $\beta$ -catenina en el citoplasma y en el núcleo, este proceso ocurre cuando un ligando Wnt se une a su receptor de membrana, inhibiendo la formación del “complejo de destrucción” de  $\beta$ -catenina, constituido por las proteínas APC, Axina, CK1 y GSK3 ; lo que permite la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citoplasma y su posterior translocación al núcleo, donde promueve la transcripción de sus genes blanco [36].

En este trabajo se analizaron los niveles de expresión y activación de algunas de las proteínas de la vía Wnt/  $\beta$ -catenina en líneas celulares de epitelio mamario normal y glándula mamaria transformada, el primer componente observado de la vía fue APC, donde se visualizó que en la línea celular MCF10A y se encuentra en una forma completa, lo cual sugiere que en esta línea celular la vía Wnt está inactiva, ya que se sabe que cuando APC está presente se forma el complejo regulador de  $\beta$ -catenina (APC, Axina, CK1 y GSK3 ) y eso hace que  $\beta$ -catenina se fosforile en su extremo amino terminal y posteriormente se ubiquitine y sea degradado por la vía del proteasoma [51].

En contraste, en la línea celular BT-20 se expresa una forma trunca de APC y en la línea celular MDA-MB-231 APC se encuentra ausente, se tiene reportado que mutaciones en la proteína APC activan la señalización de Wnt a través de la inhibición del complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina [52] y se ha demostrado que la pérdida funcional de APC da como resultado la activación constitutiva de la señalización de Wnt y en la inestabilidad cromosómica en adenocarcinomas colorrectales humanos [53–55].

Con respecto a GSK3 , se observó que expresa bajos niveles en la línea de glándula mamaria no transformada, mientras que en las dos líneas de cáncer de mama triple negativo sus niveles de expresión aumentaban considerablemente; sin embargo se

encuentra fosforilada en el residuo de Serina 9, lo que indica que se encuentra inactiva, y que por lo tanto el complejo de degradación de  $\beta$ -catenina no es funcional, lo cual concuerda con los niveles de  $\beta$ -catenina activa observados en las dos líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.

Dada la importancia de la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en la progresión del cáncer se han desarrollado diversas estrategias farmacológicas para bloquear la actividad de algunos de sus componentes [33], las cuales no han tenido mucho éxito debido a que las proteínas que participan en esta vía también realizan otras funciones, como lo es  $\beta$ -catenina que participa de manera importante en la formación de las uniones intercelulares y junto con E-caderina ayuda al mantenimiento de la polaridad celular [33]. Recientemente, se identificaron inhibidores selectivos de la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina, a los que se les dio el nombre de iCRTs entre estos compuestos, se encuentran iCRT3, iCRT5 e iCRT14; los cuales específicamente bloquean la unión de  $\beta$ -catenina con el complejo TCF/LEF, inhibiendo su actividad transcripcional sin interferir en sus otras funciones biológicas [45].

Debido a que la vía de Wnt/ $\beta$ -catenina regula procesos celulares como la proliferación y sobrevivencia celular, y también regula la expresión de moléculas involucradas en la evasión de la apoptosis, se evaluó el efecto de la inhibición farmacológica de  $\beta$ -catenina en estos procesos celulares. Cuando se analizó el efecto de la inhibición farmacológica de  $\beta$ -catenina en la viabilidad y proliferación, se observó que estos procesos celulares se ven considerablemente afectados en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, mientras que no se observó un efecto significativo en la línea celular de epitelio de glándula mamaria no transformado. Las posibles explicaciones son que la inhibición farmacológica de  $\beta$ -catenina afecta la expresión de genes involucrados en la sobrevivencia y proliferación, o que tenga un efecto citotóxico. Por este motivo, se decidió analizar el efecto de la inhibición farmacológica de  $\beta$ -catenina en la inducción de apoptosis en las distintas líneas celulares empleadas. Estos experimentos demostraron que el efecto del inhibidor de  $\beta$ -catenina es selectivo hacia las células cancerosas en las que la vía se encuentra hiperactiva, ya que no se observa una inducción de la apoptosis en la línea celular no transformada. En conjunto, nuestros resultados sugieren fuertemente que el efecto que estamos observando se debe a la inhibición de la expresión de genes anti-apoptóticos y de sobrevivencia en las dos líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.

