



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

Estudio de la participación de la ruta Wnt no canónica en el mantenimiento del fenotipo maligno de células de colon en cultivo

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

M. en C. Eric Flores Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Martha Robles Flores  
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Adolfo García Sáinz  
Instituto de Fisiología Celular, UNAM  
Dr. Jesús Chimal Monroy  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Ciudad de México, Febrero de 2023.



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.

# ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA RUTA WNT NO CANÓNICA EN EL MANTENIMIENTO DEL FENOTIPO MALIGNO DE CÉLULAS DE COLON EN CULTIVO

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de doctorado se realizó bajo la dirección de la Dra. Martha Robles Flores en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| Dra. Martha Robles Flores     | Facultad de Medicina, UNAM                       |
| Dr. Jesús Adolfo García Sáinz | Instituto de Fisiología Celular, UNAM            |
| Dr. Jesús Chimal Monroy       | Instituto de Investigaciones Biomédicas,<br>UNAM |

Se agradece la asesoría técnica de la Dra. Cristina Castañeda Patlán, la Dra. Dora María Velázquez y la Dra. María Teresa Romero Ávila por su apoyo en la realización de los experimentos que fundamentan esta tesis.

El proyecto fue apoyado parcialmente por donativos de PAPIIT-DGAPA-UNAM (IN215514 y IN225717) y por CONACYT (FOSSIS 2017-289600).

Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT con número de becario 215174, además de apoyo económico para la asistencia a Congresos Nacionales e Internacionales por parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP).

El Jurado de Examen de Doctorado estuvo constituido por:

Presidente: Velasco Velázquez Marco Antonio

Vocal: López casillas Fernando

Vocal: Ortiz Sánchez Elizabeth

Vocal: González Espinosa Claudia

Secretario: Covarrubias Robles Luis

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM, por darme lo que tengo y hacerme lo que soy.

A la doctora Martha Robles Flores, cuya paciencia y liderazgo contribuyeron definitivamente a la realización de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio, especialmente a la Dra. Cristina Castañeda Patlán, que generosamente dejó muchas veces de hacer lo suyo por ayudarme con este trabajo.

A mis tías Bertha, Fidelia, Gabriela, María Luisa y a mi tío Amado, que me arroparon y alentaron durante esta odisea.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| Índice de figuras  | 6  |
| Abreviaturas   | 7  |
| Resumen  | 10 |
| Abstract   | 13 |
| 1. Introducción  | 15 |
| 1.1.Cáncer Colorrectal   | 15 |
| 1.2.El epitelio intestinal   | 16 |
| 1.3.Señalización Wnt canónica  | 18 |
| 1.4.Señalización Wnt no canónica   | 19 |
| 1.5.Receptores Frizzled  | 23 |
| 1.6.Wnt5a  | 23 |
| 2. Antecedentes  | 25 |
| 3. Planteamiento del problema  | 27 |
| 4. Hipótesis   | 27 |
| 5. Objetivo General  | 27 |
| 6. Objetivos Específicos   | 27 |
| 7. Materiales y Métodos  | 29 |
| 7.1. Reactivos y Anticuerpos   | 29 |
| 7.2.Plásmidos  | 29 |
| 7.3.Cultivo de Células   | 30 |
| 7.4.Análisis FACS  | 31 |
| 7.5.Análisis de expresión genética mediante PCR cuantitativa en tiempo real  | 31 |
| 7.6.Ensayo de gen reportero  | 32 |
| 7.7.Determinación de la concentración de calcio intracelular   | 32 |
| 7.8.Determinación de fosfato de inositol   | 33 |
| 7.9.Ensayo de migración por cierre de herida   | 33 |
| 7.10. Western Blot   | 34 |
| 7.11. Análisis Estadístico   | 34 |
| 8. Resultados  | 35 |
| 8.1.EL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR WNT MUESTRA DIFERENCIAS ENTRE LAS CÉLULAS DEL COLON NO MALIGNAS Y MALIGNAS   | 35 |
| 8.2.Wnt3a PERO NO Wnt5a ESTIMULA LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE $\beta$ -CATENINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON RKO | 38 |
| 8.3.TANTO Wnt5a COMO Wnt3a ESTIMULAN LA MOVILIZACIÓN INTRACELULAR DE CALCIO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON   | 40 |
| 8.4.TANTO Wnt-5a COMO Wnt3a ACTIVAN PLC EN CÉLULAS RKO   | 42 |
| 8.5.Wnt-5a ACTIVA PLC VÍA UNA PROTEÍNA G SENSIBLE A LA TOXINA PERTUSSIS EN CÉLULAS RKO                               | 44 |

|   |    |
|---|----|
| 8.6.LA FUNCIÓN DE TIROSINA CINASA DE ROR2 NO ES NECESARIA PARA ACTIVAR PLC EN LAS CÉLULAS RKO, PERO ES NECESARIA PARA ANTAGONIZAR LA SEÑALIZACIÓN CANÓNICA WNT INDUCIDA POR WNT3A | 46 |
| 8.7.TANTO WNT5A COMO WNT3A INDUCEN HIPERFOSFORILACIÓN Y ESTABILIZACIÓN SIMULTÁNEAS DE DVL1, DVL2 Y DVL3   | 49 |
| 8.8.TANTO WNT5A COMO WNT3A PROMUEVEN LA MIGRACIÓN CELULAR DEPENDIENTE DE PLC EN RKO Y EN CÉLULAS DE CANCER DE COLON SW480   | 52 |
| 9. Discusión de los resultados  | 55 |
| 10. Conclusiones  | 59 |
| 11. Perspectivas  | 60 |
| 12. Referencias bibliográficas  | 61 |
| 13. Bibliografía  | 69 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Datos estimados de incidencia de las principales neoplasias malignas en México para el 2020  | 16 |
| Figura 2. Anatomía del intestino.  | 18 |
| Figura 3. Principales vías de señalización Wnt   | 21 |
| Figura 4. Imágenes de microscopía confocal de las células RKO.   | 25 |
| Figura 5. Actividad transcripcional mediada por $\beta$ -catenina en las células RKO.  | 26 |
| Figura 6. Perfil de expresión de los receptores Wnt en células RKO o SW480 de cáncer de colon en comparación con células de colon 112CoN no malignas.    | 36 |
| Figura 7. Inducción por Wnt de la actividad transcripcional mediada por $\beta$ -catenina en células RKO y SW480.  | 39 |
| Figura 8. Wnt5a, así como como Wnt3a movilizan $Ca^{2+}$ en células de cáncer de colon.  | 41 |
| Figura 9. Wnt5a y Wnt3a activan a la PLC en las células RKO.   | 43 |
| Figura 10. La señalización de Wnt5a es inhibida por PTx, pero la de Wnt3a no.  | 45 |
| Figura 11. No se requiere la actividad de tirosina cinasa de Ror2 para que Wnt5a induzca la movilización de $Ca^{2+}$ .                                  | 48 |
| Figura 12. DVL1, 2 y 3 se fosforilan y estabilizan en respuesta a los ligados Wnt5a y Wnt3a.   | 51 |
| Figura 13. El ligando canónico Wnt3a y el ligando no canónico Wnt5a promueven la migración dependiente de PLC en células de cáncer de colon RKO o SW480. | 53 |

