



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Evaluación de la actividad transcripcional de la vía de  
señalización WNT- $\beta$ -catenina en líneas celulares de  
cáncer colorrectal**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Biólogo**

**P R E S E N T A :**

**Samuel Trujano Camacho**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Carlos Pérez Plasencia**

**Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2018**



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.

**Este proyecto fue elaborado en el Laboratorio de Genómica Integral del Cáncer de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM bajo la dirección del Dr. Carlos Pérez Plasencia.**

## **Agradecimientos**

A mis padres Fabiola y Edgar por haberme apoyado en todo el camino, en cada gasto y en cada decisión que tome hasta el día de hoy, por no darse por vencidos en el proceso de mi educación y espero esto sea un poco de recompensa por lo que han hecho por mí.

A mis abuelitos (mis Bios) Rosa y José, por todo su apoyo durante este camino, les agradezco que nunca dejaron de creer en mí y siempre que lo necesite estuvieron ahí para mí, ya sea con un poco más para mis practicas o simplemente yendo por mí a cualquier lado.

A mis hermanos los OM Miguel, Juan, Ángel, Diego y Omar, gracias por todo su apoyo y por jamás dejar de creer en mí incluso cuando he fallado, por seguir intentando cumplir junto conmigo otro sueño a parte de estudiar y dar tanto esfuerzo en ello.

A Diana, por estar siempre a mi lado en todo este camino, en los días buenos y los días malos, en mi mejor y peor faceta nunca has dejado de estar conmigo y por eso sé que eres la persona para mí, te amo.

A mis compañeros de la carrera que me ayudaron bastante a llegar hasta aquí, Charly, Edher, Gaby, Tamara, Jorge, Xochitl etc.

A mis compañeros del laboratorio L11, por haberme apoyado en cada experimento saliera bien o no ahí estuvieron conmigo, a Luis, David, Izamary, Carlos y Pablo.

A Mical, por haberme dado su amistad y haber escuchado en todos esos días en que ya no sabíamos si esto era realmente lo nuestro o no pero siempre seguimos con todo nuestro esfuerzo.

A Misael, por todos los momentos en que pudimos platicar de lo que fuera e incluso siempre que se podía me enseñabas algo nuevo no tenías problema en decírmelo y cada que un experimento resultada bien te alegrabas por mí, gracias por tu amistad.

A Jonathan, por estar ahí en todo este trayecto por ayudarme también cada que podías o simplemente resolverme dudas cuando tu tenias la respuesta, gracias amigo.

A dos de mis más grandes amigos y maestros en el laboratorio, Luisa y Rebe, gracias por todo lo que han hecho por mí, por todo lo que me enseñaron sin preocuparse en si eso les quitaría su tiempo o no y además por esforzarse para que en ese camino fueran mis amigos, les agradezco mucho y espero poder regresarles al menos un poco algún día.

A Jossimar, te agradezco todo lo que has hecho por mí, me enseñaste todo cuanto pudiste y siempre buscaste lo mejor para mí y para el laboratorio, te has convertido en una de las personas que más admiro y en quien más confié, gracias por ser también uno de mis mejores amigos en el laboratorio y por cada vez que necesite un consejo de lo que fuera tu estuviste ahí, creo que prometí mas párrafos pero al menos este es sincero, gracias por todo y espero también poder regresarte un poco algún día.

Al Doctor Urrutia por toda la ayuda que me ha dado, lo admiro y espero llegar a ser mucho de lo que usted es hoy en día, tanto personal como profesionalmente.

A la Maestra Verito por todo su apoyo, ya sea con algún experimento o material siempre me saco de problemas y me enseñó mucho de lo que es un trabajo ordenado.

A todos mis compañeros del grupo de trabajo que me han apoyado ya sea que los conozca mucho o poco, a la Doctora Gaby, el Doctor Jorge, Oliver, Eli, Emmanuel, Luz y Sam.

Al Doctor Carlos y a la Doctora Alma por las oportunidades de formar parte de este grupo de trabajo, daré mi esfuerzo para cumplir con las expectativas.

# Índice

1. Resumen .....	9
2. Introducción .....	11
2.1 Cáncer .....	11
2.2 Cáncer colorrectal (CCR) .....	12
2.3 Factores de Riesgo del CCR.....	13
2.3.1 Factores genéticos del CCR .....	14
2.4 Vías de señalización en CCR.....	15
2.5 Aspectos clínicos y fisiológicos de la vía WNT- $\beta$ -catenina.....	16
2.6 Descripción de la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina .....	17
2.6.1 $\beta$ -catenina .....	19
2.6.2 Pygopus 2.....	20
2.6.3 La vía WNT- $\beta$ -catenina como blanco terapéutico.....	23
3. Hipótesis .....	25
4. Objetivo General.....	25
4.1 Objetivos Particulares.....	25
5. Material y Método .....	26
5.1 Cultivo celular .....	26
5.2 Transfección.....	26
5.3 Extracción de RNA .....	27
5.4 qPCR .....	28
5.5 Ensayo de Luciferasa con el vector de TOP FLASH.....	30
5.6 Análisis de datos del TCGA.....	30
5.7 Análisis estadísticos .....	31
6. Resultados.....	32
6.1 Actividad de la vía WNT- $\beta$ -catenina en las líneas celulares de CCR .....	32
6.2 Expresión de los activadores transcripcionales de la vía WNT- $\beta$ -catenina en datos obtenidos del TCGA y líneas celulares de CCR.....	33
6.3 Expresión de los blancos transcripcionales de la vía WNT- $\beta$ -catenina en datos obtenidos del TCGA y líneas celulares de CCR.....	35
6.4 Inhibición de la actividad de la vía WNT- $\beta$ -catenina mediante el PNU-74654 en la línea celular de CCR HCT116.....	38

<b>6.5 Expresión de los activadores transcripcionales al inhibir la vía WNT-<math>\beta</math>-catenina en la línea celular de CCR HCT116, mediante el PNU-74654 .....</b>	<b>39</b>
<b>6.6 Expresión de los blancos transcripcionales al inhibir la vía WNT-<math>\beta</math>-catenina en la línea celular de CCR HCT116, mediante el PNU-74654.....</b>	<b>40</b>
<b>7. Discusión .....</b>	<b>42</b>
<b>8. Conclusiones .....</b>	<b>46</b>
<b>9. Perspectivas.....</b>	<b>47</b>
<b>10. Referencias.....</b>	<b>48</b>

## Lista de Figuras

Figura 1. Modelo de carcinogénesis propuesto por Vogelstein y modificado por Terzic...	12
Figura 2. Tasa de mortalidad e incidencia de varios de los tipos de cáncer en México (Tomada de GLOBOCAL 2018).....	14
Figura 3. Vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina en su forma activa (panel izquierdo) y su forma inactiva (panel derecho).....	19
Figura 4. Blancos de la vía WNT- $\beta$ -catenina y su participación en los diversos hallmarks del cáncer.....	23
Figura 5. Actividad de TOP/FOP en líneas celulares de CCR comparadas con la línea control de colon no tumoral CRL1790. La actividad de la vía WNT- $\beta$ -catenina se encuentra hiperactivada en ambas líneas tumorales, sin embargo, solo la línea SW620 mostro diferencias significativas ( $P < 0.001$ ).....	31
Figura 6. Niveles de expresión mRNA de PYGO2 y $\beta$ -catenina, en datos obtenidos del TCGA (A) y líneas celulares de CCR (B). Al comparar los niveles de expresión de las muestras tumorales con el grupo control, ninguno de los genes mostro diferencias significativas ( $P < 0.001$ ).....	33
Figura 7. Niveles de expresión de mRNA de blancos transcripcionales de la vía WNT- $\beta$ -catenina, en datos obtenidos del TCGA, donde se observan diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de las muestras tumorales con el grupo control ( $P < 0.001$ ).....	35
Figura 8. Niveles de expresión de mRNA de blancos transcripcionales de la vía WNT- $\beta$ -catenina, en líneas celulares de CCR. No se observan diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de las muestras tumorales con el grupo control salvo por la disminución de EphB4 en la línea SW620 ( $P < 0.05$ ).....	36
Figura 9. Inhibición de la vía WNT- $\beta$ -catenina, en la línea celular de CCR HCT116 por medio de la molécula PNU-74654. Se probaron las concentraciones de 10, 50 y 100 $\mu\text{M}$ a	



las 24 horas, solo la concentración de 100  $\mu$ M mostro diferencias significativas con respecto al control (P <0.001).....37

Figura 10. Niveles de expresión de mRNA de los activadores transcripcionales al inhibir la vía WNT- $\beta$ -catenina, en la línea celular de CCR HCT116. No se observan diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de las muestras tumorales con el grupo control (P <0.05).....38

Figura 11. Niveles de expresión de mRNA de los blancos transcripcionales al inhibir la vía WNT- $\beta$ -catenina, en la línea celular de CCR HCT116. No se observan diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de las muestras tumorales con el grupo control (P <0.05).....39

## **Lista de Tablas**

Tabla 1. Condiciones de la reacción de Retro transcripción mediante High-Capacity.....28

Tabla 2. Diseño de oligos de genes a evaluar para la vía WNT- $\beta$ -catenina.....28

Tabla 3. Condiciones oligos de genes a evaluar para la vía WNT- $\beta$ -catenina en PCR punto final.....29

Tabla 4. Condiciones oligos de genes a evaluar para la vía WNT- $\beta$ -catenina en qPCR..29

## 1. Resumen

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades en las que las células a través de la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas adquieren diversas características o “hallmarks”, entre los que se encuentran se encuentran la proliferación celular desregulada, la evasión de la apoptosis, evasión de supresores de crecimiento celular, replicación ilimitada del DNA por mencionar algunos.

El cáncer colorrectal (CCR) es el resultado de la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos que transforman células epiteliales glandulares del colon y el recto, en un adenocarcinoma invasivo.

Existen diversos factores que propician el desarrollo del CCR y tanto los factores ambientales como los genéticos, juegan un rol importante en la etiología del CCR, los cuales, pueden conllevar a la desregulación de vías de señalización, como es el caso de la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina.

La vía WNT- $\beta$ -catenina regula la homeostasis del tejido de las células troncales (stem cells) en los compartimientos celulares del colon (criptas del colon), por lo cual, mutaciones en genes como APC, PYGO2 o CTNNB1 ( $\beta$ -catenina), conllevan al inicio de la carcinogénesis del CCR.

En el presente trabajo, se evaluó la actividad de la vía WNT- $\beta$ -catenina por medio del ensayo de Luciferasa con el vector de TOP/FLASH, así como la expresión a nivel de RNA mensajero (mRNA) por medio de qPCR, de algunos genes blanco y de los activadores transcripcionales  $\beta$ -catenina y PYGO2, en un modelo de líneas celulares de CCR y en datos tomados del TCGA (Por sus siglas en inglés The Cancer Genome Atlas).

Se demostró que la vía WNT- $\beta$ -catenina se encuentra sobre activada en líneas celulares de CCR, HCT116 y SW620, siendo esta última en donde se encontraron diferencias significativas ANOVA ( $P < 0.001$ ). Los activadores transcripcionales, no mostraron diferencias significativas ni en los datos obtenidos de la qPCR, ni en los del TCGA. Por el contrario, los blancos transcripcionales mostraron diferencias

significativas en los datos de tumor analizados del TCGA ANOVA ( $P < 0.001$ ) y una tendencia al aumento (salvo por EphB4) al evaluarlos por qPCR. Finalmente, se evaluó la actividad de la vía al inhibirla, así como los activadores transcripcionales, y sus genes blanco, sin encontrarse diferencias significativas t de Student ( $P < 0.05$ ).

## **2. Introducción**

### **2.1 Cáncer**

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades en las cuales, las células adquieren diversas alteraciones genéticas y epigenéticas (Morales-Perez, Claudio L. Noviello & Hibbs, 2015; Wodarz & Zauber, 2015). En 2011 Hanahan y Weinberg señalan alrededor de diez “hallmarks”, entre ellos se encuentran la proliferación celular desregulada, la evasión de la apoptosis, evasión de supresores de crecimiento celular, replicación ilimitada del DNA, inducción de angiogénesis, inestabilidad genómica, así como la invasión y metástasis por mencionar algunos. Estas características aparecen gradualmente y pueden ser compartidas por varios tipos de células tumorales o bien, ser característicos de algún tipo de cáncer (Hahn & Weinberg, 2002).

Para el 2011, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimaba más muertes por cáncer que por enfermedades cardiovasculares y para el 2012, 14.1 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes a nivel mundial. Existen alrededor de 27 tipos de cáncer compartidos entre hombres y mujeres, siendo el de pulmón el primero en incidencia, seguido por el de mama, el cáncer colorrectal (CCR), el de próstata, el de estómago y el de hígado, siendo estos 6 los que representan el 55% de la incidencia de cáncer a nivel mundial (Ferlay et al., 2015)

## 2.2 Cáncer colorrectal (CCR)

El cáncer colorrectal por su parte es el resultado de la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos que transforman células epiteliales glandulares del colon y el recto en un adenocarcinoma invasivo y que posteriormente, dan paso a la aparición de los otros hallmarks en las zonas mencionadas. Las etapas que dan paso a la aparición de adenocarcinomas han caracterizado en un modelo, en términos la expresión y sub expresión de genes (Armaghany, Wilson, Chu, & Mills, 2012) (Figura 1). Dicho modelo, permitió la descripción de diversos procesos moleculares que favorecen la carcinogénesis del CCR, describiéndose desde la aparición de focos de criptas aberrantes y continuando con el desarrollo de pólipos, adenomas y carcinomas (Frank, 2007; Terzić, Grivennikov, Karin, & Karin, 2010).