Con el propósito de corroborar esta hipótesis, se determinó si la inhibición farmacológica de  $\beta$ -catenina afecta su localización y la expresión de Ciclina D1, uno de sus blancos transcripcionales involucrado en la supervivencia y proliferación al regular la progresión del ciclo celular. El análisis de la distribución celular de  $\beta$ -catenina en presencia del inhibidor farmacológico mediante microscopía confocal, muestra que no hay diferencias en la localización celular de  $\beta$ -catenina en presencia o ausencia del fármaco, ya que el iCRT3 solo bloquea la unión de  $\beta$ -catenina con LEF-1/TCF para inhibir la transcripción de sus genes blanco, por lo que al analizar la expresión de Ciclina D1 (que es uno de los genes activados por esta vía) mediante Western Blot, observamos que sus niveles de expresión disminuyen drásticamente en presencia del inhibidor únicamente en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo. Esta serie de resultados, aunque son muy preliminares, nos permiten concluir que la inhibición farmacológica de  $\beta$ -catenina podría ser una buena alternativa terapéutica para pacientes de cáncer de mama en los que esta vía de señalización se encuentra hiperactiva. En un futuro, se requiere analizar la eficacia de este inhibidor en modelos animales, y determinar si la inhibición combinada de la vía de Wnt/  $\beta$ -catenina y de otras vías de señalización importantes para la supervivencia y crecimiento tumoral es más efectiva que la inhibición individual de una ruta de señalización.

## 9. CONCLUSIONES

- 1) La vía de Wnt/  $\beta$ -catenina presenta altos niveles de activación en las líneas celulares BT-20 y MDA-MB-231 de cáncer de mama triple negativo.
- 2) La inhibición farmacológica de  $\beta$ -catenina afecta negativamente la supervivencia y proliferación de las células cancerosas, e induce la apoptosis exclusivamente en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, pero no en la línea celular de epitelio de glándula mamaria no transformado.
- 3) La inhibición farmacológica de la vía de señalización de Wnt/  $\beta$ -catenina disminuye la expresión de sus genes blanco, como Ciclina D1, en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.