## ABREVIATURAS

| Abreviatura      | Español   | Inglés  |
|------------------|---|---|
| <b>112CoN</b>    | Línea celular 112CoN.   | 112CoN cell line.   |
| <b>ADN</b>       | Ácido desoxirribonucleico   | Deoxyribonucleic acid   |
| <b>ADNc</b>      | ADN complementario  | Complementary DNA   |
| <b>ANOVA</b>     | Análisis de varianza  | Analysis of variance  |
| <b>APC</b>       | Poliposis adenomatosa de colon  | Adenomatous polyposis coli  |
| <b>ARN</b>       | Ácido Ribonucleico  | Ribonucleic acid  |
| <b>ATCC</b>      | Colección Americana de Cultivos Tipo  | American Type Culture Collection                                      |
| <b>Bcl-9</b>     | Proteína 9 de leucemia linfocítica crónica/linfoma de células B                   | B-cell Chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 9 protein                |
| <b>Beta-TrCP</b> | Proteína que contiene repeticiones de transducina beta                            | Beta-transducin repeat-containing protein                             |
| <b>BRAF</b>      | Homólogo B1 del oncogén viral del sarcoma murino v-raf                            | v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1                        |
| <b>BSA</b>       | Albúmina de suero bovino  | Bovine serum albumin  |
| <b>CCR</b>       | Cáncer colorrectal  | Colorectal cancer   |
| <b>CD44</b>      | Proteína del grupo de diferenciación 44   | Protein of Cluster of Differentiation 44                              |
| <b>CDC42</b>     | Proteína de control de la división celular 42                                     | Cell division control protein 42                                      |
| <b>c-Jun</b>     | Proteína 17 del virus del sarcoma aviar (ASV17), del japonés "ju-nana (17)"       | Avian sarcoma virus protein 17 (ASV17), from Japanese "ju-nana (17)"  |
| <b>CK1</b>       | Cinasa 1 de la caseína  | Casein kinase 1   |
| <b>CMV-GFP</b>   | Proteína verde fluorescente - Citomegalovirus                                     | Cytomegalovirus - Green fluorescent protein                           |
| <b>DMEM</b>      | Medio Eagle modificado de Dulbecco  | Dulbecco's Modified Eagle Medium                                      |
| <b>Dvl</b>       | Proteína Dishiveled   | Dishiveled protein  |
| <b>EDTA</b>      | Ácido etilenodiaminotetracético   | Ethylenediaminetetraacetic acid                                       |
| <b>EGTA</b>      | Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetracético                     | Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid     |
| <b>FACS</b>      | Clasificación celular activada por fluorescencia                                  | Fluorescence-activated cell sorting                                   |
| <b>FBS</b>       | Suero bovino fetal  | Fetal Bovine Serum  |
| <b>FGFR</b>      | Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos                                | Fibroblast growth factor Receptor                                     |
| <b>FITC</b>      | Isotiocianato de fluoresceína   | Fluorescein isothiocyanate  |
| <b>FURA-2</b>    | Segundo miembro de una familia de indicadores de calcio que contienen benzofurano | Second member of a family of calcium indicators containing benzofuran |

|                                |  |   |
|--------------------------------|--|---|
| <b>Fzd</b>                     | Receptor Frizzled  | Frizzled Receptor   |
| <b>G3BP2</b>                   | Proteína 2 de unión a proteína activadora de Ras GTPasa  | Ras GTPase-activating protein-binding protein 2                                   |
| <b>GPCR</b>                    | Receptor acoplado a proteína G   | G protein-coupled receptor  |
| <b>GSK3</b>                    | Glucógeno sintasa quinasa 3  | Glycogen synthase kinase 3  |
| <b>HEPES</b>                   | Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico   | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid                                |
| <b>INMEGEN</b>                 | Instituto Nacional de Medicina Genómica  | National Institute of Genomic Medicine  |
| <b>JNK</b>                     | Cinasa del extremo N-terminal de c-Jun   | c-Jun N-Terminal Kinase   |
| <b>KRAS</b>                    | Protooncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten  | Kirsten Rat Sarcoma Viral Proto-Oncogene  |
| <b>LEF</b>                     | Factor potenciador linfoide  | Lymphoid enhancer factor  |
| <b>Lgs</b>                     | Proteína Legless   | Legless protein   |
| <b>LRP</b>                     | Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad                         | Low-density lipoprotein receptor-related protein                                  |
| <b>MAP3K7</b>                  | Proteína quinasa quinasa quinasa 7 activada por mitógeno                                       | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7                                  |
| <b>Myc</b>                     | Factor de transcripción de oncogenes de mielocitomatosis                                       | Myelocytomatosis oncogenes transcription factor                                   |
| <b>NFAT</b>                    | Factor nuclear de células T activadas  | Nuclear Factor of Activated T-Cells   |
| <b>NFkB</b>                    | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas             | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells                    |
| <b>NLK</b>                     | Cinasa tipo NEMO   | NEMO like kinase  |
| <b>NP40</b>                    | Amortiguador de lisis NP40   | NP40 Lysis Buffer   |
| <b>PAGE</b>                    | Electroforesis en gel de poliacrilamida  | Polyacrylamide gel electrophoresis  |
| <b>PBS</b>                     | Solución salina amortiguada con fosfato  | Phosphate-buffered saline   |
| <b>PCP</b>                     | Polaridad celular plana  | Planar Cell Polarity  |
| <b>PCR</b>                     | Reacción en cadena de la polimerasa  | Polymerase chain reaction   |
| <b>pEF1<math>\alpha</math></b> | Plásmido que contiene al promotor del factor de elongación 1 alfa                              | Plasmid containing the elongation factor 1 alpha promoter                         |
| <b>pFOP</b>                    | Plásmido reportero del factor de células T con sitios de unión a Tcf mutados y no funcionales. | T-cell factor reporter plasmid with Tcf-binding sites mutated and non-functional. |
| <b>PKC</b>                     | Proteína cinasa C  | Protein Kinase C  |
| <b>PLC</b>                     | Fosfolipasa C  | Phospholipase C   |
| <b>PP2A</b>                    | Serina/treonina proteína fosfatasa 2A  | Serine/threonine protein phosphatase 2A   |
| <b>p-RL</b>                    | Plásmido repotero Renilla Luciferasa   | Renilla luciferase reporter vector  |

|               |   |   |
|---------------|---|---|
| <b>pTOP</b>   | Plásmido reportero del factor de células T                    | T-cell factor reporter plasmid                  |
| <b>PTx</b>    | Toxina de <i>Pertussis</i>                                    | <i>Pertussis</i> toxin                          |
| <b>q-PCR</b>  | PCR de transcripción inversa cuantitativa                     | Quantitative Reverse Transcription PCR          |
| <b>Rab4</b>   | Proteína relacionada con Ras Rab-4A                           | Ras-related protein Rab-4A                      |
| <b>Rac</b>    | Sustrato de toxina botulínica C3 relacionada con Ras          | Ras-related C3 botulinum toxin substrate        |
| <b>RIPA</b>   | Amortiguador de ensayo de radioinmunoprecipitación            | Radioimmunoprecipitation assay buffer           |
| <b>RKO</b>    | Línea celular RKO   | RKO cell line                                   |
| <b>ROCK</b>   | Proteína quinasa asociada a Rho                               | Rho-associated protein kinase                   |
| <b>Ror</b>    | Receptor tirosina quinasa tipo receptor huérfano              | Receptor tyrosine kinase like orphan receptor   |
| <b>RT-PCR</b> | Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa | Reverse transcription polymerase chain reaction |
| <b>Ryc</b>    | Receptor tipo tirosina quinasa                                | Receptor Like Tyrosine Kinase                   |
| <b>SDS</b>    | Dodecil sulfato de sodio                                      | Sodium dodecyl sulfate                          |
| <b>SEM</b>    | Error estandar de la media                                    | Standard error of the mean                      |
| <b>SNAI1</b>  | Represor transcripcional 1 de la familia SNAI                 | Snail Family Transcriptional Repressor 1        |
| <b>STK11</b>  | Serina/treonina quinasa 11                                    | Serine/threonine kinase 11                      |
| <b>SW480</b>  | Línea celular SW480   | SW480 cell line                                 |
| <b>TCF</b>    | Factor de células T   | T-cell factor                                   |
| <b>TP53</b>   | Gen de la proteína tumoral p53                                | Tumor protein p53 gene                          |
| <b>UPL</b>    | Biblioteca de sonda universal                                 | Universal Probe Library                         |
| <b>Wnt</b>    | Proteína de la familia Wnt                                    | Wnt protein family                              |
| <b>YAP1</b>   | Proteína asociada a Yes 1                                     | Yes-associated protein 1                        |

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar la vía de señalización no canónica Wnt en el cáncer de colon. Este tipo de cáncer ocupa el tercer lugar de causas de muerte por tumores malignos en México y en el mundo<sup>1</sup>.