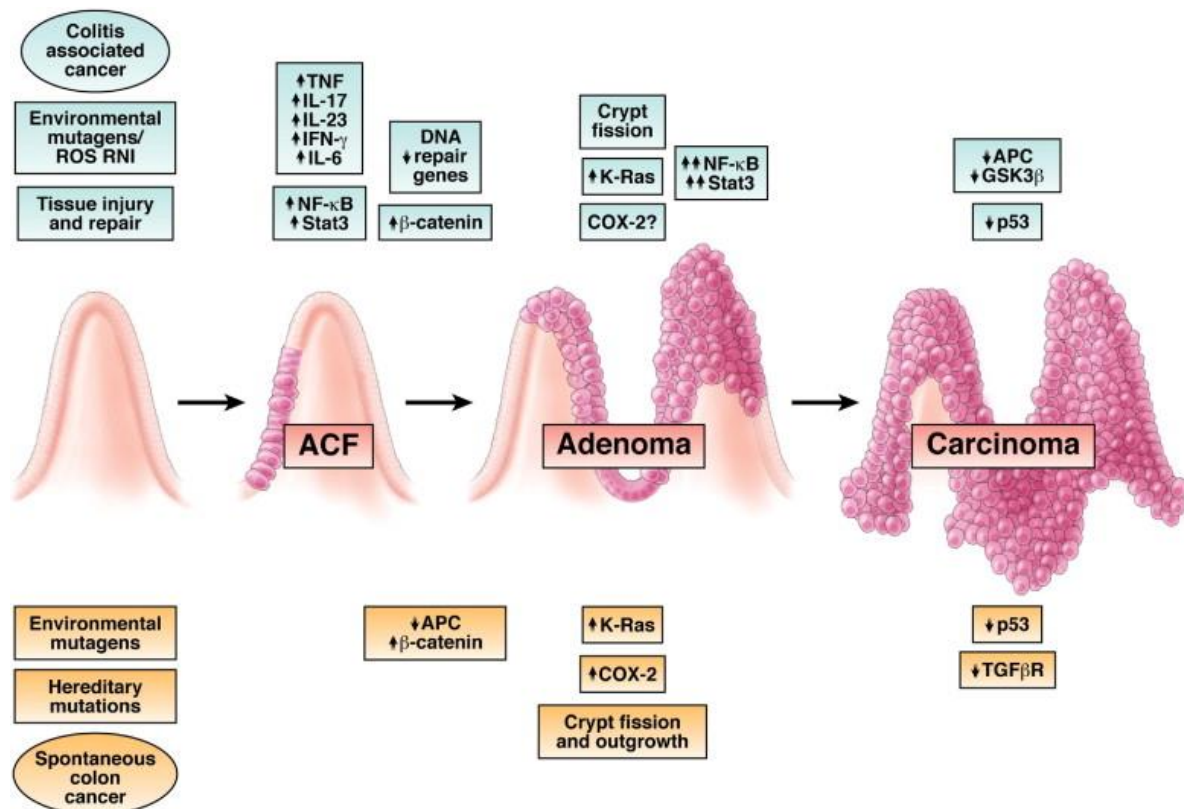
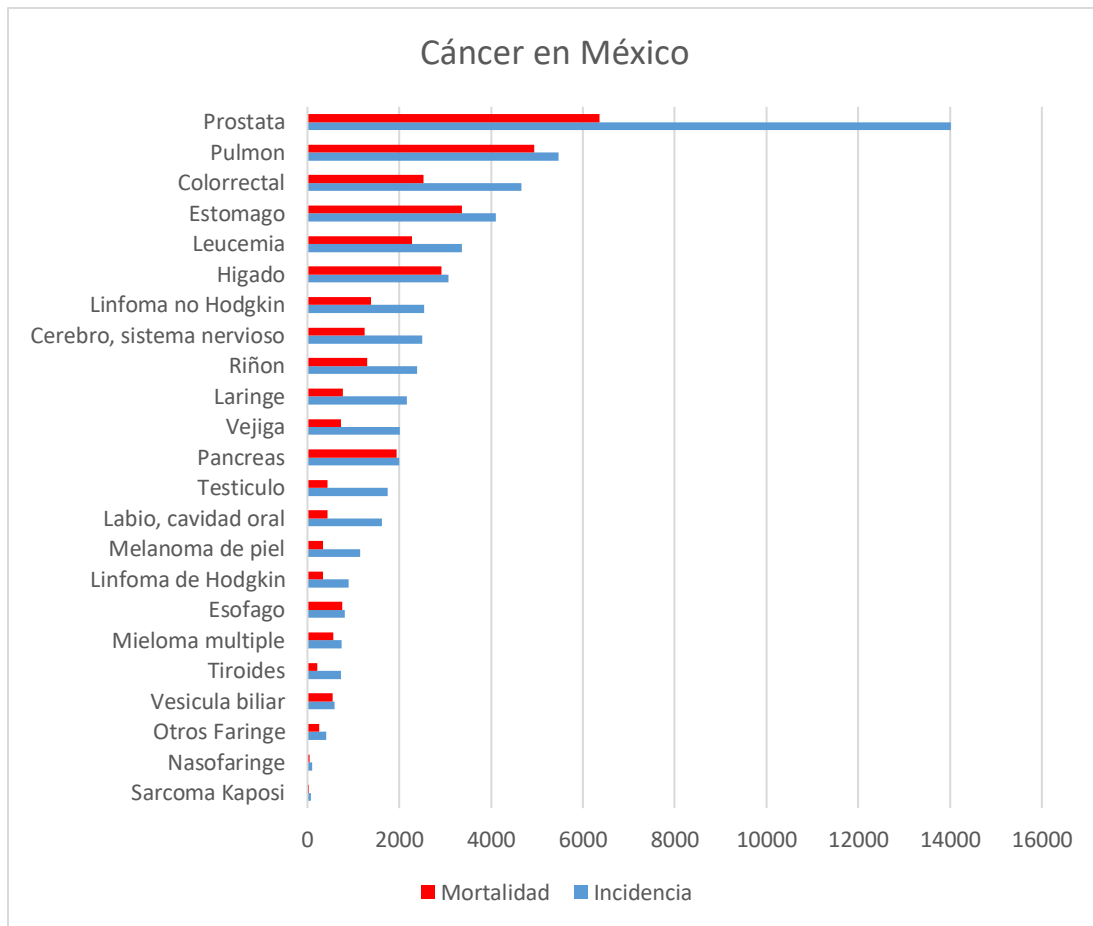


Figura 1. Modelo de carcinogénesis propuesto por Vogelstein y modificado por Terzic.

A nivel mundial el CCR es uno de los tipos de cáncer más comunes, ocupando el tercer y segundo lugar a nivel mundial en hombres y mujeres respectivamente, además de ser el cuarto lugar en cuanto a mortalidad en el mundo (El Zoghbi & Cummings, 2016). Aunado a esto, se ha registrado que la mortalidad sigue aumentando por una detección tardía que conlleva al desarrollo de metástasis del 40 al 50% de los pacientes (Kuipers, Rösch, & Bretthauer, 2013; Szaryńska, Olejniczak, Kobiela, Spsychalski, & Kmiec, 2017). En países como México la incidencia y mortalidad no es distinta (Figura 2), alrededor del 10% de la mortalidad es debido al cáncer y de este el 5.4% es por CCR (Acuña Tovar M, 2013).

### **2.3 Factores de Riesgo del CCR**

Existen diversos factores que propician el desarrollo del CCR y tanto los factores ambientales como los genéticos, juegan un rol importante en la etiología del CCR. Entre los factores ambientales se engloban la dieta, estilo de vida, alcoholismo, tabaquismo por mencionar algunos (Acuña Tovar M, 2013). Estos tienen efecto en el sistema inmune y en procesos de inflamación que favorece la aparición de adenomas y carcinomas (Raskov, Pommergaard, Burcharth, & Rosenberg, 2014)



**Figura 2. Tasa de mortalidad e incidencia de varios de los tipos de cáncer en México (Tomada de GLOBOCAL 2018).**

### 2.3.1 Factores genéticos del CCR

Se ha observado también, que los factores hereditarios aumentan el riesgo de desarrollar CCR y que el 10-15% de los pacientes afectados presentan un historial familiar con antecedentes de CCR. Existen principalmente dos tipos de CCR hereditario; el más común es el Síndrome de Lynch, en el cual existen mutaciones de genes involucrados en la reparación del DNA por mismatch (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 o EPCAM) que tiene como consecuencia la acumulación de mutaciones durante la replicación del DNA principalmente en las secuencias de microsatélites (Fragmentos de DNA con secuencias repetidas de nucleótidos). El segundo tipo de CCR hereditario es la Poliposis Adenomatosa Familiar, la cual

favorece la aparición de numerosos adenomas y subsecuentemente, el desarrollo de CCR a una edad temprana por la mutación en la proteína APC (Adenomatous Polyposis Coli Por sus siglas en inglés) (Kuipers et al., 2015).

Del mismo modo, existen otros factores genéticos involucrados con el CCR; la inestabilidad cromosómica, la metilación de islas CpG y la hipometilación global del DNA son algunos de ellos (Pritchard & Grady, 2011). Junto a la caracterización de dichos factores, la identificación de diversos marcadores moleculares presentes en el CCR, ha permitido la validación de distintos fármacos que podrían resultar benéficos en el tratamiento al silenciar a estos marcadores, los cuales a su vez, al ser el resultado de las alteraciones genéticas y epigenéticas arriba mencionadas, propician la aparición de mutaciones en genes específicos que pueden conllevar a la desregulación de vías de señalización involucradas con varios de los hallmarks del cáncer. (Choi, Bakir, Hart, & Graham, 2017)

#### **2.4 Vías de señalización en CCR**

Las vías de señalización son un complejo de interacciones proteicas en las que se lleva a cabo una cascada de reacciones intracelulares con el fin de integrar y distribuir información dependiendo de múltiples efectores, como lo son, los factores de crecimiento o bien por la interacción célula-célula. Existen varias vías caracterizadas no excluyentes unas de otras, las cuales distribuyen y procesan información de gran importancia en procesos de crecimiento y proliferación celular, arquitectura de la célula, síntesis de proteínas, movilidad y programación de muerte celular, por mencionar algunos. Por ende, alteraciones en componentes de las vías se han visto relacionadas con la progresión tumoral y son investigadas con el fin del desarrollo de blancos terapéuticos en cáncer (Martin, 2003).

En el caso del CCR, se ha caracterizado que las mutaciones con las que se inicia la carcinogénesis afectan vías de señalización específicas. Tal es el caso de la vía de TGF-  $\beta$  (Por sus siglas en inglés transforming growth factor-beta), que se ha reconocido como una vía supresora de tumor en CCR; se han encontrado



mutaciones en los receptores GFBR2 y TGFBR1 y los posreceptores SMAD2 y SMAD4 en el 30% y <50% de los casos de CCR respectivamente. Otro de los casos más reportados en CCR, es el de la vía MAPK (the EGFR–mitogen-activated protein kinase por sus siglas en inglés), esta es regulada por la proteína KRAS, perteneciente a la familia de protooncogenes RAS. Cuando la vía es activada por KRAS, se llevan a cabo procesos de crecimiento y sobrevivencia celular. Mutaciones en KRAS y proteínas que son reguladas por ella, como BRAF, se han reportado en el 40 y 15% de los casos de CCR respectivamente, además de ser el proceso que continua en la progresión tumoral después de la mutación en APC según el modelo de Vogelstein (Figura 1). De la misma manera, la vía de PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase Por sus siglas en inglés) se ha reportado con mutaciones en la proteína del mismo nombre en el 40% de los casos de CCR y es regulada, a su vez, por la activación de la vía de KRAS. Por último, la desregulación de la vía que da paso a la activación de las otras en el modelo de carcinogénesis es la de la WNT- $\beta$ -catenina, la cual resulta de gran importancia, ya que funge como reguladora de una gran cantidad de procesos fisiológicos. Se han encontrado mutaciones de los genes APC y CTNNB1 ( $\beta$ -catenina) en el 70% de los casos de CCR (Colussi, Brandi, Bazzoli, & Ricciardiello, 2013; Grady & Pritchard, 2014).

## **2.5 Aspectos clínicos y fisiológicos de la vía WNT- $\beta$ -catenina**

La vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina, cumple un rol importante durante el desarrollo embrionario al estar involucrada en procesos biológicos, tales como la diferenciación celular, proliferación, migración, adhesión celular, polaridad celular, arquitectura tisular y organogénesis. De igual manera en adultos, la vía WNT regula la hematopoyesis, osteogénesis, angiogénesis y adipogénesis. Todos estos procesos son altamente controlados en tejidos sanos para que lleven a cabo su funcionamiento de manera ordenada, mientras que, en diversas enfermedades, dichos procesos pueden encontrarse desregulados. Mutaciones de componentes de la vía WNT- $\beta$ -catenina, han sido encontrados en enfermedades como la osteoartritis, vitreorretinopatía exudativa familiar, así como enfermedades

neurodegenerativas como la esquizofrenia o el Alzheimer, además de por supuesto, de su rol esencial en el CCR (Klaus & Birchmeier, 2008; López Castro, 2008).

En las zonas del colon y el recto se lleva a cabo una renovación celular constante entre cada 5 y 7 días, donde se requiere la proliferación, migración y diferenciación de células troncales (stem cells) que favorece la homeostasis de un tejido normal. Las separaciones morfológicas de las stem cells, se dan por compartimientos (en las células de la cripta donde se da la proliferación celular) y diferenciación (en los villus del intestino y la superficie epitelial del colon) lo cual es dependiente de un gradiente de activación de la vía de señalización WNT-  $\beta$ -catenina (Basu, Haase, & Ben-Ze'ev, 2016). Se han descrito mutaciones de APC y  $\beta$ -catenina, en los estadios tempranos de la transformación del epitelio del colon, por lo cual se ha determinado que son posibles causas de la carcinogénesis (Polakis, 2012). De igual manera, la hiperactivación de la vía WNT-  $\beta$ -catenina ha sido considerada como un hallmark del CCR, debido a su participación tanto en los estadios tempranos como en los más invasivos. La activación de la vía se da por medio de ligandos de la familia R-spodin, los cuales, fueron descritos en procesos de dispersión celular y metástasis (Zhan, Rindtorff, & Boutros, 2017), además de estar presente en células de CCR resistentes a fármacos. Sumado a lo anterior, cambios epigenéticos como la represión transcripcional por vía de la metilación de islas CpG, han sido reportados para represores de la vía WNT en CCR (de Sousa e Melo & Vermeulen, 2016).