## 10. REFERENCIAS

- [1] cancer-facts-and-figures-2017.pdf, (n.d.).  
<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf> (accessed April 30, 2017).
- [2] D. Polsky, C. Cordon-Cardo, Oncogenes in melanoma, *Oncogene*. 22 (2003) 3087–3091. doi:10.1038/sj.onc.1206449.
- [3] introduction-to-cancer-biology.pdf, (n.d.).  
<http://csbl.bmb.uga.edu/mirrors/JLU/DragonStar2016/download/introduction-to-cancer-biology.pdf> (accessed April 30, 2017).
- [4] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of Cancer: The Next Generation, *Cell*. 144 (2011) 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [5] OMS | 10 datos sobre el cáncer, WHO. (n.d.).  
<http://www.who.int/features/factfiles/cancer/es/> (accessed April 30, 2017).
- [6] IARC Publicaciones Sitio Web - Informe Mundial del Cáncer 2014, (n.d.).  
<http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014> (accessed April 30, 2017).
- [7] L.A. Torre, F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal, Global cancer statistics, 2012, *CA. Cancer J. Clin.* 65 (2015) 87–108. doi:10.3322/caac.21262.
- [8] OMS | Cáncer, WHO. (n.d.). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (accessed April 30, 2017).
- [9] R.L. Siegel, K.D. Miller, A. Jemal, Cancer statistics, 2017, *CA. Cancer J. Clin.* 67 (2017) 7–30. doi:10.3322/caac.21387.
- [10] Globocan 2012 - Inicio, (n.d.). <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx> (accessed May 2, 2017).
- [11] E.T.H. Fontham, Cancer Epidemiology and Prevention. Third Edition Edited by David Schottenfeld and Joseph F. Fraumeni, Jr., *Am. J. Epidemiol.* 168 (2008) 469–469. doi:10.1093/aje/kwn197.
- [12] R.T. Chlebowski, J.E. Manson, G.L. Anderson, J.A. Cauley, A.K. Aragaki, M.L. Stefanick, D.S. Lane, K.C. Johnson, J. Wactawski-Wende, C. Chen, L. Qi, S. Yasmeen, P.A. Newcomb, R.L. Prentice, Estrogen Plus Progestin and Breast Cancer Incidence and Mortality in the Women’s Health Initiative Observational Study, *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 105 (2013) 526–535. doi:10.1093/jnci/djt043.
- [13] N. Justo, N. Wilking, B. Jönsson, S. Luciani, E. Cazap, A Review of Breast Cancer Care and Outcomes in Latin America, *The Oncologist*. 18 (2013) 248–256. doi:10.1634/theoncologist.2012-0373.
- [14] Cáncer de mama en México ¿enfermedad de mujeres jóvenes?, (n.d.).  
[http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id\\_articulo=4476&id\\_seccion=407&id\\_ejemplar=504&id\\_revista=40](http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=4476&id_seccion=407&id_ejemplar=504&id_revista=40) (accessed April 30, 2017).
- [15] F.M. Knaul, H. Arreola-Ornelas, E. Velázquez, J. Dorantes, Ó. Méndez, L. Ávila-Burgos, El costo de la atención médica del cáncer mamario: el caso del Instituto Mexicano del Seguro Social, *Salud Pública México*. 51 (2009) s286–s295.
- [16] P.R. Ríos, A.G. Rivera, F.S. Cervantes, P.M. Martínez, Tendencia de la mortalidad por cáncer en México: 1990-2012, *Evid. Médica E Investig. En Salud*. 8 (2015) 5–15.
- [17] C.M. Perou, T. Sørli, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, Ø. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lønning, A.-L. Børresen-Dale, P.O. Brown, D. Botstein,