Las células epiteliales del colon residen en uno de los ambientes de mayor estrés mecánico y químico de nuestro organismo. El epitelio colónico está en continuo proceso de renovación para reponer las células perdidas, y lo hace a partir de células troncales. Esta elevada tasa de renovación (de 4 días en promedio) lo hace más susceptible a la transformación maligna que otros tejidos. La homeostasis de este epitelio está basada en el balance preciso entre proliferación celular, diferenciación y apoptosis. La evidencia indica que la ruta de señalización Wnt es la fuerza dominante en el control de la capacidad de auto renovación de células troncales. La evidencia también apunta a suponer que cuando la señalización Wnt está alterada se produce cáncer, ya que: estudios moleculares han demostrado mutaciones activadoras de la vía Wnt aproximadamente en el 90% de los casos.

Existen varios ligandos Wnt que activan diversas rutas de señalización río abajo. Las vías de señalización Wnt se clasifican en dos: 1) ruta canónica, que es la que produce respuestas celulares mediadas por la acumulación y actividad transcripcional de la proteína beta-catenina, y 2) las rutas no canónicas, que son aquellas rutas Wnt que no dependen de la acumulación ni de la actividad transcripcional de beta-catenina. La activación aberrante de la señalización canónica Wnt/ $\beta$ -catenina es un sello distintivo de la mayoría de los cánceres de colon<sup>2</sup>. Por otro lado, aunque se ha observado incremento en los niveles de los ligandos no canónicos como Wnt5a, y la activación de componentes no canónicos de Wnt como ROR2<sup>3</sup>, proteína cinasa C (PKC) y cinasa del extremo N-terminal de c-Jun (JNK) en líneas celulares de cáncer de colon metastásico<sup>4</sup>, el papel de la señalización Wnt *no canónica* en la carcinogénesis y la progresión del cáncer colorrectal (CCR) aún se desconoce. Los mecanismos subyacentes que involucran a los diez diferentes receptores Frizzled (FZD) de mamíferos, sus 19 ligandos Wnt y los eventos de iniciación de señales en la membrana aún no están claros. Además, aunque se ha demostrado que el reclutamiento selectivo y la participación de co-receptores influyen en el resultado de la señalización, varios aspectos como el grado de especificidad de unión de Wnt / FZD, la selectividad de acoplamiento de

proteínas G y la discriminación de los elementos efectores activados por FZD / co-receptores para las vías de señalización río abajo siguen siendo desconocidos<sup>5,6</sup>.

Hay varias vías de señalización que son independientes de beta-catenina, entre ellas las más conocidas son las vías Wnt/Ca<sup>2+</sup> y la vía de polaridad celular plana (PCP). La activación o inhibición aberrante de la señalización de Wnt no canónica es crucial en la progresión del cáncer, ejerciendo efectos oncogénicos y supresores de tumores. Se ha demostrado que también la señalización Wnt no canónica regula múltiples funciones celulares, incluida la proliferación, diferenciación, adhesión, polaridad, motilidad y migración. Estudios recientes muestran además una participación importante de la vía Wnt no canónica en la regulación del metabolismo, la invasión y metástasis de las células cancerosas.

Para caracterizar la vía Wnt no canónica en células de cáncer de colon utilizamos el ligando no canónico Wnt5a en comparación con Wnt3a, un ligando canónico activador de  $\beta$ -catenina. El análisis del perfil de expresión de los receptores Wnt en líneas celulares de cáncer de colon mostró un claro aumento tanto en el nivel de expresión como en la variedad de tipos de receptores Frizzled expresados en células de cáncer de colon en comparación con las células no malignas. Encontramos que: 1) Wnt5a activa la vía de señalización no canónica Wnt/Ca<sup>2+</sup> en células malignas de colon; 2) Wnt5a induce la hiperfosforilación de Dvl1, Dvl2 y Dvl3; 3) este ligando induce la movilización de Ca<sup>2+</sup> como resultado de la activación de la fosfolipasa C (PLC) a través de una proteína G sensible a la toxina *pertussis*; y finalmente, 4) Wnt5a también induce la migración celular dependiente de PLC. También encontramos que, si bien la actividad de tirosina cinasa del correceptor Ror2 no es necesaria para la movilización de Ca<sup>2+</sup> inducida por Wnt5a, es necesaria para los efectos inhibidores de Wnt5a sobre la actividad transcripcional dependiente de  $\beta$ -catenina. Inesperadamente, encontramos que, aunque el ligando canónico Wnt3a estimula la actividad transcripcional dependiente de  $\beta$ -catenina (ruta canónica), también activa simultáneamente PLC, promueve la movilización de Ca<sup>2+</sup> e induce la migración celular dependiente de Rho-cinasa y PLC (ruta no canónica). Esto es muy interesante, porque inicialmente se consideraba que un ligando sólo activaba la ruta canónica o la no canónica. Recientemente se ha probado que un ligando canónico o uno no canónico pueden, en ciertas circunstancias, no activar su vía típica sino la otra. Nuestros datos van más allá, porque indican que un ligando Wnt puede activar al mismo tiempo las

llamadas vías Wnt canónicas y no canónicas induciendo la formación de complejas redes de señalización para integrar ambas vías en las células de cáncer de colon.

En conclusión, demostramos que la vía no canónica Wnt5a/Ca<sup>2+</sup> está activa y es funcional en el cáncer de colon; y que un ligando wnt puede activar simultáneamente una vía canónica y una vía no canónica.

## ABSTRACT

The present work aimed to characterize the non-canonical Wnt signaling in colon cancer. This type of cancer is the third leading cause of death from malignant tumors in Mexico and worldwide<sup>1</sup>.

Colon epithelial cells reside in one of the environments with the greatest mechanical and chemical stress in our body. The colonic epithelium is in a continuous process of renewal from stem cells. This high turnover rate (4 days on average) makes it susceptible to malignant transformation. The homeostasis of this epithelium is based on the precise balance between cell proliferation, differentiation and apoptosis. Current evidence indicates that the Wnt signaling pathway is the dominant force in controlling the self-renewal capacity of stem cells. Current evidence also suggests that when Wnt signaling is altered, cancer occurs: molecular studies have shown activating mutations of the Wnt pathway in approximately 90% of cases. Aberrant activation of canonical Wnt /  $\beta$ -catenin signaling is a hallmark of most colon cancers<sup>2</sup>. On the other hand, although an increase in the levels of non-canonical ligands such as Wnt5a has been observed, and the activation of non-canonical components of Wnt such as ROR2<sup>3</sup>, protein kinase C (PKC) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in metastatic colon cancer cell lines<sup>4</sup>, the implication of non-canonical Wnt signaling in colorectal cancer (CRC) carcinogenesis and progression is still unknown. The underlying mechanisms involving the ten different mammalian Frizzled receptors (FZDs), their 19 Wnt ligands, and membrane signal initiation events remain unclear. Furthermore, although selective recruitment and the participation of co-receptors have been shown to influence the outcome of signaling, several aspects such as the degree of binding specificity of Wnt / FZD, selectivity of G-protein coupling and discrimination of activated FZD / co-receptors for downstream signaling pathways remain unknown<sup>5,6</sup>.