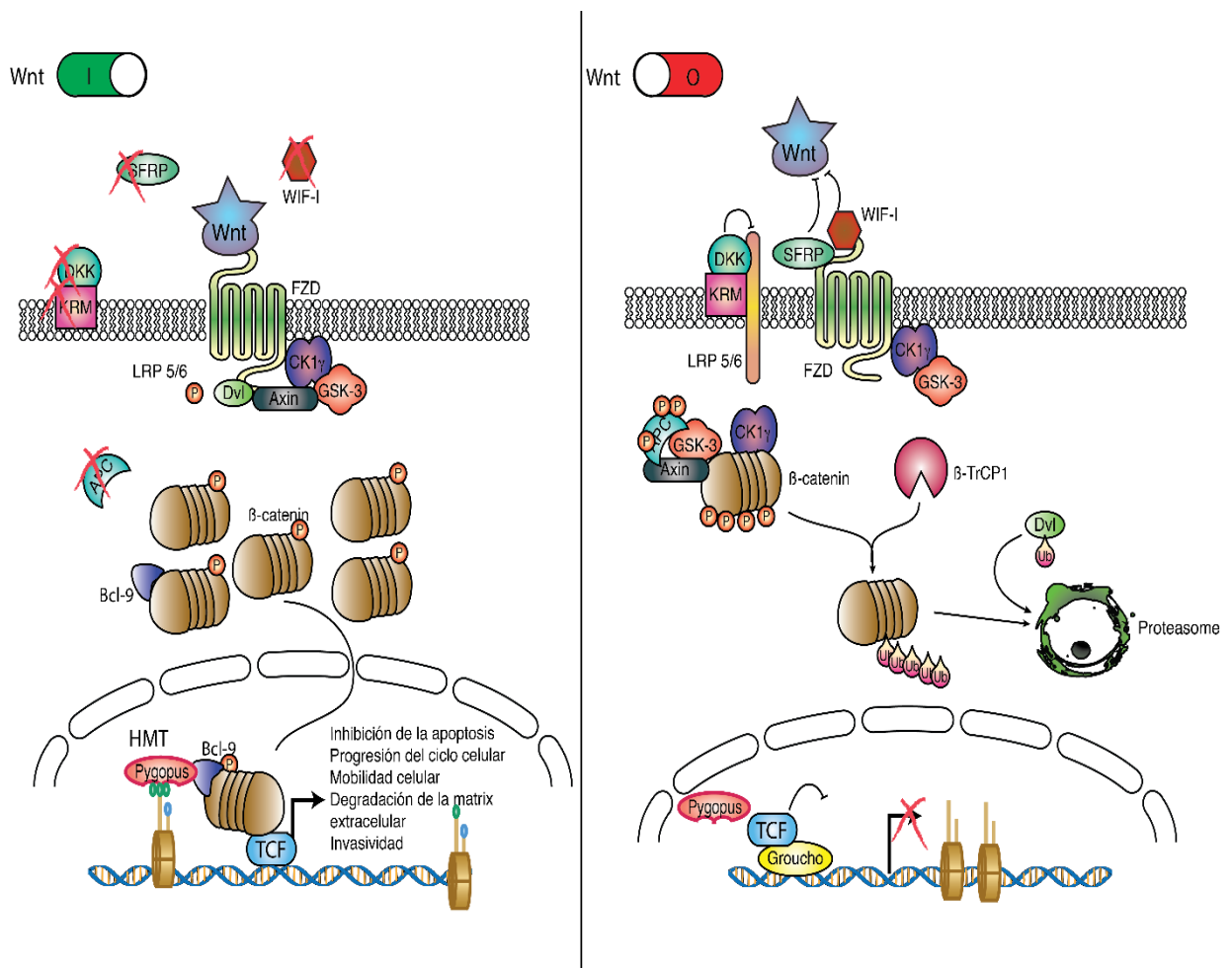
## **2.6 Descripción de la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina**

Para que se lleve a cabo la activación de la vía de señalización WNT, se requiere de la participación de ligandos WNT y receptores membranales Frizzled (Fz). Existen alrededor de 19 ligandos WNT y 11 receptores Fz, los primeros son proteínas glicosiladas producidas y secretadas dentro de un nicho de células de forma tejido dependiente, conformadas por alrededor 350-400 aminoácidos ricos en cisteínas y que contienen una péptido señal en el amino terminal (N-terminal) que permite su secreción extracelular (Mills, Szczerkowski, & Habib, 2017)0. Cuando el

ligando es marcado vía palmitolación por la proteína Porcupine en el retículo endoplasmático (RE), es transportado por vesículas o partículas lipoproteicas para ejercer su función exocrina (Clevers, 2006). Los segundos, son receptores de siete pasos transmembranales de la familia de receptores Fz con un dominio N-terminal extracelular, los cuales junto con los correceptores LRP5/6 (LDL receptor-related proteins 5 and 6 por sus siglas en inglés) interactúan de forma promiscua con los ligandos WNT y desencadenan la señalización de la vía. Aun así, existen varios antagonistas y agonistas que impiden o favorecen respectivamente, la activación de la vía WNT (Bryan T. MacDonald; Keiko Tamai and Xi He, 2010; Saito-díaz et al., 2013; Yang et al., 2016).

En un tejido no tumoral, la vía WNT puede ser regulada en primera instancia por antagonistas que bloqueen los ligandos WNT o los receptores Fz y LRP5/6 y, por lo tanto, la señalización. Existen 4 familias de antagonistas de la vía WNT que se expresan de forma autocrina. Cuando WIF1 (Wnt inhibitory factor 1 por sus siglas en inglés), sFRP (Secreted frizzled-related protein family por sus siglas en inglés), Cerberus o Dickkopf (DKK) (Stamos et al., 2014) antagonizan la señalización, el complejo conformado por APC, Axina, caseína cinasa 1 (CK1) y Glucógeno sintasa cinasa 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) (Peng, Zhang, Feng, Fan, & Jin, 2017), marcan vía fosforilación cuatro residuos de serina (S) y Treonina (T) (S33, S37, T41y S45) en el amino terminal de la proteína  $\beta$ -catenina y de esta manera, es reconocida y marcada por el complejo  $\beta$ -Trcp1 mediante ubiquitinación, para su posterior degradación vía proteosoma (Liu et al., 2002). Por el contrario, cuando la señal es transmitida, FZ-LRP5/6 fosforilan a la proteína dishevelled (Dvl) la cual a su vez recluta axina, al ser esta última la proteína que funciona como el andamiaje del complejo que degrada  $\beta$ -catenina, GSK3 $\beta$  y CSK1 quedan inactivadas y por ende  $\beta$ -catenina no es fosforilada. Al no ser degradada esta última, se acumula en el citoplasma y posteriormente se transloca al núcleo, en donde se une a la familia de factores de transcripción TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor por sus siglas en inglés) al desplazar a su represor transcripcional Groucho. Finalmente, el complejo TCF/LEF-  $\beta$ -catenina interactúa con los coactivadores BCL9 (Por sus siglas en inglés B-cell lymphoma 9) y Pygopus 2 (PYGO2) llevando a cabo la transcripción de

genes blanco de la vía WNT involucrados en la carcinogénesis (Figura 3) (Polakis, 2000).



**Figura 3. Vía de señalización WNT-β-catenina en su forma activa (panel izquierdo) y su forma inactiva (panel derecho).**

### 2.6.1 β-catenina

β-catenina, es una proteína citoplasmática multifuncional, codificada por el gen CTNNB1, está constituida por alrededor de 781 aminoácidos (aa), con 12 repeticiones de secuencias Armadillo (ARM) y 42 residuos que forman tres hélices con un arreglo de forma triangular y que sirven como un andamiaje rígido para sus dominios N- y C-terminal (NTD y CTD respectivamente) las cuales pueden ser más flexibles. Fue descubierta en 1980 por su función en dos procesos; el estructural y

el de señalización. Estructuralmente,  $\beta$ -catenina cumple su rol al participar en las interacciones del esqueleto de actina mediante su unión a través de  $\alpha$ -catenina con E-cadherina en la matriz extracelular, cuando la interacción es interrumpida  $\beta$ -catenina es liberada y comienza a acumularse en el citoplasma en donde es degradada o se transloca al núcleo, llevando a cabo su función de regulador de la transcripción. Dichas interacciones con E-cadherina, TCF/LEF y/o APC, se dan a través de las repeticiones de las secuencias ARM. (Czyzewska, Guzinska-Ustymowicz, Ustymowicz, Pryczynicz, & Kemonia, 2010; Takayama et al., 1998; Valenta, Hausmann, & Basler, 2012).

Mutaciones en el gen CTNNB1, permiten una activación constitutiva de la vía WNT que puede llevar hacia el desarrollo de la carcinogénesis. La mutación más frecuente de este gen es una missense en el exón 3, sitio en el que, se codifican los sitios de serina-treonina sujetos a fosforilación por parte de GSK3 $\beta$  y CSK1 (arriba mencionados), así como los residuos glicina-aspartato (G34- D32 respectivamente) que reconoce el complejo de ubiquitin ligasa  $\beta$ -Trcp1 (Gao, Wang, Broaddus, Sun, & Xue, 2018; Kitaeva et al., 1997; Mirabelli-Primdahl et al., 1999). Junto con las mutaciones,  $\beta$ -catenina ejerce su función transcripcional por interacción con histonas metil transferasas (HMT) como MLL1/ MLL2 (Mixed-lineage-leukemia por sus siglas en inglés) que favorecen la trimetilación de la histona 3 en su residuo 4 (H3K4Me3) como una marca que favorece la transcripción de blancos de la vía WNT, además de la importante interacción con sus coactivadores transcripcionales BCL9 y Pygo2, de los cuales aún no se tiene esclarecido si pueden participar también en el proceso de translocación de  $\beta$ -catenina al núcleo (Sierra, Yoshida, Joazeiro, & Jones, 2006).

### **2.6.2 Pygopus 2**

Durante la década pasada, PYGO2 fue la proteína central para describir sus mecanismos en relación con  $\beta$ -catenina. PYGO2 es una proteína con dos dominios evolutivamente conservados y separados por una región rica en prolina; su NHD (N-

terminal homology domain por sus siglas en inglés) y su carboxilo terminal (C-terminal) en donde se encuentra el dominio PHD (Por sus siglas en inglés plant homeodomain) cumplen un rol importante para su función como un coactivador transcripcional de la vía WNT (Jessen, Gu, & Dai, 2008). El dominio PHD de PYGO2 tiene sitios de unión a DNA y participa también, en la unión al dominio HD1 de BCL9 y los dominios Armadillos de  $\beta$ -catenina (Miller et al., 2013; Townsley, Thompson, & Bienz, 2004). Junto a lo anterior, se ha descrito que PYGO2 interactúa a través de su dominio PHD con remodeladores de la cromatina como HMT que permiten la H3K4m3 (Chen et al., 2010). Por el otro lado, en el dominio NHD de PYGO2 se han encontrado sitios de unión con histonas acetil transferasas (HAT) con las cuales reclutan a los complejos CBP300 y GCN5 y permiten la activación de genes blanco de la vía WNT mediante la acetilación de residuos de lisina de las histonas, como en el caso de la acetilación de la histona 3 en su lisina 56 (H3K56) (P. G. P. Andrews & Kao, 2016; Gu, Watanabe, & Dai, 2012)

De la misma forma, PYGO2 se ha descrito como una proteína esencial para la carcinogénesis y la progresión tumoral al estar sobre expresado en cáncer de mama, ovario, pulmón y hepatocarcinoma celular (Phillip G.P. Andrews, Lake, Popadiuk, & Kao, 2007; S. Zhang, Li, He, & Wang, 2015) . En el caso del CCR, PYGO2 se he encontrado sobre expresado en ratones con APC/  $\beta$ -catenina Min/+ indicando un posible rol en el desarrollo tumoral.(Talla & Brembeck, 2016). La inhibición de PYGO2 por el contrario, suprime la vía de señalización WNT junto con el crecimiento y la proliferación vascular en otros tipos de cáncer como pulmón y glioblastoma (Wang et al., 2016; Zhou et al., 2014). PYGO2 se ha encontrado también, como la proteína que permite la interacción con otras vías de señalización como la vía de Notch y PI3K/Akt (Q. Li et al., 2015; Roarty & Rosen, 2013).

Además de las diversas funciones de PYGO2 como coactivador de la vía WNT, se han descubierto otras funciones de manera independiente. PYGO2 regula procesos como la transcripción de RNA ribosomal (rRNA) y con esto favorece el crecimiento y proliferación celular (Phillip G P Andrews, He, Tzenov, Popadiuk, & Kao, 2013), PYGO2 también regula la transcripción de las histonas H2A; H2B; H3 y H4 mediante

su interacción con las HAT permitiendo la progresión del ciclo celular en cáncer de mama y es en este mismo tipo de cáncer, donde PYGO2 se ha visto en vuelto en la adquisición de quimio resistencia al favorecer la transcripción de la proteína MDR1 (Multidrug resistance 1 por sus siglas en inglés) (Gu et al., 2012; Z. M. Zhang et al., 2016). Por último, PYGO2 también participa en la invasión y metástasis en hepatocarcinoma al favorecer la metilación del promotor de E-cadherina y/o la sobreexpresión de la proteína Zeb2 que participa en el desarrollo de la metástasis (S. Zhang, Li, Liu, et al., 2015).