- Molecular portraits of human breast tumours, *Nature*. 406 (2000) 747–752. doi:10.1038/35021093.
- [18] C. Sotiriou, S.-Y. Neo, L.M. McShane, E.L. Korn, P.M. Long, A. Jazaeri, P. Martiat, S.B. Fox, A.L. Harris, E.T. Liu, Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 10393–10398. doi:10.1073/pnas.1732912100.
- [19] T. Sørlie, R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J.S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C.M. Perou, P.E. Lønning, P.O. Brown, A.-L. Børresen-Dale, D. Botstein, Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 8418–8423. doi:10.1073/pnas.0932692100.
- [20] Comprehensive molecular portraits of human breast tumors, *Nature*. 490 (2012) 61–70. doi:10.1038/nature11412.
- [21] L.A. Carey, C.M. Perou, C.A. Livasy, L.G. Dressler, D. Cowan, K. Conway, G. Karaca, M.A. Troester, C.K. Tse, S. Edmiston, S.L. Deming, J. Geradts, M.C.U. Cheang, T.O. Nielsen, P.G. Moorman, H.S. Earp, R.C. Millikan, Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study, *JAMA*. 295 (2006) 2492–2502. doi:10.1001/jama.295.21.2492.
- [22] O. Yersal, S. Barutca, Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications, *World J. Clin. Oncol.* 5 (2014) 412–424. doi:10.5306/wjco.v5.i3.412.
- [23] C.J. Creighton, The molecular profile of luminal B breast cancer, *Biol. Targets Ther.* 6 (2012) 289–297. doi:10.2147/BTT.S29923.
- [24] 66276115.pdf, (n.d.). <http://www.redalyc.org/pdf/662/66276115.pdf> (accessed May 2, 2017).
- [25] O. Gluz, C. Liedtke, N. Gottschalk, L. Pusztai, U. Nitz, N. Harbeck, Triple-negative breast cancer—current status and future directions, *Ann. Oncol.* 20 (2009) 1913–1927. doi:10.1093/annonc/mdp492.
- [26] K.R. Bauer, M. Brown, R.D. Cress, C.A. Parise, V. Caggiano, Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype, *Cancer*. 109 (2007) 1721–1728. doi:10.1002/cncr.22618.
- [27] C.K. Anders, L.A. Carey, Biology, Metastatic Patterns, and Treatment of Patients with Triple-Negative Breast Cancer, *Clin. Breast Cancer*. 9 (2009) S73–S81. doi:10.3816/CBC.2009.s.008.
- [28] B. Bilir, O. Kucuk, C.S. Moreno, Wnt signaling blockage inhibits cell proliferation and migration, and induces apoptosis in triple-negative breast cancer cells, *J. Transl. Med.* 11 (2013) 280. doi:10.1186/1479-5876-11-280.
- [29] K.J. Chavez, S.V. Garimella, S. Lipkowitz, Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer, *Breast Dis.* 32 (2010) 35–48. doi:10.3233/BD-2010-0307.
- [30] T.M. Paine, H.D. Soule, R.J. Pauley, P.J. Dawson, Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells, *Int. J. Cancer*. 50 (1992) 463–473.
- [31] L.E. Arias-Romero, O. Villamar-Cruz, M. Huang, K.P. Hoefflich, J. Chernoff, Pak1 kinase links ErbB2 to  $\beta$ -catenin in transformation of breast epithelial cells, *Cancer Res.* 73 (2013) 3671–3682. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4453.
- [32] A.H. Nwabo Kamdje, P.F. Seke Etet, L. Vecchio, J.M. Muller, M. Krampera, K.E. Lukong, Signaling pathways in breast cancer: Therapeutic targeting of the

- microenvironment, *Cell. Signal.* 26 (2014) 2843–2856. doi:10.1016/j.cellsig.2014.07.034.
- [33] P. Le, J.D. McDermott, A. Jimeno, Targeting the Wnt pathway in human cancers: therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28, *Pharmacol. Ther.* 0 (2015) 1–11. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.08.005.
- [34] P. Bhanot, M. Brink, C.H. Samos, J.-C. Hsieh, Y. Wang, J.P. Macke, D. Andrew, J. Nathans, R. Nusse, A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor, *Nature.* 382 (1996) 225–230. doi:10.1038/382225a0.
- [35] K. Tamai, M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J.-P. Saint-Jeannet, X. He, LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction, *Nature.* 407 (2000) 530–535.
- [36] K. Willert, K.A. Jones, Wnt signaling: is the party in the nucleus?, *Genes Dev.* 20 (2006) 1394–1404. doi:10.1101/gad.1424006.
- [37] D. Kimelman, W. Xu,  $\beta$ -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective, *Oncogene.* 25 (2006) 7482–7491. doi:10.1038/sj.onc.1210055.
- [38] G. Wu, G. Xu, B.A. Schulman, P.D. Jeffrey, J.W. Harper, N.P. Pavletich, Structure of a  $\beta$ -TrCP1-Skp1- $\beta$ -Catenin Complex, *Mol. Cell.* 11 (2003) 1445–1456. doi:10.1016/S1097-2765(03)00234-X.
- [39] A.I. Khramtsov, G.F. Khramtsova, M. Tretiakova, D. Huo, O.I. Olopade, K.H. Goss, Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway Activation Is Enriched in Basal-Like Breast Cancers and Predicts Poor Outcome, *Am. J. Pathol.* 176 (2010) 2911–2920. doi:10.2353/ajpath.2010.091125.
- [40] L.R. Howe, A.M.C. Brown, Wnt signaling and breast cancer, *Cancer Biol. Ther.* 3 (2004) 36–41.
- [41] F.C. Geyer, M. Lacroix-Triki, K. Savage, M. Arnedos, M.B. Lambros, A. MacKay, R. Natrajan, J.S. Reis-Filho,  $\beta$ -Catenin pathway activation in breast cancer is associated with triple-negative phenotype but not with CTNNB1 mutation, *Mod. Pathol.* 24 (2011) 209–231. doi:10.1038/modpathol.2010.205.
- [42] A. Blagodatski, D. Poteryaev, V.L. Katanaev, Targeting the Wnt pathways for therapies, *Mol. Cell. Ther.* 2 (2014) 28. doi:10.1186/2052-8426-2-28.
- [43] B.T. MacDonald, K. Tamai, X. He, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases, *Dev. Cell.* 17 (2009) 9–26. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016.
- [44] E.G. Gugel, Activación constitutiva de la vía de señalización hedgehog en linfomas linfoblásticos T por la sobre-expresión del gen *smoothed*, <http://purl.org/dc/dcmitype/Text>, Universidad Autónoma de Madrid, 2011. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=29930> (accessed April 30, 2017).
- [45] F.C. Gonsalves, K. Klein, B.B. Carson, S. Katz, L.A. Ekas, S. Evans, R. Nagourney, T. Cardozo, A.M.C. Brown, R. DasGupta, An RNAi-based chemical genetic screen identifies three small-molecule inhibitors of the Wnt/wingless signaling pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 5954–5963. doi:10.1073/pnas.1017496108.
- [46] S. Wei, L.-F. Lin, C.-C. Yang, Y.-C. Wang, G.-D. Chang, H. Chen, C.-S. Chen, Thiazolidinediones Modulate the Expression of  $\beta$ -Catenin and Other Cell-Cycle Regulatory Proteins by Targeting the F-Box Proteins of Skp1-Cul1-F-box Protein E3 Ubiquitin Ligase Independently of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ , *Mol. Pharmacol.* 72 (2007) 725–733. doi:10.1124/mol.107.035287.