Aberrant activation or inhibition of non-canonical Wnt signaling is crucial in cancer progression, exerting oncogenic and tumor suppressor effects. Previous research has shown that also non-canonical Wnt signaling regulates multiple cellular functions, including proliferation, differentiation, adhesion, polarity, motility, and migration. Recent studies show the participation of non-canonical Wnt in the regulation of metabolism, invasion and metastasis of cancer cells.

This work aimed to characterize the non-canonical Wnt signal transduction pathway in colon

cancer cells. To do this, we used the prototype non-canonical ligand, Wnt5a, compared to Wnt3a, the prototype for a  $\beta$ -catenin activating canonical ligand. Analysis of the expression profile of Wnt receptors in colon cancer cell lines showed a clear increase both in the level of expression and in the variety of types of Frizzled receptors expressed in colon cancer cells compared to non-malignant cells. We found that: 1) Wnt5a activates a typical non-canonical Wnt /  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway in malignant colon cells, 2) inducing hyperphosphorylation of Dvl1, Dvl2 and Dvl3, 3) promoting  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization because of activation of phospholipase C (PLC) through a pertussis toxin-sensitive G protein, and 4) induces PLC-dependent cell migration. We also found that while the tyrosine kinase activity of the Ror2 coreceptor is not required for Wnt5a-induced  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization, it is required for the inhibitory effects of Wnt5a on  $\beta$ -catenin-dependent transcriptional activity. Unexpectedly, we found that, although the prototype Wnt3a canonical ligand was unique in stimulating  $\beta$ -catenin-dependent transcriptional activity, it also simultaneously activated PLC, promoted  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization, and induced Rho-kinase- and PLC-dependent cell migration. Our data therefore indicate that a Wnt ligand can activate the so-called canonical and non-canonical Wnt pathways at the same time, inducing the formation of complex signaling networks to integrate both pathways in colon cancer cells.

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Cáncer colorrectal**

El cáncer es un padecimiento con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, con orígenes y desarrollo diversos. Sin embargo, todos los tipos de cáncer involucran la multiplicación descontrolada de células anormales, las cuales se pueden extender más allá de sus nichos habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos en un proceso denominado “metástasis”. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer<sup>6</sup>.

Como se ve en la Figura 1, los tumores malignos se han ubicado entre las tres principales causas de muerte en México<sup>6-10</sup> en las últimas décadas. En el mundo ha crecido la incidencia de cáncer hasta ubicarse dentro de los primeros tres lugares<sup>1</sup>. Los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia en los hombres son: de próstata (21,7%), pulmón (9,5%), y colorrectal (8,0%). En las mujeres, los cánceres más frecuentes son: de mama (25,2%), pulmón (8,5%), y colorrectal (8,2%). De acuerdo con la tendencia actual, se prevé que para el 2030, el número de personas recién diagnosticadas con cáncer aumentará en 32% y ascenderá a más de 5 millones de personas por año en el continente americano, debido a que la población está envejeciendo, los estilos de vida están cambiando y a la exposición a factores de riesgo va en aumento<sup>10</sup>.

Entre 1922 y 2006 la proporción de muertes por cáncer en México pasó de 0.6 a 12.9% de las defunciones totales ocurridas por todas las causas y en toda la población<sup>11</sup>. El grupo más afectado corresponde al de las mujeres de entre 30 y 64 años, con un porcentaje de muertes por tumores malignos del 25.2% en 2008<sup>7,9</sup>. En 2019 se registraron 88 683 defunciones por tumores malignos, que representan 12% de las defunciones totales. En México en 2020, dentro de las neoplasias malignas, el cáncer colorrectal ocupó el segundo lugar en incidencia en hombres (8.9 %) y el cuarto lugar en mujeres (6.6 %). El cáncer colorrectal es el cuarto cáncer más común en el continente americano. Cada año se producen en la región más de 240.000 nuevos casos y aproximadamente 112.000 muertes debidas a esta enfermedad. Canadá, Uruguay y Barbados presentan las tasas de incidencia más altas mientras que los países de América Central presentan las más bajas. Si no se toman acciones al respecto, se prevé que, para el año 2030, la incidencia de cáncer colorrectal aumente en un 60 %. Por

estas razones, es importante continuar con el estudio de esta enfermedad, aportando datos que ayuden a esclarecer sus causas y establecer terapias efectivas<sup>10</sup>.

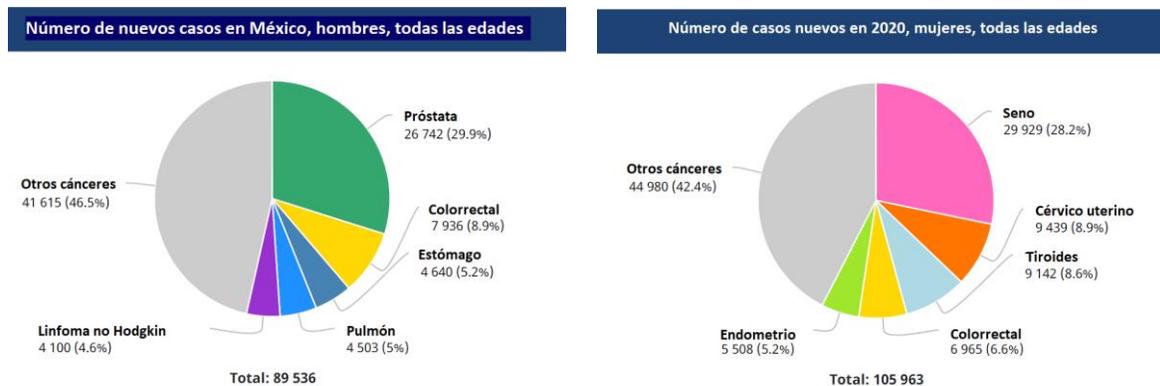


Figura 1. Datos estimados de incidencia de las principales neoplasias malignas en México para el 2020. Fuente: GLOBOCAN 2020<sup>1</sup>

## 1.2 El epitelio intestinal.

El intestino forma parte del aparato digestivo, el cual absorbe y después suministra al organismo un aporte continuo de agua, electrolitos y nutrientes. Las funciones del intestino comprenden el tránsito de los alimentos a lo largo de todo el tubo digestivo; la secreción de los jugos digestivos y la digestión de los alimentos; la absorción de los productos digeridos, el agua y los distintos electrolitos. Estas funciones, así como la circulación de la sangre a través de los órganos gastrointestinales para transportar las sustancias absorbidas son controladas, en parte por los sistemas nervioso y endócrino<sup>12</sup>.

El epitelio intestinal se caracteriza por su alta tasa de autorrenovación, lo que lo hace susceptible a la transformación maligna y además presenta los paradigmas de la biología de las células troncales, establecida para otros tejidos con gran capacidad de autorrenovación<sup>13-16</sup>. Debido a que la homeostasis del epitelio intestinal se fundamenta en el balance preciso entre proliferación celular, diferenciación y apoptosis, representa un atractivo modelo experimental para el estudio integrado de la homeostasis de estos procesos celulares. Este epitelio, como la epidermis, constituye una barrera entre el cuerpo y el exterior. A nivel microestructural, mientras la epidermis está constituida de múltiples capas celulares, el epitelio intestinal consiste en una sola capa de células epiteliales. Estas células absorben el

líquido y electrolitos resultante de los alimentos aprovechados mientras mantienen el quimo indigerible y la microflora asociada dentro del lumen<sup>13</sup>.