### **2.6.3 Genes Blanco de la vía WNT- $\beta$ -catenina**

Como ya se ha mencionado anteriormente, la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina regula varios de los procesos con roles importantes en el desarrollo embrionario y homeostasis del tejido, en CCR se han caracterizado la mayoría blancos de la vía involucrados en dichos procesos, los cuales también, tienen un rol importante en la progresión tumoral debido a su función como reguladores de los hallmarks del cáncer (Figura 4) (Herbst et al., 2014). Los blancos transcripcionales de la vía son de vital importancia tanto en estadios iniciales como en la progresión y la invasión y metástasis. En el inicio de la carcinogénesis, genes como LGR5 y DCLK1 permiten la desregulación de la vía, la proliferación celular y la evasión de la apoptosis durante la progresión de la carcinogénesis (Kim, Park, Jun, Kim, & Nam, 2017), además, otros genes como c-myc, Ciclina D1 y EGFR, incrementan procesos de crecimiento y proliferación desmedida (Tan et al., 2005). A medida que la vía WNT- $\beta$ -catenina se encuentra hiperactivada, se desencadena en última instancia, la sobreexpresión de proteínas como Bambi y MMP7 que favorecen la invasión y metástasis en CCR (Anastas & Moon, 2013). Del mismo modo, se ha reportado la expresión de otros blancos transcripcionales que participan en diversas etapas y aparición de los hallmarks del cáncer, algunos ejemplos son replicación ilimitada (Telomerasa), desregulación del metabolismo energético (PDK1, ID2) y Angiogénesis (VEGFA) (Hoffmeyer et al., 2012; Pate et al., 2014) por mencionar algunos, o bien, blancos transcripcionales que funcionan como supresor de tumor

(EphB/ephrin-B) y su expresión se ha encontrada disminuida en CCR cuando la vía se encuentra desregulada (Clevers & Batlle, 2006). Esto alude a la importancia de corroborar los modelos de investigación de la vía y amplificar la identificación de blancos potenciales.

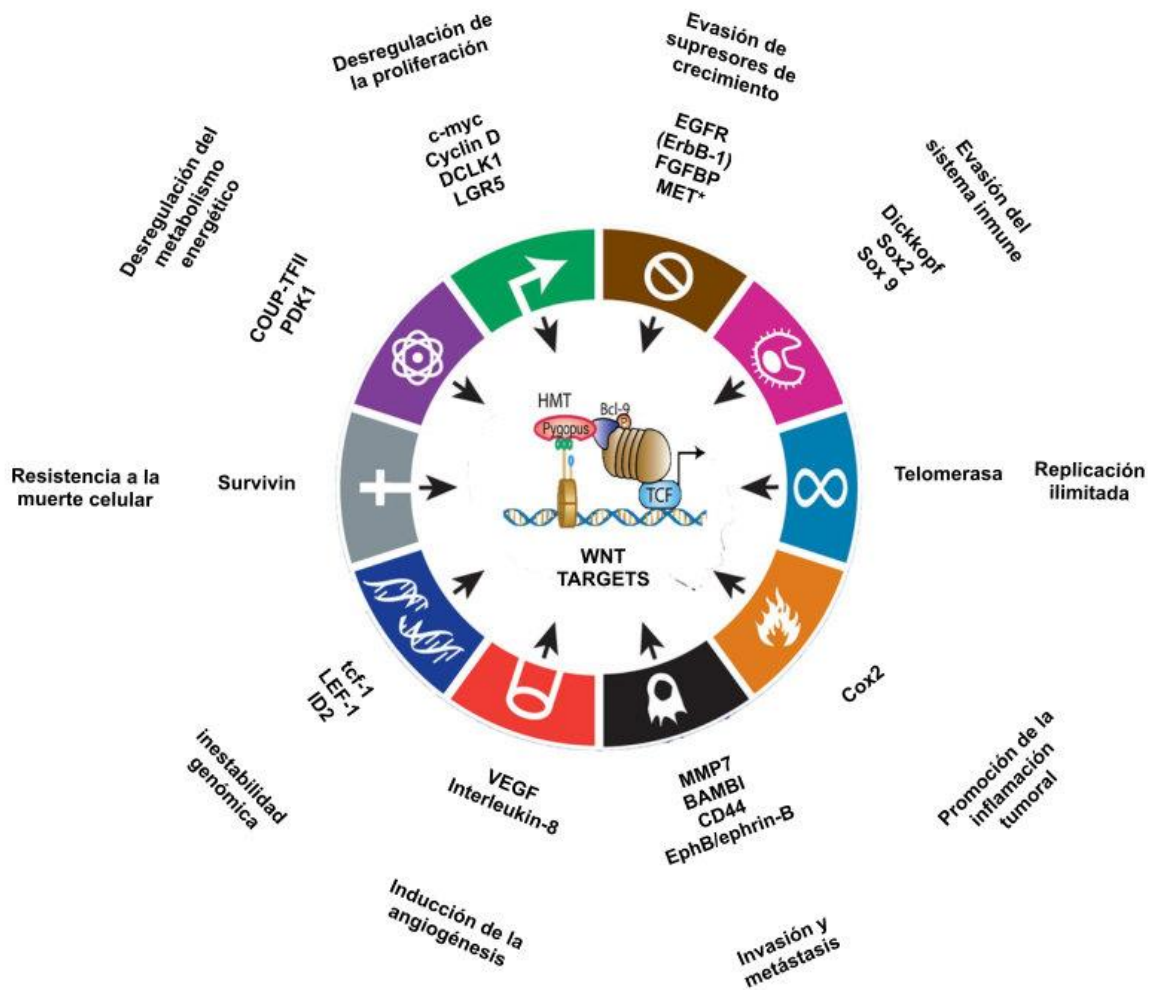


Figura 4. Blancos de la vía WNT-β-catenina y su participación en los diversos hallmarks del cáncer.

### 2.6.3 La vía WNT-β-catenina como blanco terapéutico

La variedad de funciones tanto de blancos transcripcionales como de los componentes de la vía WNT-β-catenina, resulta un impedimento en el desarrollo de



inhibidores adecuados. Hasta la fecha, se han explorado una alta cantidad de inhibidores de la interacción de  $\beta$ -catenina y el factor de transcripción TCF/LEF que no han tenido un resultado óptimo (Le, McDermott, & Jimeno, 2015), conllevando a que la búsqueda de inhibidores continúe. La clasificación de los fármacos es basta, desde componentes naturales como vitaminas A y D o la curcumina y el resveratrol, pasando por moléculas pequeñas que inhiben la vía como lo es el PNU-74654 y llegando a inhibidores basados en componentes virales y anticuerpos (como adenovirus recombinantes y anticuerpos de WNT1 monoclonales respectivamente). De igual manera, existen diversos fármacos que se encuentran en fases clínicas o se tienen anticipaciones de aplicaciones clínicas y que actúan a varios niveles, desde la inhibición de interacción de ligandos WNT con los receptores, como lo hacen los fármacos OMP-54 F28 y NSC668036, la inhibición de la unión de  $\beta$ -catenina con el factor de transcripción TCF/LEF como lo hace el PNU-74654, los inhibidores de tankirasa que regulan el complejo de degradación de  $\beta$ -catenina, algunos más inhiben la interacción con remodeladores de la cromatina como CBP como lo hace el fármaco ICG-001 o bien, recuperando la actividad de inhibidores de  $\beta$ -catenina como CSK1 como lo hacen los fármacos anti-pinworm (Masuda, Sawa, & Yamada, 2015).

La actividad transcripcional aberrante de la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina en CCR, contribuye a ambos, estadios iniciales y avanzados donde se ha desarrollado la invasión y la metástasis. Su participación se da principalmente, en procesos que regulan las stem cells y células de la cripta intestinal, en donde pueden conllevar al desarrollo tumoral por readquirir características de stem cells o bien, por migración de stem cells adquiriendo características tumorales en las criptas.

La evaluación de componentes y blancos transcripcionales de la vía, suponen un acercamiento al desarrollo de inhibidores que podrían resultar como terapias efectivas para ciertas poblaciones de pacientes por lo cual, la importancia de este trabajo recae en el análisis de la vía de señalización a nivel transcripcional en un modelo de CCR.

### 3. Hipótesis

La hiperactivación de la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina, favorece la sobreexpresión de los activadores PYGO2,  $\beta$ -catenina y de los blancos transcripcionales c-myc, MMP7, EphB4, VEGFA, BAMBI y LEF-1, en líneas celulares de CCR y datos de tejidos de pacientes tomados del TCGA.

### 4. Objetivo General

- Evaluar la actividad transcripcional de la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina en líneas celulares de CCR y datos de tejidos de pacientes tomados del TCGA.

#### 4.1 Objetivos Particulares

- Determinar los niveles de activación de la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina.
- Analizar la expresión de PYGO2 y  $\beta$ -catenina de la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina *In vitro e In silico*
- Analizar la expresión de blancos transcripcionales c-myc, MMP7, EphB4, VEGFA, BAMBI y LEF-1 de la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina *In vitro e In silico*
- Analizar la expresión de PYGO2,  $\beta$ -catenina y los blancos transcripcionales al inhibir la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina en la línea de CCR HCT116.

## **5. Material y Método**

### **5.1 Cultivo celular**

Se empleó la línea celular comercial de colon no tumoral CTRL 1790 (CCD 841 CoNy) las líneas tumorales de colon HCT 116 (CCL-247) (línea epitelial de carcinoma) y SW620 (CCL-227) (línea metastásica obtenida de nódulo linfático), las cuales tienen mutaciones en los genes CTNNB1 y APC respectivamente. Todas estas líneas celulares fueron proporcionadas por el laboratorio 11 de Genómica Funcional de la Unidad de Biomedicina en la Fes Iztacala UNAM. Las líneas celulares CRL-1790 y HCT-116 fueron mantenidas en placas petri de 100 X 15 mm con medio RPMI 1640 (Gibco), mientras que la línea celular SW-620 con DMEM/F-12 (Gibco) ambos medios suplementados con 10% Suero Fetal Bovino (SFB) (Corning). Todas las líneas fueron incubadas a 37°C en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### **5.2 Transfección**

Se utilizaron 500 000 células en placas de 6 pozos 8.87 cm<sup>2</sup>, las cuales se sembraron 24 horas antes de la transfección y fueron mantenidas con 3 ml de su medio correspondiente con 10% de SFB. Con el fin de evaluar la actividad de la vía WNT- $\beta$ -catenina en las líneas celulares, se transfectaron por separado 2  $\mu$ g de los plásmidos TOP/FOP (TCF Reporter Plasmid Kit Merck Millipore), en cada uno de los grupos experimentales, así como 5 ng del vector de luciferasa de Renilla (Promega), esto se llevó a cabo mediante el agente de transfección Lipofectamina 3000 (Invitrogen Life Technology, Waltham, MA, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se hicieron dos Mix de transfección en tubos de 1.5 ml, en el primero se vertió Lipofectamina 3000 junto con Optimem (Gibco) para alcanzar un volumen de 125  $\mu$ l por cada grupo experimental. En el segundo Mix, se colocaron los plásmidos a utilizar junto con Optimem para un volumen de 125  $\mu$ l. Una vez completados los Mix, se dejan reposando a temperatura ambiente durante 15

minutos con el fin de que reaccionen y se homogenicen las muestras a transfectar con los agentes de transfección. Pasado este tiempo se vertieron los 125 µl del Mix 1 en el tubo del Mix 2 y se dejaron reposar otros 15 minutos. Por último, se colocaron los 250 µl finales del Mix de transfección en cada grupo control junto con 2.75 ml de medio con 10% de SFB.

El inhibidor de la interacción  $\beta$ -catenina-TCF/LEF PNU-74654 (Invitrogen) se utilizó en concentraciones de 10, 50 y 100 µM que fueron incorporadas junto con el volumen de transfección y el medio correspondiente y; como control DMSO al 0.1%.

### **5.3 Extracción de RNA**

Una vez obtenida una confluencia de entre el 70 y 80% de las células, el medio fue retirado y se procedió con la extracción de RNA de las líneas celulares mediante TRIzol Reagent (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para las células tratadas con PNU 74654, se realizó la extracción 24 horas después de la transfección mediante TRIzol Reagent (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La integridad de todas las muestras de RNA se analizó mediante un gel de agarosa al 1.5% y posteriormente se cuantificó el RNA extraído de cada línea celular mediante el equipo Epoch (Biotek), la reacción de retrotranscriptasa para obtener el cDNA de la línea celular HCT116 tratada y sin tratar, así como de las líneas CRL1790 y SW620 basales se llevó a cabo empleando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 1).

Stage 1 x1	Stage 2 x1	Stage 12x1		
			85.0	
	37.0	37.0		
25.0				4
10:00	60:00	60:00	5:00	-

**Tabla 1. Condiciones de la reacción de Retro transcriptasa mediante High-Capacity.**

## 5.4 qPCR

Se diseñaron oligos para evaluación del mRNA de los activadores transcripcionales y los genes blancos de la vía WNT-  $\beta$ -catenina utilizando la base de datos Gen del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) (Tabla 2). Las condiciones para los oligos fueron estandarizadas por PCR punto final (Tabla 3) y posteriormente, se realizaron PCRs en tiempo real (qPCR) empleando el kit SYBR Green Máster Mix: SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) bajo las condiciones que indica el proveedor (Tabla 4).