- [47] T.D. King, M.J. Suto, Y. Li, The wnt/  $\beta$ -catenin signaling pathway: A potential therapeutic target in the treatment of triple negative breast cancer, *J. Cell. Biochem.* 113 (2012) 13–18. doi:10.1002/jcb.23350.
- [48] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (1979) 4350–4354.
- [49] P. Polakis, Wnt Signaling in Cancer, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4 (2012). doi:10.1101/cshperspect.a008052.
- [50] A. Herbst, V. Jurinovic, S. Krebs, S.E. Thieme, H. Blum, B. Göke, F.T. Kolligs, Comprehensive analysis of  $\beta$ -catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/  $\beta$ -catenin signaling, *BMC Genomics.* 15 (2014) 74. doi:10.1186/1471-2164-15-74.
- [51] H. Aberle, A. Bauer, J. Stappert, A. Kispert, R. Kemler,  $\beta$ -catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway., *EMBO J.* 16 (1997) 3797–3804. doi:10.1093/emboj/16.13.3797.
- [52] V. Korinek, N. Barker, P.J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, H. Clevers, Constitutive Transcriptional Activation by a  $\beta$ -Catenin-Tcf Complex in APC<sup>-/-</sup> Colon Carcinoma, *Science.* 275 (1997) 1784–1787. doi:10.1126/science.275.5307.1784.
- [53] Y. Mimori-Kiyosue, N. Shiina, S. Tsukita, The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules, *Curr. Biol.* 10 (2000) 865–868. doi:10.1016/S0960-9822(00)00600-X.
- [54] S.M. Powell, N. Zilz, Y. Beazer-Barclay, T.M. Bryan, S.R. Hamilton, S.N. Thibodeau, B. Vogelstein, K.W. Kinzler, APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis, *Nature.* 359 (1992) 235–237. doi:10.1038/359235a0.
- [55] S. Munemitsu, I. Albert, B. Souza, B. Rubinfeld, P. Polakis, Regulation of intracellular  $\beta$ -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 3046–3050.