La capa epitelial intestinal posee una topología única; está formada por una estructura bidimensional plegada en valles (criptas) y crestas (vellosidades). En la base de las criptas proliferativas residen las células troncales, las cuales por división asimétrica dan origen a células hijas, una de las cuales permanece como troncal y la otra comienza el programa de diferenciación llamada célula progenitora. La progenie de esta última, después de experimentar dos o tres ciclos de división, va migrando hacia arriba para diferenciarse al alcanzar las crestas en células absortivas (enterocitos) o en células secretoras de hormonas o de mucus<sup>13-16</sup>. En estas crestas, finalmente, degeneran las células a través de apoptosis y son desprendidas al lumen del intestino para su expulsión, este proceso ocurre en un plazo promedio de 5 días<sup>13</sup> (Fig. 1).

Dos linajes principales de células diferenciadas se observan dentro del epitelio intestinal: el linaje absortivo o enterocitos y el linaje secretor. Éste último comprende a las células caliciformes, al linaje entero-endócrino, y en el intestino delgado también a las células Paneth. Los enterocitos son las células más abundantes en el intestino, secretan hidrolasas y absorben nutrientes. Las células caliciformes secretan moco protector e incrementan en número a través del duodeno al colon. Las células del linaje enteroendócrino secretan hormonas (serotonina, sustancia P, secretina) y las células Paneth, que sólo se encuentran en el intestino delgado, secretan agentes antimicrobianos como criptidinas, defensinas y lisozima para controlar el contenido microbiano en el intestino delgado<sup>13,14</sup> (Fig. 2).

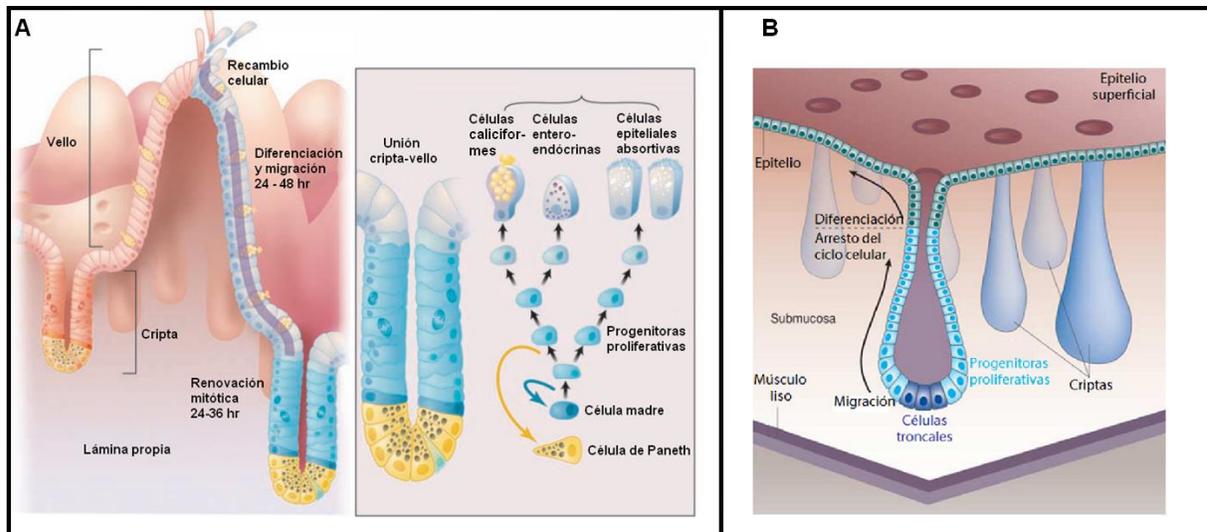


Figura. 2. Anatomía del intestino. A) El epitelio del intestino delgado está formado por criptas y vellosidades. B) En el colon no hay células de Paneth, ni crestas prominentes, la superficie es lisa, con criptas mucho más profundas que en el intestino delgado. Las células troncales se encuentran en la base de cripta, mientras que las células proliferativas ocupan dos tercios de la cripta y las células diferenciadas ocupan el resto de la cripta y la superficie plana del epitelio. Modificado<sup>13,14</sup> de Ratdke *et al.* 2005 y Sancho *et al.* 2004.

Durante el estudio del complejo proceso de renovación del epitelio intestinal, distintas investigaciones han mostrado que la vía de señalización Wnt está alterada en aproximadamente 90% de los CCR y se ha demostrado que la señalización Wnt es crucial para la homeostasis del epitelio colónico<sup>17-19</sup>.

### 1.3 Señalización Wnt canónica

La vía de señalización Wnt está implicada en una variedad de procesos celulares tales como la proliferación celular, diferenciación, apoptosis y movilidad celular<sup>19</sup>. En mamíferos se han descrito diecinueve diferentes genes WNT, los cuales codifican para un grupo altamente conservado de glucoproteínas de señalización ricas en cisteína, que se modifican por palmitoilación en un residuo conservado de cisteína<sup>20</sup>. Tradicionalmente, las proteínas Wnt se clasifican según su habilidad para activar la llamada vía canónica, la cual se caracteriza

por regular los niveles citoplásmicos y localización nuclear del coactivador transcripcional  $\beta$ -catenina (Figura 3, panel a). La señalización canónica inicia cuando el ligando Wnt se une al complejo de receptores formado por el receptor de siete dominios transmembranales de la familia “Frizzled” y la proteína relacionada con lipoproteínas de baja densidad (LRP 5/6). En ausencia de ligandos Wnt, la  $\beta$ -catenina es degradada por un complejo de proteínas el cual incluye a Axina, el supresor tumoral APC, la proteína fosfatasa 2A (PP2A) y dos cinasas: la glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) y la caseína cinasa 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ). La fosforilación secuencial de  $\beta$ -catenina dentro de este complejo, primero por CK1 $\alpha$  y posteriormente por GSK3 $\beta$ , provoca que ésta sea ubiquitinada por  $\beta$ -TrCP del complejo E3 ubiquitina ligasa, y posteriormente degradada vía el proteosoma<sup>17</sup>. Cuando el ligando Wnt interacciona con el complejo formado por el receptor Frizzled y el co-receptor LRP-5/6, el complejo de degradación es reclutado hacia la membrana plasmática mediante la proteína de andamiaje Dishvelled (Dvl), esto provoca la desestabilización e inactivación del complejo de degradación, provocando la acumulación de  $\beta$ -catenina en el citosol. Esta acumulación citoplásmica de  $\beta$ -catenina es un factor clave para su posterior translocación al núcleo, donde interacciona con los miembros de la familia de factores de transcripción Lymphoid Enhancer Factor/T-Cell Factor (TCF/LEF), para formar un complejo bipartito activo<sup>21</sup>. Este complejo provoca la transcripción de programas de expresión génica involucrados principalmente en proliferación, tales como el oncogén MYC, cuya proteína c\_Myc es bien conocida por su papel en la proliferación y la oncogénesis, así como de la ciclina D1 entre otros<sup>14,22</sup>. Dentro de este complejo, la  $\beta$ -catenina funciona como puente para unir a LEF/TCF con complejos remodeladores de la cromatina, y con los coactivadores Wnt Bcl-9/Lgs y Pygopus.