Primer	Foward	Reverse	Tm	NCBIID
Actina	CTC ACC CTGAAGTAC CCC ATC	GAT AGC ACA GCCTGGATA GCA A	63°C	NM_001101.3
B-Catenina	TCT GAG GAG CAG CTT CAG TCC CC	A GC CGC TTT TCT GTC TGG TTC CAT	63°C	X87838.1
BAMBI	CATTGCTGGAGGGCTGATTT	TCCAAGICTAACTTTGCAACC	57°C	NM_012342.2
c-myc	TTT TGC CCT GCG TGA CCA GAT CCC	CTC GTC GIT TCC GCA ACA AGT CCT	64°C	AY214166.1
EphB4	CAAATACCATGAGAAGGGCG	CTCTCATCCAGTTGGTCTG	57°C	NM_004444.4
LEF-1	GACCTAATGCACGTGAAGC	AGTACACTCAGCAACGACAT	57°C	NM_001130713.2
VEGFA	GAGGAA GAGTACCTCGCC	CAGCCTGGGACCACTTG	57°C	NM_001025366.2
MMP7	ATCATGATTGGCTTTGCGCGAGGA	TCCCTAGCTGCTACCATCGTCCA	63°C	NM_002423.3
PYGO2	TGTCCCAACGATTTGCTCAG	CAC TCC ACC AGC GTC ACC CAT CGT	57°C	NM_138300.3

**Tabla 2. Diseño de oligos de genes a evaluar para la vía WNT- $\beta$ -catenina.**

Stage 1 x1	Stage 2 x35	X1			
95	95		72	72	
		57			4
1:00	0:15	0:15	0:30	7:00	-

**Tabla 3. Condiciones oligos de genes a evaluar para la vía WNT- $\beta$ -catenina en PCR punto final.**

95	95		G		95
		57	O	65	
			T		
			O		
0:50	0:05	0:30	40 x	0:05	

**Tabla 4. Condiciones oligos de genes a evaluar para la vía WNT- $\beta$ -catenina en qPCR.**

### **5.5 Ensayo de Luciferasa con el vector de TOP FLASH**

El ensayo consiste en la transfección de los vectores TOP y FOP a las líneas celulares. El vector de TOP tiene múltiples secuencias del promotor de TCF y el marco abierto de lectura de la Luciferasa, por lo cual si el factor de transcripción TCF es activado se transcribe la proteína de la Luciferasa y en contacto con su sustrato se emiten unidades relativas de luminiscencia (RLU por sus siglas en inglés). Por su parte el vector de Fop tiene las secuencias de TCF mutadas, por lo que se utiliza como un control de luminiscencia basal que permite obtener un RLU basales. Para llevar a cabo el ensayo, se retiró el medio a las células 24 horas después de la transfección y mediante el buffer de lisis (diluido del 5x al 1x) del kit Dual-Luciferase Reporter 1000 Assay System (Promega) se obtuvo un extracto proteico que fue vertido en tubos eppendorf de 1.5 ml y posteriormente centrifugado a 1500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue vertido en tubos nuevos y posteriormente se colocaron 20 µl en las placas de 96 pozos de plástico opaco y fondo transparente, adecuadas para el equipo GloMax® 96 Microplate Luminometer previamente calibrado con los sustratos para Luciferasa (luciferina) y Renilla (coelenterazine). El programa de detección que se utilizó fue. Una vez obtenidos los datos se obtuvo un cociente de TOP/FOP flash para estimar la actividad de la vía WNTβ-catenina.

### **5.6 Análisis de datos del TCGA**

Se analizaron datos del TCGA (The Cancer Genome Atlas por sus siglas en inglés) Research Network , sobre los niveles de expresión de mRNA en tejido de pacientes de muestras tumorales (n=342) y no tumorales (n=43), tanto de los coactivadores transcripcionales de la vía de señalización WNT-β-catenina (β-catenina y Pygopus 2), así como algunos de los genes blancos de la vía WNT antes mencionados (tabla1).

## **5.7 Análisis estadísticos**

Todos los datos fueron analizados mediante el software Prism 5.0 (GraphPad) utilizando el análisis de varianza (ANOVA) de un factor y T de student con una  $P < 0.001$  y  $0.05$  según el experimento.



## 6. Resultados

### 6.1 Actividad de la vía WNT- $\beta$ -catenina en las líneas celulares de CCR

Como primer punto, se evaluaron los niveles de la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina en las líneas celulares de CCR; HCT116 y SW620, teniendo por control a la línea no tumoral CRL1790. Por medio del cociente de TOP/FOP flash, se demostró la hiperactivación de la vía en ambas líneas tumorales. En la línea HCT116, se vio un aumento de al menos 5 veces la activación de la vía WNT- $\beta$ -catenina sin embargo, el análisis estadístico no mostro diferencias significativas ANOVA ( $P < 0.05$ ). Del mismo modo, en la línea celular SW620 se observó un aumento en la activación de la vía, donde el cociente TOP/FOP fue de más de 10 veces y fue estadísticamente significativo ANOVA ( $P < 0.001$ ) (Figura 5).

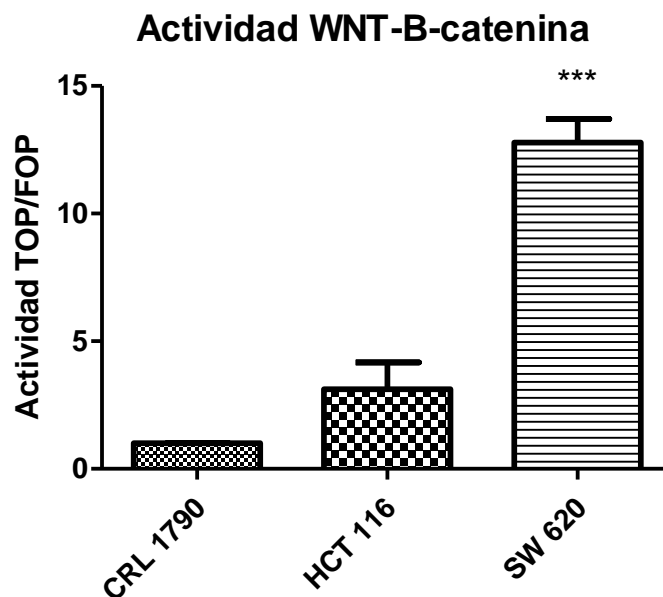


Figura 5. Actividad de TOP/FOP en líneas celulares de CCR comparadas con la línea control de colon no tumoral CRL1790. La actividad de la vía WNT- $\beta$ -catenina se encuentra hiperactivada en ambas líneas tumorales, sin embargo, solo en la línea SW620 se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ).

## **6.2 Expresión de los activadores transcripcionales de la vía WNT- $\beta$ -catenina en datos obtenidos del TCGA y líneas celulares de CCR**

Al haber corroborado la hiperactivación transcripcional de la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina, se procedió a evaluar la expresión de los genes encargados de la transcripción. A partir de los datos obtenidos de la expresión de mRNA en tejido de CCR en diferentes estadios obtenidos del TCGA, se analizaron los genes PYGO2 y  $\beta$ -catenina. Al comparar los datos de muestras tumorales con los de tejido no tumoral, no se observaron diferencias significativas en el estadístico ANOVA ( $P < 0.05$ ) (Figura 6 A). De igual manera, se evaluaron los niveles de mRNA de los activadores en las líneas celulares de CCR comparadas con el control no tumoral y aunque se observó una ligera tendencia al aumento, no se encontraron diferencias significativas ANOVA ( $P < 0.05$ ) (Figura 6 B).

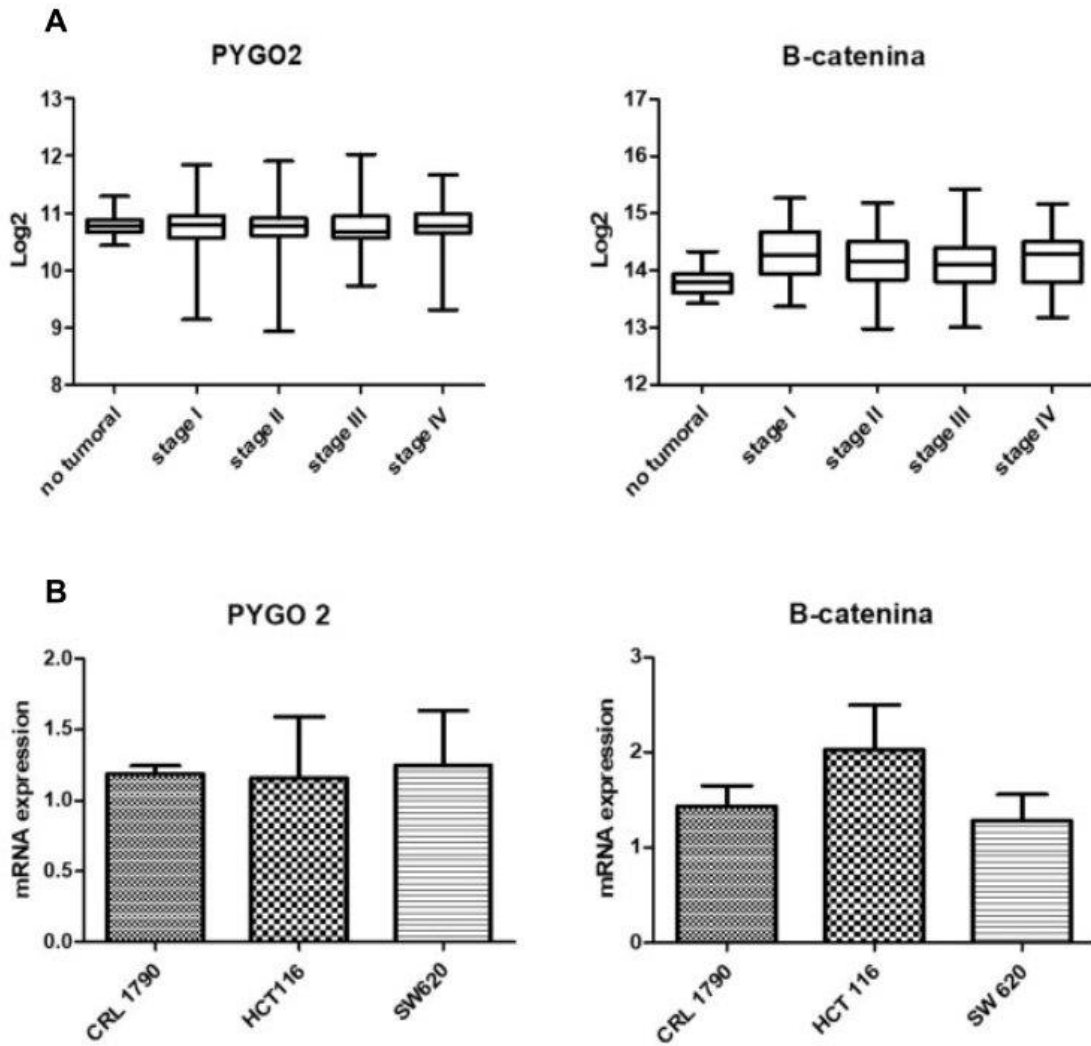


Figura 6. Niveles de expresión mRNA de PYGO2 y  $\beta$ -catenina, en datos obtenidos del TCGA (A) y líneas celulares de CCR (B). Al comparar los niveles de expresión de las muestras tumorales con el grupo control, ninguno de los genes mostro diferencias significativas ( $P < 0.001$ ).

### **6.3 Expresión de los blancos transcripcionales de la vía WNT- $\beta$ -catenina en datos obtenidos del TCGA y líneas celulares de CCR**

A continuación, con el fin de conocer si la expresión de los blancos transcripcionales de la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina reportados para CCR (Tabla 1), eran similares a los activadores transcripcionales, se analizaron datos del TCGA de los blancos transcripcionales, en los cuales se encontraron diferencias significativas en los diferentes estadios al comprarlos con el grupo control ANOVA ( $P < 0.001$ ) (Figura 7). Junto con esto, se analizó la expresión de los mismo mRNA en las líneas celulares de CCR (Figura 8) y a diferencia de los datos del TCGA y correspondiendo con los activadores transcripcionales, no se observaron diferencias significativas ANOVA ( $P < 0.05$ ) aunque si una tendencia similar a la de PYGO (MMP7, BAMBI y LEF-1) o  $\beta$ -catenina (c-myc, EphB4 y VEGFA). Además, únicamente EphB4 mostro una disminución de su expresión significativa ANOVA ( $P < 0.05$ ) en la línea celular SW620.

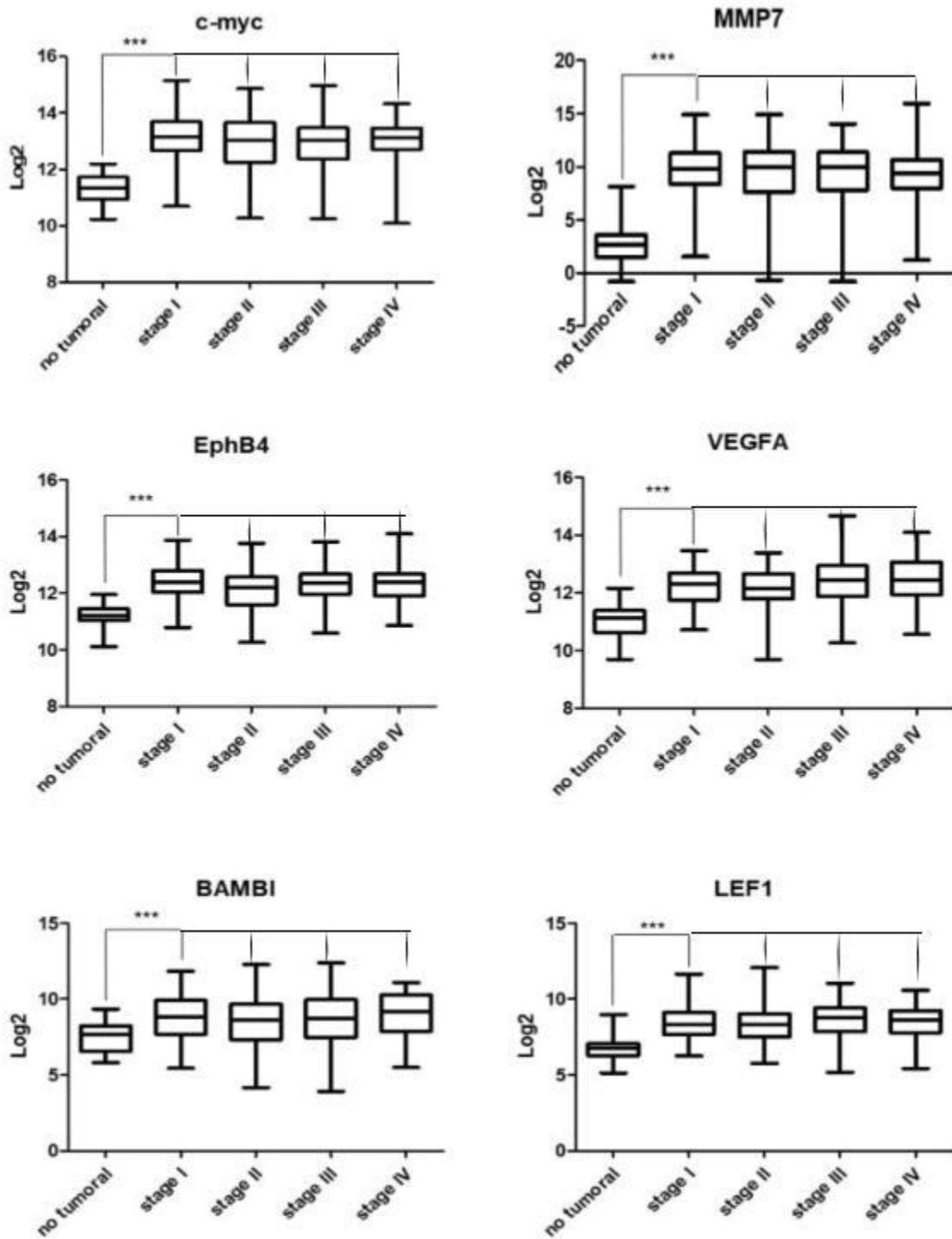


Figura 7. Niveles de expresión de mRNA de blancos transcripcionales de la vía WNT-  $\beta$ -catenina, en datos obtenidos del TCGA, donde se observan diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de las muestras tumorales con el grupo control ( $P < 0.001$ ).

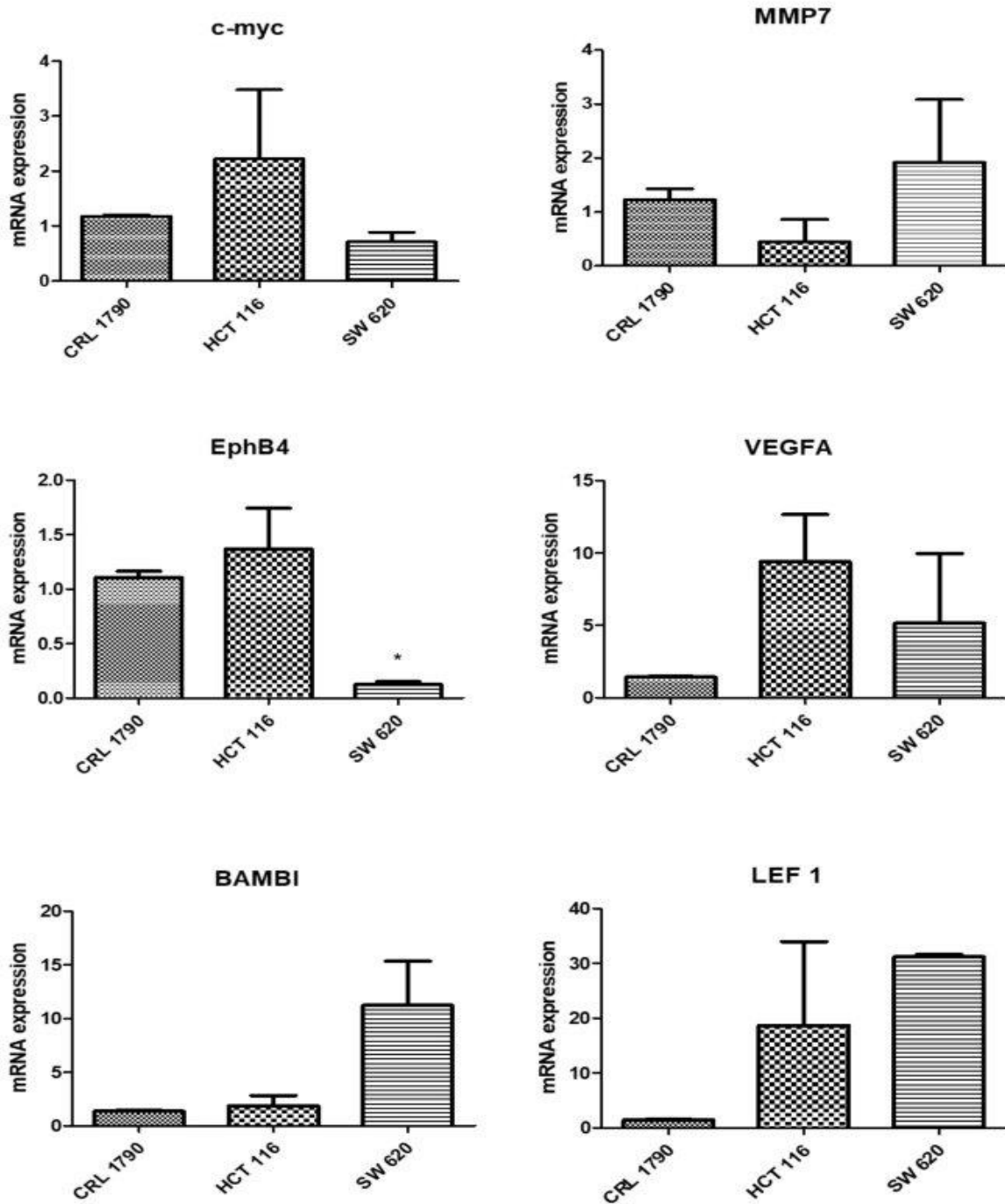


Figura 8. Niveles de expresión de mRNA de blancos transcripcionales de la vía WNT-  $\beta$ -catenina, en líneas celulares de CCR. No se observan diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de las muestras tumorales con el grupo control salvo por la disminución de EphB4 en la línea SW620 ( $P < 0.05$ ).

#### 6.4 Inhibición de la actividad de la vía WNT- $\beta$ -catenina mediante el PNU-74654 en la línea celular de CCR HCT116

Posteriormente, para tener la certeza de que los blancos transcripcionales reportados son dependientes de la interacción de  $\beta$ -catenina con el factor de transcripción TCF/LEF, se inhibió la interacción de ambas proteínas mediante la adición de la molécula PNU-74654 (Sigma). Se encontró que tras 24 horas de exposición a diferentes concentraciones de PNU-74654. La concentración de 100  $\mu$ M mostro diferencias significativas con respecto al control ANOVA ( $P < 0.001$ ) (Figura 9).

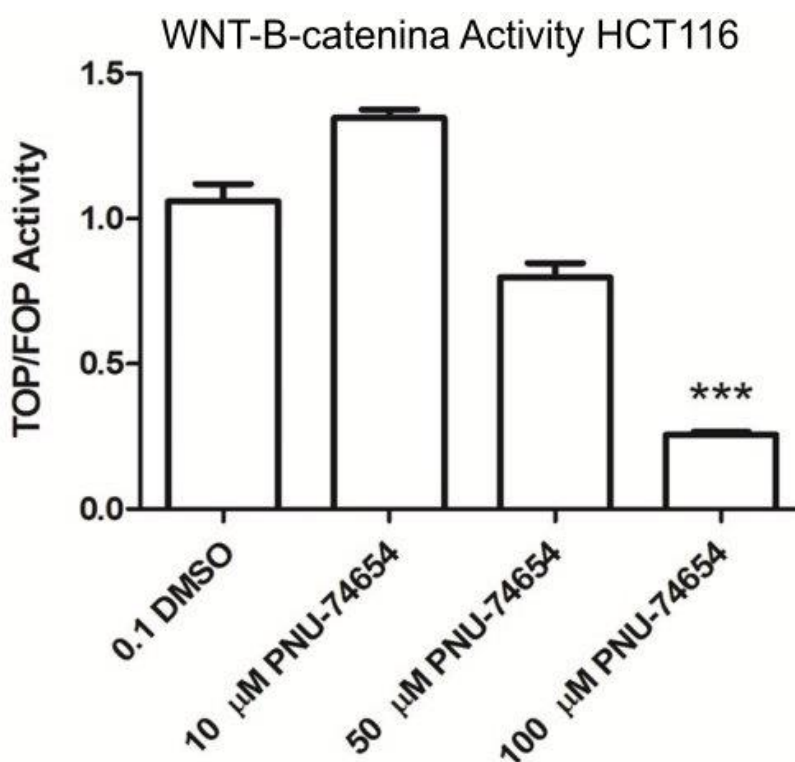


Figura 9. Inhibición de la vía WNT-  $\beta$ -catenina, en la línea celular de CCR HCT116 por medio de la molécula PNU-74654. Se probaron las concentraciones de 10, 50 y 100  $\mu$ M a las 24 horas, solo la concentración de 100  $\mu$ M mostro diferencias significativas con respecto al control ( $P < 0.001$ ).

## 6.5 Expresión de los activadores transcripcionales al inhibir la vía WNT- $\beta$ -catenina en la línea celular de CCR HCT116, mediante el PNU-74654

Una vez encontrada la concentración a la cual se lograba inhibir la actividad de la vía WNT- $\beta$ -catenina (100 $\mu$ M), se evaluó la repercusión que esto tenía en la expresión a nivel de mensajero de los activadores transcripcionales PYGO2 y  $\beta$ -catenina y, aunque se observó una ligera disminución en los niveles de PYGO2 y un ligero aumento en los de  $\beta$ -catenina, ninguno fue estadísticamente significativo t de Studen ( $P < 0.05$ ) (Figura 10).

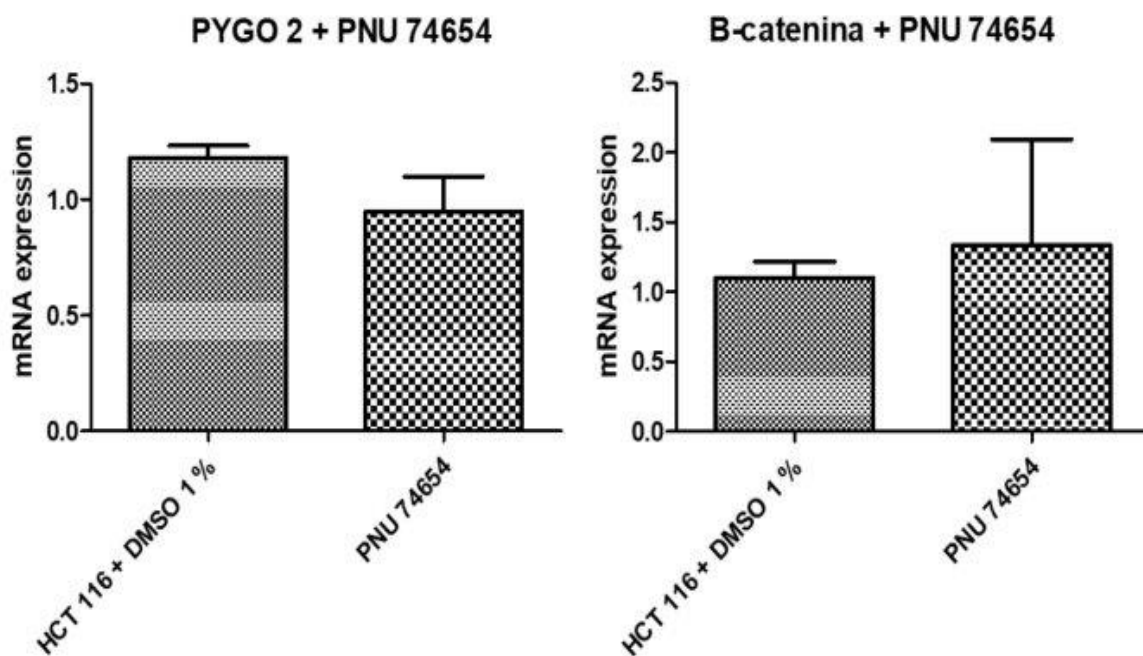


Figura 10. Niveles de expresión de mRNA de los activadores transcripcionales al inhibir la vía WNT- $\beta$ -catenina, en la línea celular de CCR HCT116. No se observan diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de las muestras tumorales con el grupo control ( $P < 0.05$ ).



## **6.6 Expresión de los blancos transcripcionales al inhibir la vía WNT- $\beta$ -catenina en la línea celular de CCR HCT116, mediante el PNU-74654**

Finalmente, se evaluaron los niveles de expresión de los mRNA de los blancos transcripcionales de la vía WNT- $\beta$ -catenina al inhibir la actividad de esta. Se observaron dos tendencias; genes como c-myc, MMP7, BAMBI y VEGFA disminuyeron su expresión al inhibir la vía WNT y por el contrario, los genes EphB4 y LEF-1 mostraron una tendencia hacia el aumento en su expresión al inactivar la vía, aun así ninguno de estos valores mostro ser estadísticamente significativo t de Studen ( $P < 0.05$ ) (Figura 11).