#### **1.4 Señalización Wnt no canónica**

Además de las vías de señalización Wnt dependientes de  $\beta$ -catenina, existen otras vías de Wnt denominadas no canónicas que no requieren la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina. En los vertebrados, estas vías están implicadas en diversos procesos, como los movimientos de células de extensión convergentes durante la gastrulación, la polaridad de las células del oído interno, el patrón dorsoventral, la separación de tejidos, la migración neuronal y el cáncer (figura 3, panel b). Muchos Wnt, incluidos Wnt1, Wnt3a y Wnt8 activan la vía de

señalización canónica. Sin embargo, un conjunto de proteínas Wnt, de las cuales Wnt5a es un miembro prototípico, es capaz de producir respuestas independientes de  $\beta$ -catenina<sup>23</sup>. Las vías no canónicas son transducidas a través de algunos receptores de la familia Frizzled y/o los receptores con actividad de tirosina cinasa Ror1/2 y Ryk<sup>24-26</sup>. Río abajo, las proteínas G pequeñas<sup>27</sup> (Rho a, Rho u, Rac y CDC42) y la cinasa c-jun NH2-terminal<sup>28</sup> (JNK) son moléculas efectoras de la ruta no-canónica dependientes de Dvl, mientras que la cinasa de tipo Nemo (NLK) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT) son las moléculas efectoras no canónicas dependientes de calcio<sup>29-31</sup>. Mientras que las proteínas G pequeñas están implicadas en la reorganización del citoesqueleto durante la invasión y la metástasis<sup>32</sup>, la proteína NLK fosforila a los factores de transcripción de la familia TCF/LEF e inhibe la vía de señalización Wnt canónica. El factor de transcripción NFAT está implicado en la extensión convergente durante la embriogénesis temprana, así como en la metástasis en la carcinogénesis<sup>33</sup>. Por otro lado, el aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la producción de diacilglicerol por esta vía denominada Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ , lleva a la activación de la proteína cinasa C<sup>34</sup> (PKC) y de otras cinasas dependientes de calcio<sup>35</sup>. La PKC ha sido el foco de atención de investigadores interesados en estudiar el cáncer, ya que no solamente es el blanco de moléculas promotoras de tumores, sino que está implicada en la regulación transcripcional de oncogenes, en el control de la proliferación celular y de la apoptosis, y por tanto es un enzima clave en el proceso de carcinogénesis.

Aunque se empiezan a dilucidar los mecanismos moleculares mediante los cuales funciona la señalización Wnt no canónica, se conoce poco acerca de los posibles eventos de señalización independientes de  $\beta$ -catenina en el mantenimiento de tejidos adultos de autorrenovación, como es el caso del mantenimiento de células troncales y su posible convergencia con otras vías intracelulares de señalización, incluyendo la vía Wnt canónica. De este modo, el grado de entrecruzamiento de la ruta de señalización Wnt con otras vías de señalización celular, apenas empieza a considerarse y es, sin duda, una importante área de investigación dado el potencial de la ruta Wnt de interactuar con la actividad de otros oncogenes y la pérdida de supresores tumorales.

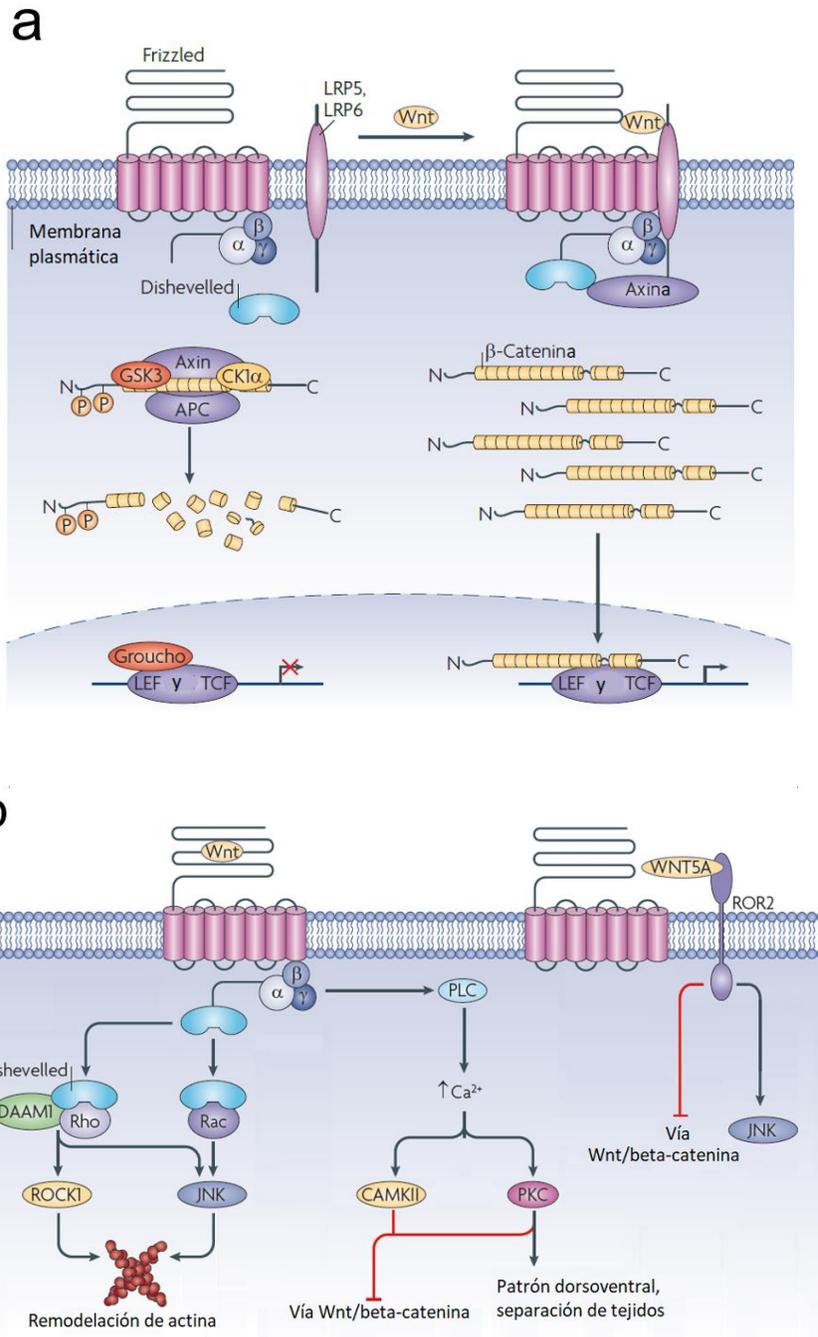


Figura 3. Principales vías de señalización Wnt. Modificado de Angers y Moon (2009)<sup>23</sup>. a) Señalización Wnt dependiente de  $\beta$ -catenina. El control postranscripcional de la estabilidad de la proteína  $\beta$ -catenina es fundamental para la vía Wnt- $\beta$ -catenina. La proteína de la poliposis adenomatosa de colon (APC) y la Axina son proteínas de andamiaje que forman el complejo de degradación de  $\beta$ -catenina. Una fosforilación en serinas específicas de  $\beta$ -catenina, por el complejo de degradación conformado por las cinasas Glucógeno Sintasa