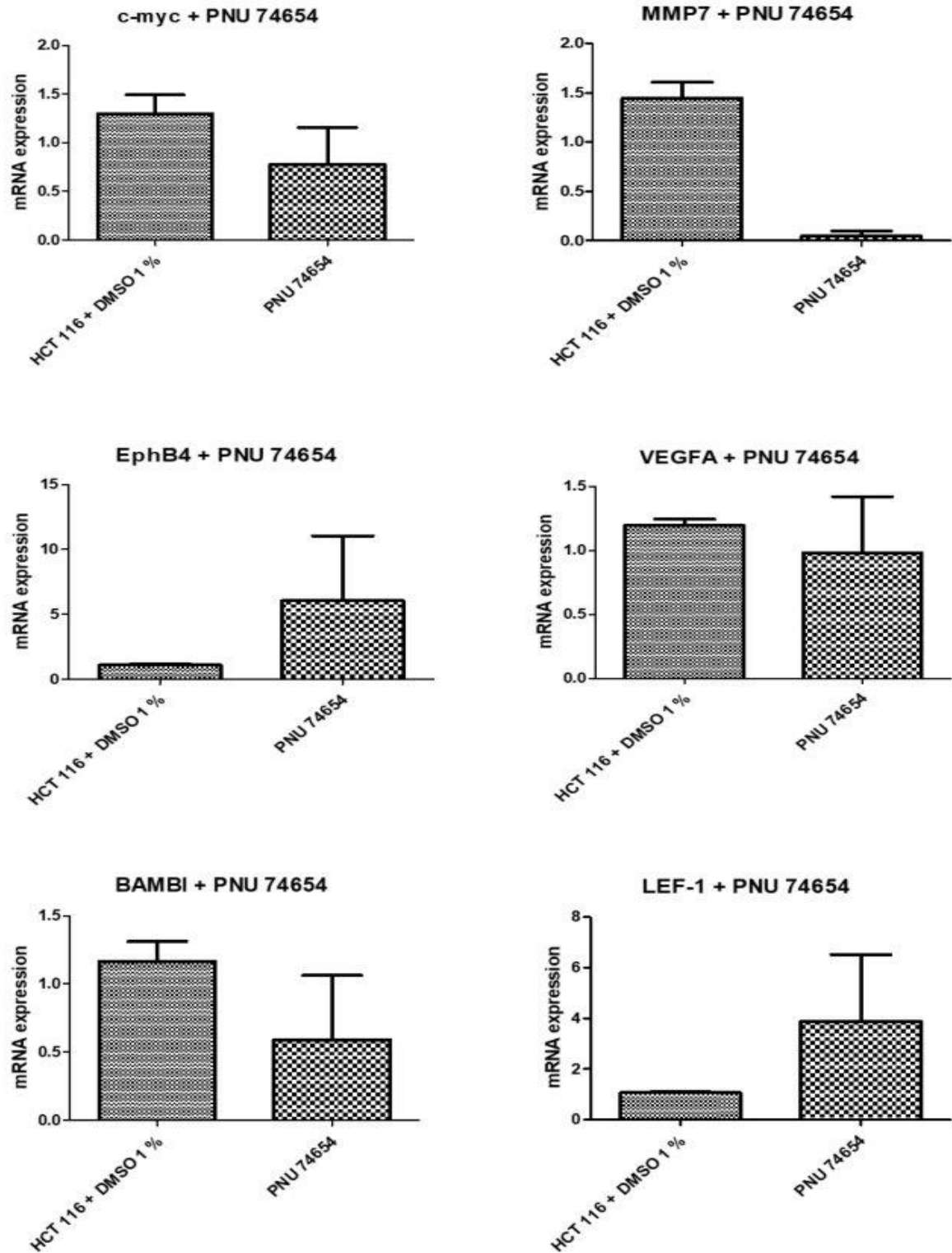


Figura 11. Niveles de expresión de mRNA de los blancos transcripcionales al inhibir la vía WNT- $\beta$ -catenina, en la línea celular de CCR HCT116. No se observan diferencias significativas al comparar los niveles de expresión de las muestras tumorales con el grupo control ( $P < 0.05$ ).

## 7. Discusión

En este trabajo se evaluó la actividad transcripcional de la vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina, tomando en cuenta los niveles de activación de la vía y sus niveles de expresión de mRNA de activadores y blancos transcripcionales, así como las alteraciones que podrían tener estos últimos al momento de apagar la vía de señalización.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la vía WNT- $\beta$ -catenina se encuentra hiperactivada en las líneas celulares de CCR, con un nivel 5 veces mayor en HCT116 y más de 10 veces mayor en SW620, esto corresponde con reportes de mutaciones de los genes CTNNB1 y APC mutados en ambas las líneas celulares respectivamente, lo cual propicia una activación constitutiva de la vía WNT- $\beta$ -catenina. Aunado a esto, la participación de ciertos activadores que también son blancos transcripcionales de la vía (como LGR5) podría estar participando en la hiperactivación de esta.

Con lo anterior, es importante destacar la importancia de la vía WNT- $\beta$ -catenina en estadios tempranos (de los que se deriva la línea celular HCT116) (en donde algunos de sus blancos, permiten su hiperactivación y desencadenan la proliferación celular y la evasión de la apoptosis). La línea SW620, deriva de un estadio más avanzado y un modelo de metástasis en donde la hiperactivación de la vía corresponde con lo que se ha señalado en otros estudios (Sánchez-tilló et al., 2011; S. Zhang, Li, Liu, et al., 2015), debido a que en CCR la vía WNT- $\beta$ -catenina, regula una cantidad de blancos relacionados con la Transición Epitelio Mesenquimal o EMT (epithelial- to-mesenchymal transition por sus siglas en inglés) como MMP7, que desencadenan procesos de metástasis además de inhibir E-cadherina, lo cual explicaría también, la significancia estadística encontrada ANOVA ( $P < 0.001$ ).

Aun así, pese a que la vía se encuentra hiperactivada en las líneas celulares de CCR, los activadores transcripcionales de esta como lo son PYGO2 y  $\beta$ -catenina, no muestran cambios significativos en su expresión de mRNA, ni en el modelo de

líneas celulares de CCR, ni en datos obtenidos del TCGA. Por el contrario de lo obtenido, se ha reportado la sobreexpresión de PYGO2 en carcinomas y su relacionado con un pronóstico pobre para pacientes, aun así, estas evaluaciones se hicieron a nivel de proteína y por medio de inmunohistoquímicas lo cual podría dar respuesta a que no se encontró la misma variación (Brembeck et al., 2011).

En CCR  $\beta$ -catenina no se ha encontrado sobre expresado en muestras tumorales, sin embargo, si se ha reportado que PYGO2 puede regular la actividad de  $\beta$ -catenina en el desarrollo de la hiperplasia. De la misma forma, se ha demostrado que aun cuando  $\beta$ -catenina y PYGO2 no se encuentren sobre expresados, ambos activadores son estabilizados a nivel de proteína por medio de la interacción con AKT, lo cual permite una activación constitutiva de la vía en CCR (Z. M. Zhang et al., 2016).

Ahora bien, al analizarse los blancos de la vía WNT-  $\beta$ -catenina a partir de los datos del TCGA, se observó su sobre expresión con significancia estadística ANOVA ( $P < 0.001$ ). Aun así, al analizarse los mismos blancos en las líneas celulares por qPCR, solo se encontró una tendencia al aumento en una o ambas líneas celulares. Estos datos concuerdan con reportes (Herbst et al., 2014), donde en CCR los blancos WNT, se encuentran sobre expresados y actúan en diversos mecanismos que permiten la progresión tumoral y por ello, han sido considerados como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico en pacientes.

En el caso específico de EphB4, se encontró un nivel de expresión disminuido estadísticamente significativo ANOVA ( $P < 0.05$ ) cuando la vía se encuentra desregulada. Ya que EphB4 se ha clasificado como un supresor de tumor inactivo en 50% de los casos de CCR (Clevers & Batlle, 2006), esto podría explicar la disminución de su expresión. Aun así, el mecanismo por el que la vía WNT- $\beta$ -catenina regula su expresión es desconocido.

Después de inhibir la actividad de la vía WNT-  $\beta$ -catenina, se evaluó la expresión del mRNA de los activadores de la vía PYGO2 y  $\beta$ -catenina sin encontrarse diferencias significativas o alguna tendencia. En cuanto a la expresión de PYGO2, no se ha reportado si podría llevarse a cabo una regulación a nivel transcripcional o

traduccional después de inhibir la vía por medio del PNU-74654, aun así, las interacciones que afecta esta molécula no parecerían afectar los sitios de unión de PYGO2 con  $\beta$ -catenina o con algún remodelador de la cromatina. Por el contrario, la expresión de  $\beta$ -catenina se ha evaluado después de la inhibición de la vía con el PNU-74654 y se observaron alteraciones a nivel de mRNA y una clara disminución de la proteína nuclear y citoplasmática, por lo cual, la interacción de la proteína con el PNU podría estar afectando la estabilidad de esta última (Leal et al., 2015).

Finalmente, se evaluó la expresión de los genes blancos de la vía WNT-  $\beta$ -catenina después de inhibir su actividad con el PNU-74654, donde, si bien no se encontraron diferencias estadísticamente significativas t de Student ( $P < 0.05$ ), si se observaron algunos patrones en la expresión de ciertos blancos. Para el caso de los genes c-myc, MMP7, VEGFA y BAMBI, se denota una disminución en los niveles de expresión, que en primera instancia, podría deberse a la dependencia de la hiperactivación de la vía WNT, lo que concuerda con lo reportado en diversos artículos en los cuales, demuestran la sobreexpresión de estos blancos dependientes de la hiperactivación de la vía WNT en CCR (Kim et al., 2017; C.-M. Li et al., 2004; Masuda et al., 2015). Aun así, para cada una de las expresiones de estos genes existieron variaciones, en el caso de MMP7 los resultados del presente trabajo concordaron con lo que se ha reportado, debido a que se ha demostrado que en CCR la expresión de MMP7 es dependiente de la interacción de  $\beta$ -catenina con TCF/LEF (Wu, B., Crampton, S. P. & Hughes, C. C. 2007).

En los casos de c-myc, VEGFA y BAMBI, si bien disminuyó su expresión, no fue de una forma tan drástica como la de MMP7, lo cual puede deberse a la interacción de PYGO2 como coactivador de la vía y a la dependencia de c-myc y BAMBI de la función transcripcional de PYGO2. Dado que este último no se vio alterado después del uso del PNU-75654, dicho activador podría continuar regulando transcripción de c-myc independientemente de la vía Wnt- $\beta$ -catenina aunque en menor medida (Brembeck et al., 2011; Talla & Brembeck, 2016).

Por último, LEF-1 mostro una tendencia al aumento en su expresión aun cuando la vía WNT-  $\beta$ -catenina es inhibida por medio del PNU-74654. Esto, podría adjudicarse a que LEF-1 puede ser regulado de dos formas, la primera es dependiente de la interacción  $\beta$ -catenina/TCF, lo cual no concordaría con el aumento en la detección del transcrito y se esperaría una disminución y de manera independiente de dicha interacción en donde el ligando Wnt3 regula también la transcripción de este gen mediante la unión a su promotor (Filali, Cheng, Abbott, Leontiev, & Engelhardt, 2002). Por otra parte, se ha encontrado a PYGO2 posicionado en el promotor de LEF-1 (Sun et al., 2014). Esto, junto con la regulación de PYGO2 sobre otros los otros genes blancos evaluados, da pauta a pensar en dicho coactivador como un importante blanco terapéutico.

## 8. Conclusiones

La vía de señalización WNT- $\beta$ -catenina se encuentra hiperactivada en líneas celulares de CCR.

Los niveles de expresión de los activadores transcripcionales de la vía WNT- $\beta$ -catenina no mostraron cambios significativos *In vitro* e *In silico*.

Los genes blanco de la vía WNT- $\beta$ -catenina no mostraron cambios significativos en su expresión a nivel *In vitro*, pero si en los datos *In silico*.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de los activadores o blancos transcripcionales de la vía WNT- $\beta$ -catenina al inhibirla con el PNU-74654.

## 9. Perspectivas

Para validar parte de los resultados obtenidos, se debe demostrar la dependencia de los blancos a la actividad transcripcional de la vía WNT-  $\beta$ -catenina y si es que existe regulación de otros elementos en la expresión de los blancos seleccionados.

La inhibición de la vía WNT-  $\beta$ -catenina mediante el PNU-74654 en la línea SW620.

Un knock out de la expresión de los activadores transcripcionales permitiría ver la dependencia de uno o ambos en la expresión de los blancos.

La sobreexpresión de los activadores transfecando el marco abierto de lectura en alguna línea celular.

Ensayos funcionales al inhibir la actividad transcripcional de la vía WNT-  $\beta$ -catenina



## 10. Referencias

- Acuña Tovar M, R. B. E. (2013). Cáncer de Colon. Oncología. Guías diagnósticas. Hospital General de México. *Guías Diagnósticas. Hospital General de México.*, (Oncología), 1–4.
- Anastas, J. N., & Moon, R. T. (2013). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *13*(1), 11–26.  
<https://doi.org/10.1038/nrc3419>
- Andrews, P. G. P., He, Z., Tzenov, Y. R., Popadiuk, C., & Kao, K. R. (2013). Evidence of a novel role for Pygopus in rRNA transcription. *The Biochemical Journal*, *453*(1), 61–70. <https://doi.org/10.1042/BJ20121667>
- Andrews, P. G. P., & Kao, K. R. (2016). Wnt/ -catenin-dependent acetylation of Pygo2 by CBP/p300 histone acetyltransferase family members. *Biochemical Journal*, *473*(22), 4193–4203. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160590>
- Andrews, P. G. P., Lake, B. B., Popadiuk, C., & Kao, K. R. (2007). Requirement of Pygopus 2 in breast cancer. *International Journal of Oncology*, *30*(2), 357–363.
- Armaghany, T., Wilson, J. D., Chu, Q., & Mills, G. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer Research : GCR*, *5*(1), 19–27.  
Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22574233>  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3348713>
- Basu, S., Haase, G., & Ben-Ze'ev, A. (2016). Wnt signaling in cancer stem cells and colon cancer metastasis. *F1000Research*, *5*(0), 699.  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.7579.1>
- Brembeck, F. H., Wiese, M., Zatula, N., Grigoryan, T., Dai, Y., Fritzmann, J., & Birchmeier, W. (2011). BCL9-2 promotes early stages of intestinal tumor progression. *Gastroenterology*, *141*(4), 1359–1370.e3.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.039>

- Bryan T. MacDonald; Keiko Tamai and Xi He. (2010). NIH Public Access. *Developmental Biology*, 17(1), 9–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016.Wnt/>
- Chen, J., Luo, Q., Yuan, Y., Huang, X., Cai, W., Li, C., ... Li, B. (2010). Pygo2 Associates with MLL2 Histone Methyltransferase and GCN5 Histone Acetyltransferase Complexes To Augment Wnt Target Gene Expression and Breast Cancer Stem-Like Cell Expansion. *Molecular and Cellular Biology*, 30(24), 5621–5635. <https://doi.org/10.1128/MCB.00465-10>
- Choi, C. H. R., Bakir, I. Al, Hart, A. L., & Graham, T. A. (2017). Clonal evolution of colorectal cancer in IBD. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(4), 218–229. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.1>
- Clevers, H. (2006). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*, 127(3), 469–480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018>
- Clevers, H., & Battle, E. (2006). EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. *Cancer Research*, 66(1), 2–5. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3849>
- Colussi, D., Brandi, G., Bazzoli, F., & Ricciardiello, L. (2013). Molecular pathways involved in colorectal cancer: implications for disease behavior and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(8), 16365–16385.  
<https://doi.org/10.3390/ijms140816365>
- Czyzewska, J., Guzinska-Ustymowicz, K., Ustymowicz, M., Poczynicz, A., & Kemon, A. (2010). The expression of E-cadherin-catenin complex in patients with advanced gastric cancer: role in formation of metastasis. *Folia Histochem Cytobiol*, 48(1), 37–45. <https://doi.org/10.2478/v10042-010-0017-z>
- de Sousa e Melo, F., & Vermeulen, L. (2016). Wnt signaling in cancer stem cell biology. *Cancers*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/cancers8070060>
- El Zoghbi, M., & Cummings, L. C. (2016). New era of colorectal cancer screening. *World Journal of Gastrointestinal Endoscopy*, 8(5), 252.

<https://doi.org/10.4253/wjge.v8.i5.252>

- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Filali, M., Cheng, N., Abbott, D., Leontiev, V., & Engelhardt, J. F. (2002). Wnt-3A/ $\beta$ -catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 33398–33410. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107977200>
- Frank, S. a. (2007). History of Theories. *Dynamics of Cancer. Incidence, Inheritance, and Evolution*, 1–378. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>
- Gao, C., Wang, Y., Broaddus, R., Sun, L., & Xue, F. (2018). Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis : a review, 9(4), 5492–5508.
- Grady, W. M., & Pritchard, C. C. (2014). Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicologic Pathology*, 42(1), 124–139. <https://doi.org/10.1177/0192623313505155>
- Gu, B., Watanabe, K., & Dai, X. (2012). Pygo2 regulates histone gene expression and H3 K56 acetylation in human mammary epithelial cells © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute ., 79–87.
- Hahn, W. C., & Weinberg, R. A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2(5), 331–341. <https://doi.org/10.1038/nrc795>
- Herbst, A., Jurinovic, V., Krebs, S., Thieme, S. E., Blum, H., Göke, B., & Kolligs, F. T. (2014). Comprehensive analysis of  $\beta$ -catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *BMC Genomics*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-74>
- Hoffmeyer, K., Raggioli, A., Rudloff, S., Anton, R., Hierholzer, A., Del Valle, I., ... Kemler, R. (2012). Wnt/ -Catenin Signaling Regulates Telomerase in Stem

- Cells and Cancer Cells. *Science*, 336(6088), 1549–1554.  
<https://doi.org/10.1126/science.1218370>
- Jessen, S., Gu, B., & Dai, X. (2008). Pygopus and the Wnt signaling pathway: A diverse set of connections. *BioEssays*, 30(5), 448–456.  
<https://doi.org/10.1002/bies.20757>
- Kim, J. H., Park, S. Y., Jun, Y., Kim, J. Y., & Nam, J. S. (2017). Roles of Wnt target genes in the journey of cancer stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081604>
- Kitaeva, M. N., Grogan, L., Williams, J. P., Dimond, E., Nakahara, K., Hausner, P., ... Kirsch, I. R. (1997). Mutations in  $\beta$ -catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Research*, 57(20), 4478–4481.
- Klaus, A., & Birchmeier, W. (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(5), 387–398.  
<https://doi.org/10.1038/nrc2389>
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., ... Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 1–25. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Kuipers, E. J., Rösch, T., & Bretthauer, M. (2013). Colorectal cancer screening - Optimizing current strategies and new directions. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10(3), 130–142. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.12>
- Le, P. N., McDermott, J. D., & Jimeno, A. (2015). Targeting the Wnt pathway in human cancers: Therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. *Pharmacology and Therapeutics*, 146, 1–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.08.005>
- Leal, L. F., Bueno, A. C., Gomes, D. C., Abduch, R., de Castro, M., & Antonini, S. R. (2015). Inhibition of the Tcf/ $\beta$ -catenin complex increases apoptosis and impairs adrenocortical tumor cell proliferation and adrenal steroidogenesis.

- Oncotarget*, 6(40), 43016–43032. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5513>
- Li, C.-M., Kim, C. E., Margolin, A. A., Guo, M., Zhu, J., Mason, J. M., ... Tycko, B. (2004). CTNNB1 Mutations and Overexpression of Wnt/ $\beta$ -Catenin Target Genes in WT1-Mutant Wilms' Tumors. *The American Journal of Pathology*, 165(6), 1943–1953. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63246-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63246-4)
- Li, Q., Li, Y., Gu, B., Fang, L., Zhou, P., Bao, S., ... Dai, X. (2015). Akt phosphorylates Wnt coactivator and chromatin effector Pygo2 at serine 48 to antagonize its ubiquitin/proteasome-mediated degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 290(35), 21553–21567. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.639419>
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G., Tan, Y., ... Signaling, C. (2002). Control of  $\beta$ -Catenin Phosphorylation / Degradation by a Dual-Kinase Mechanism, 108, 837–847.
- López Castro, J. (2008). La Insuficiencia Cardíaca: Epidemiología Y Abordaje Diagnóstico. *IMED Pub Journals*, 4(5), 2–9. <https://doi.org/10.3823/013>
- Martin, G. S. (2003). Cell signaling and cancer. *Cancer Cell*, 4(3), 167–174. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00216-2](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00216-2)
- Masuda, M., Sawa, M., & Yamada, T. (2015). Therapeutic targets in the Wnt signaling pathway: Feasibility of targeting TNIK in colorectal cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, 156, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.10.009>
- Miller, T. C. R., Mieszczanek, J., Sánchez-Barrena, M. J., Rutherford, T. J., Fiedler, M., & Bienz, M. (2013). Evolutionary adaptation of the fly Pygo PHD finger toward recognizing histone H3 tail methylated at arginine 2. *Structure*, 21(12), 2208–2220. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.09.013>
- Mills, K. M., Szczerkowski, J. L. A., & Habib, S. J. (2017). Wnt ligand presentation and reception: from the stem cell niche to tissue engineering. *Open Biology*, 7(8), 170140. <https://doi.org/10.1098/rsob.170140>

- Mirabelli-Primdahl, L., Gryfe, R., Kim, H., Millar, A., Luceri, C., Dale, D., ... Redston, M. (1999).  $\beta$ -Catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Research*, *59*(14), 3346–3351.
- Morales-Perez, Claudio L. Noviello, C. M., & Hibbs, R. E. (2015). Alternative RNA splicing and cancer Sali. *Nature*, *4*(5), 547–566.  
<https://doi.org/10.1002/wrna.1178>.Alternative
- Pate, K. T., Stringari, C., Sprowl-Tanio, S., Wang, K., TeSlaa, T., Hoverter, N. P., ... Waterman, M. L. (2014). Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer. *The EMBO Journal*, *33*(13), 1454–1473. <https://doi.org/10.15252/embj.201488598>
- Peng, Y., Zhang, X., Feng, X., Fan, X., & Jin, Z. (2017). The crosstalk between microRNAs and the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in cancer. *Oncotarget*, *8*(8), 14089–14106. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12923>
- Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.*, *14*, 1837–1851. <https://doi.org/10.1101/gad.14.15.1837>
- Polakis, P. (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(5), 9. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008052>
- Pritchard, C. C., & Grady, W. M. (2011). Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*, *60*(1), 116–129.  
<https://doi.org/10.1136/gut.2009.206250>
- Raskov, H., Pommergaard, H. C., Burcharth, J., & Rosenberg, J. (2014). Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(48), 18151–18164. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i48.18151>
- Roarty, K., & Rosen, J. M. (2013). Pygopus 2: Tilting the Wnt-Notch balance in mammary epithelial lineage determination. *Breast Cancer Research*, *15*(6), 4–6. <https://doi.org/10.1186/bcr3592>
- Saito-diaz, K., Chen, T. W., Wang, X., Thorne, C. A., Wallace, H. A., Page-mccaw,

- A., & Lee, E. (2013). NIH Public Access, 31(1), 1–31.  
<https://doi.org/10.3109/08977194.2012.752737>.The
- Sánchez-tilló, E., Barrios, O. De, Siles, L., Cuatrecasas, M., Castells, A., & Postigo, A. (2011). ZEB1 to regulate tumor invasiveness.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1108977108/>-  
[/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1108977108](https://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1108977108)
- Sierra, J., Yoshida, T., Joazeiro, C. a, & Jones, K. a. (2006). The APC tumor suppressor counteracts beta-catenin activation and H 3 K 4 methylation at Wnt target genes. *Genes & Dev.*, 20(5), 586. <https://doi.org/10.1101/gad.1385806>
- Stamos, J. L., Weis, W. I., Chien, J., Whyte, J. L., Smith, A. A., & Jill, A. (2014). Secreted and Transmembrane Wnt.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015081>
- Sun, P., Watanabe, K., Fallahi, M., Lee, B., Afetian, M. E., Rheaume, C., ... Dai, X. (2014). Pygo2 regulates -catenin-induced activation of hair follicle stem/progenitor cells and skin hyperplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28), 10215–10220.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1311395111>
- Szaryńska, M., Olejniczak, A., Kobiela, J., Spychalski, P., & Kmiec, Z. (2017). Therapeutic strategies against cancer stem cells in human colorectal cancer (review). *Oncology Letters*, 14(6), 7653–7668.  
<https://doi.org/10.3892/ol.2017.7261>
- Takayama, T., Shiozaki, H., Doki, Y., Oka, H., Inoue, M., Yamamoto, M., ... Monden, M. (1998). Aberrant expression and phosphorylation of beta-catenin in human colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 77(4), 605–613.  
Retrieved from  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2149924&tool=pmc&rendertype=abstract>
- Talla, S. B., & Brembeck, F. H. (2016). The role of Pygo2 for Wnt/ss-catenin signaling activity during intestinal tumor initiation and progression. *Oncotarget*,

7(49), 80612–80632. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13016>

Tan, X., Apte, U., Micsenyi, A., Kotsagrellos, E., Luo, J. H., Ranganathan, S., ... Monga, S. P. S. (2005). Epidermal growth factor receptor: A novel target of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in liver. *Gastroenterology*, *129*(1), 285–302. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.04.013>

Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*, *138*(6), 2101–2114. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>

Townsley, F. M., Thompson, B., & Bienz, M. (2004). Pygopus Residues Required for its Binding to Legless Are Critical for Transcription and Development. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(7), 5177–5183. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309722200>

Valenta, T., Hausmann, G., & Basler, K. (2012). The many faces and functions of  $\beta$ -catenin. *EMBO Journal*, *31*(12), 2714–2736. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.150>

Wang, H., Fu, J., Xu, D., Xu, W., Wang, S., Zhang, L., & Xiang, Y. (2016). Downregulation of Pygopus 2 inhibits vascular mimicry in glioma U251 cells by suppressing the canonical Wnt signaling pathway. *Oncology Letters*, *11*(1), 678–684. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3917>

Wodarz, D., & Zuber, A. G. (2015). Cancer: Risk factors and random chances. *Nature*, *517*(7536), 563–564. <https://doi.org/10.1038/517563a>

Yang, K., Wang, X., Zhang, H., Wang, Z., Nan, G., Zhang, F., ... Bi, Y. (2016). tumorigenesis : Implications in targeted cancer therapies, *96*(2), 116–136. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.144>.The

Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, *36*(11), 1461–1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>

Zhang, S., Li, J., He, F., & Wang, X. M. (2015). Abnormal nuclear expression of pygopus-2 in human primary hepatocellular carcinoma correlates with a poor



prognosis. *Histopathology*, 67(2), 176–184. <https://doi.org/10.1111/his.12637>

Zhang, S., Li, J., Liu, P., Xu, J., Zhao, W., Xie, C., ... Wang, X. (2015). Pygopus-2 promotes invasion and metastasis of hepatic carcinoma cell by decreasing E-cadherin expression. *Oncotarget*, 6(13), 11074–11086. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3570>

Zhang, Z. M., Wu, J. F., Luo, Q. C., Liu, Q. F., Wu, Q. W., Ye, G. D., ... Li, B. A. (2016). Pygo2 activates MDR1 expression and mediates chemoresistance in breast cancer via the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Oncogene*, 35(36), 4787–4797. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.10>

Zhou, S. Y., Xu, M. L., Wang, S. Q., Zhang, F., Wang, L., & Wang, H. Q. (2014). Overexpression of Pygopus-2 is required for canonical Wnt activation in human lung cancer. *Oncology Letters*, 7(1), 233–238. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1691>