Cinasa 3 (GSK3) y Caseína Cinasa 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ), forma la señal para el reconocimiento de  $\beta$ -catenina por SKP1–Culina 1–F-box (SCF $\beta$ –TrCP) E3 ligasa (no se muestra) y la consiguiente degradación por la vía de la ubiquitina-proteasoma. Por lo tanto, en condiciones basales, existe un bajo nivel de proteína  $\beta$ -catenina y los genes diana de la vía Wnt son reprimidos por la familia de represores transcripcionales Groucho, que se unen a las proteínas Factor Potenciador Linfoide (LEF) y Factor de Células T (TCF). Tras la activación de Wnt de Frizzled- LRP5 (Proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad) o los complejos del receptor Frizzled-LRP6, las proteínas G heterotriméricas y las proteínas Disheveled se activan y conducen al reclutamiento de Axina al correceptor LRP5 o LRP6. Esto inhibe el complejo de degradación, promueve la acumulación de  $\beta$ -catenina y su translocación al núcleo donde desplaza a Groucho de LEF y TCF y actúa como coactivador transcripcional para modular la transcripción dependiente del contexto.  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  indican subunidades de proteína G citoplasmática. b) Vías Wnt independientes de  $\beta$ -catenina. Las vías de señalización Wnt independientes de  $\beta$ -catenina pueden activarse mediante combinaciones específicas de ligandos Wnt y receptores Frizzled, o pueden depender del contexto de receptores específicos. Una vez activados, se propone que los receptores Frizzled se unen a proteínas G heterotriméricas (compuestas por subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) y/o proteínas Disheveled para iniciar la señalización. Una de las vías no canónicas implica la activación de proteínas G pequeñas Rho y Rac para regular el citoesqueleto de actina. Cuando DAAM1 (activador de morfogénesis 1 asociado a Disheveled) forma un complejo con Disheveled y Rho, regula a ROCK1 (Proteína cinasa 1 asociada a Rho) y al complejo Dishevelled-Rac GTPasa para iniciar la remodelación de actina mediada por la cinasa JNK (cinasa del extremo N-terminal de JUN). Otra vía Wnt no canónica, se define por un aumento en los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular mediado por fosfolipasa C (PLC), en esta vía los flujos de Ca<sup>2+</sup> conducen a la activación de la proteína cinasa dependiente de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (CAMKII), proteína cinasa C (PKC) y el factor nuclear de células T activadas (NFAT). Se ha demostrado que esta rama de señalización media el patrón dorsoventral y la separación de tejido en embriones y se opone a la señalización de Wnt- $\beta$ -catenina (línea roja). En vertebrados, la señalización de ROR2 conduce a la inhibición de la señalización dependiente de Wnt- $\beta$ -catenina (línea roja) y a la activación transcripcional del gen de la protocadherina paraxial (PAPC), mediada por JNK y JUN-ATF2.

## 1.5 Receptores Frizzled

Las proteínas frizzled son los principales receptores de la familia de las moléculas de señalización Wnt, y se encuentran en todo el reino animal, incluso en los metazoos más primitivos, pero no están presentes en plantas ni en eucariotas unicelulares, como la levadura<sup>36</sup>. La estructura de las proteínas frizzled presenta un dominio extracelular rico en cisteína (CRD) conservado, este CRD es seguido por un dominio con siete pasajes transmembrana. Las proteínas frizzled se encuentran exclusivamente en la membrana plasmática. Están ubicados en la superficie de las células que responden a Wnt, aunque la evidencia reciente ha sugerido que pueden internalizarse como parte de un mecanismo para regular el nivel extracelular de proteína Wnt y/o la respuesta celular a Wnt<sup>37, 38</sup>. La expresión tisular específica de los receptores frizzled es compleja, dado que se han descrito numerosos frizzled en metazoos. Se han descrito patrones de expresión específicos de frizzled en organismos modelo<sup>39-42</sup>. Respecto al cáncer, se ha observado cambios en el perfil de expresión de algunos receptores Fzd en el cáncer de colon en comparación con las células normales del colon<sup>43,44</sup>. Curiosamente, Holcombe et al.<sup>37</sup> encontraron que los tumores de colon poco diferenciados exhiben un alto grado de expresión del receptor FZD, especialmente en el margen de la invasión celular. Se han identificado diez diferentes genes de receptores Frizzled en mamíferos<sup>40</sup>.

## 1.6 Wnt5a

Se ha demostrado que algunos miembros de la familia Frizzled son receptores de Wnt5a<sup>45-48</sup>, así como los receptores con actividad de tirosina cinasa Ror 1, Ror 2<sup>49,50</sup> y Ryk<sup>51</sup>. También se ha encontrado que las señales de Wnt5a pueden ser transducidas a través de las cascadas de señalización  $\beta$ -catenina-TCF/LEF<sup>52,53</sup>, Dvl-Rac-ROCK<sup>54</sup>, Dvl-RhoB-Rab4<sup>55</sup>, Dvl-Rac-JNK<sup>56</sup>, Dvl-aPKC<sup>57</sup>, Ca<sup>2+</sup>-Calcineurin-NFAT<sup>58</sup>, Ca<sup>2+</sup>-MAP3K7-NLK<sup>29,54</sup>, Ca<sup>2+</sup>-MAP3K7-NF- $\kappa$ B<sup>59</sup>, y DAG-PKC<sup>60</sup>, en una manera dependiente del contexto<sup>31,52,61</sup>.

Se ha encontrado expresión de Wnt5a en una variedad de tumores, que incluye cáncer de mama<sup>62-65</sup> (8,26-28), cáncer de pulmón<sup>63,66</sup>, melanoma<sup>63,67</sup>, osteosarcoma<sup>63</sup>, cáncer de próstata<sup>63,68,69</sup>, cáncer uterino endometrial<sup>70,71</sup>, cáncer colo-rectal<sup>71-73</sup>, cáncer pancreático<sup>74,75</sup>,

cáncer gástrico<sup>71</sup>, cáncer esofageal<sup>76</sup>, tumor embrionario<sup>76</sup>, sarcoma de Ewing<sup>77</sup>, neuroblastoma<sup>78</sup>, carcinoma de piel de células basales<sup>79</sup> (BCC), carcinoma de piel de células escamosas<sup>80</sup> (SCC), y leucemia<sup>81,82</sup>. Entre los genes blanco de la vía activada por Wnt5a se encuentran SNAI1 (Snail), CD44, G3BP2 y YAP1. Wnt5a ha sido involucrado en invasión, diseminación peritoneal y metástasis distante de células tumorales vía RhoB y Snail<sup>54,55,60,83</sup>.

## 2. ANTECEDENTES

Reportes indican que tanto el ligando Wnt5a, prototipo de ligando no canónico en múltiples sistemas celulares, como algunos de sus receptores típicos (Fzd2, Fzd4, Fzd6 y Ror2) podrían estar presentes en líneas celulares de cáncer de colon<sup>84-86</sup>. De ser así, podríamos esperar que la señalización mediada por Wnt5a esté activa y desempeñe algún papel en el proceso de tumorigénesis en estas células. Recientemente, nuestro equipo de trabajo encontró que al estimular a las células RKO con Wnt5a se provoca la relocalización subcelular de las proteínas Dvl 2 y PKC $\beta$ II. ¿Cuál o cuáles son las rutas de señalización que se activan para provocar estas relocalizaciones?

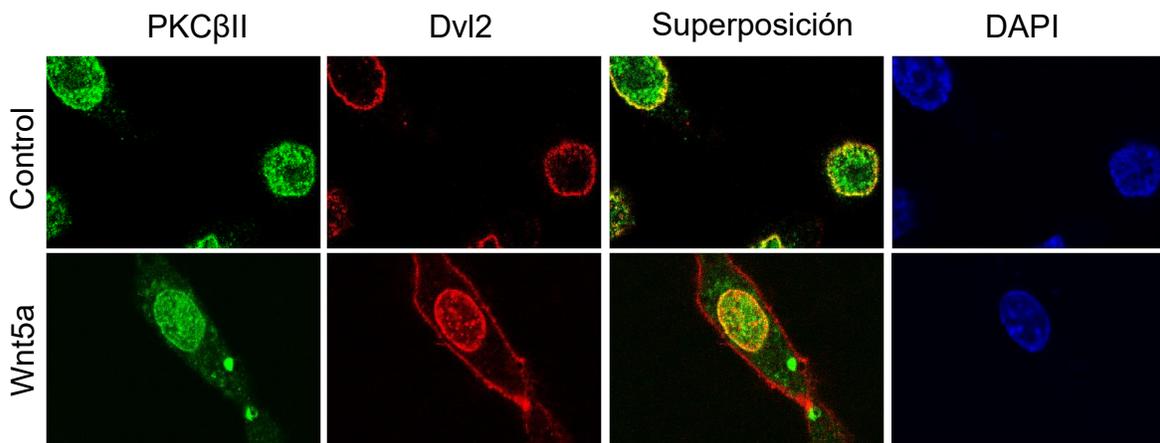


Figura 4. Imágenes de microscopía confocal de las células RKO. Podemos apreciar el cambio de localización de las proteínas PKC y Dvl en respuesta al estímulo con ligando Wnt5a

Como ya se ha mencionado, existen varias rutas por las que Wnt5a puede transducir una señal. Se ha reportado que, dependiendo del contexto, el ligando Wnt5a puede activar o inhibir la señalización mediada por  $\beta$ -catenina. En este sentido, mediante un ensayo de gen reportero se descartó que el ligando Wnt5a active a la vía Wnt canónica. Se demostró en nuestro laboratorio que mientras que el ligando canónico Wnt3a activa la transcripción mediada por  $\beta$ -catenina, el ligando Wnt5a no activa por sí mismo la vía Wnt canónica (Fig 5).

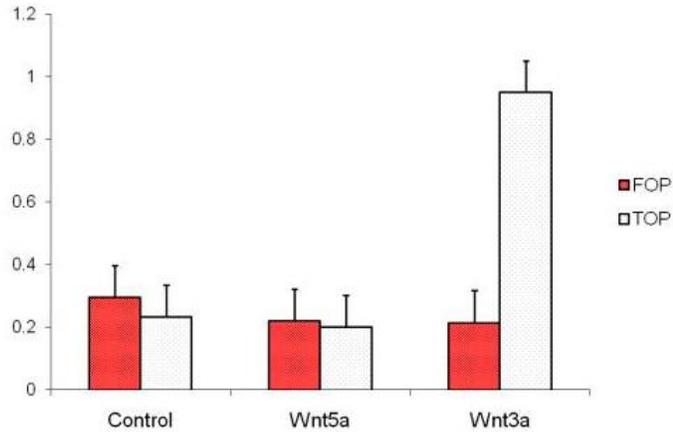


Figura 5. Actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina en las células RKO. (Se transfectaron células RKO con plásmido reportero para medir la actividad de Beta-catenina inducida por el ligando no canónico Wnt5a o el ligando canónico Wnt3a.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La vía de señalización Wnt canónica regula la homeostasis epitelial en el intestino, colon y recto. El 90 % de los cánceres colo-rectales tienen alguna alteración en las proteínas de la ruta Wnt canónica. Por otro lado, está demostrado que la ruta Wnt no canónica regula negativamente la actividad de la ruta canónica. Además de esto, la ruta no canónica está involucrada en la progresión maligna mediante el favorecimiento de la migración y metástasis en melanoma.

Dado que encontramos que en las líneas celulares de cáncer de colon el ligando Wnt5a no induce la activación de la actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina, pero sí induce cambios en la localización de la proteína Dvl, en este trabajo se planteó investigar el mecanismo de señalización no canónico activado por el ligando Wnt5 en células de cáncer de colon.

### **4. HIPÓTESIS**

En el epitelio del colon, la ruta de señalización Wnt no canónica es funcional, es activada por el ligando Wnt5a y regula características del fenotipo canceroso.

### **5. OBJETIVO GENERAL**

Investigar si la ruta Wnt no canónica es funcional en las células de cáncer de colon, cuál es su mecanismo de señalización y cuál es su papel en el fenotipo canceroso

### **6. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Analizar el perfil de expresión de receptores para ligandos Wnt en las células de cáncer de colon
2. Analizar los efectos de ligandos Wnt3a y Wnt5a en la actividad transcripcional de beta-catenina
3. Investigar el efecto del ligando Wnt5a en la activación de PLC y movilización de calcio intracelular, usando como control Wnt3a
4. Investigar si en la señalización Wnt participa una proteína G sensible a toxina pertussis

(PTx)

5. Investigar la participación de Ror2 en la señalización inducida por Wnt
6. Investigar el efecto de ligandos Wnt en la fosforilación y activación de Dvls
7. Investigar el efecto de los ligandos Wnt en migración celular

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1. REACTIVOS Y ANTICUERPOS**

Los anticuerpos utilizados en los experimentos contra los receptores Frizzled procedieron de las siguientes fuentes: anti-h-Frizzled-4 (sc-6645), anti-h-Frizzled-2 (sc-66328) y anti-ROR2 (sc-98486). de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Sta. Cruz, CA, EUA); anti h-Frizzled-6 (número de cat. AF3149), Frizzled-7-Phycoerythrin antihumano / ratón (número de cat. FAB1981P) y Frizzled-7 antihumano / ratón (número de cat. MAB1981) eran de R&D Systems (Minneapolis), Min, EE. UU.); anti-hRor2 [6F2D10] (ab201962) se obtuvo de Abcam (Cambridge, MA, EE.UU.). Se obtuvieron anti-Dvl3 de conejo (nº de cat. 3218), anti-Dvl2 de ratón (nº de cat. 3216) y anti- $\beta$ -tubulina de conejo (nº de cat. 21289) de Cell Signaling Technology (Danvers, MA, EE.UU.). Anti-Dvl1 de ratón (sc-8025), anti-Dvl2 de ratón (10B5, sc.8026), anti-Dvl3 de ratón (4D3, sc-8027), anti-TCF-4 de conejo (sc-13027) y anti-Snail (sc-28199) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, EE. UU.). Los conjugados de cabra anti-ratón y anti-conejo IgG-peroxidasa de rábano se obtuvieron de Pierce (Rockford, IL. EE.UU.). El inhibidor U-73122 específico de la fosfolipasa C se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.), y el inhibidor Y-27632 específico de RhoK se adquirió de Calbiochem /Merck (Darmstadt, Alemania). Los ligandos Wnt3a humano recombinante (nº de cat. 5036-WN-010) y Wnt5a recombinante de humano / ratón (nº de cat. 645-WN-010 / CF) se adquirieron en R&D Systems (Minneapolis, Min, EE.UU.). Todos los demás productos químicos eran de grado reactivo.

### **7.2. PLÁSMIDOS**

Los plásmidos reporteros pTOPFlash y pFOPFlash se obtuvieron de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, EE.UU.). El plásmido que codifica Ror2 de ratón de tipo silvestre (pEF1a-mRor2WT Addgene plásmido 22613) y el plásmido que codifica Ror2 de ratón mutado en Tyr641, 645 y 646 (pEF1a-mRor2Y641,645,646F Addgene plasmid 22638) se obtuvieron de Addgene.

### 7.3. CULTIVO DE CÉLULAS

Las líneas celulares de cáncer de colon utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

Células RKO malignas humanas que muestran una señalización Wnt canónica normal, ya que expresan la proteína APC de tipo silvestre y los niveles y la actividad de  $\beta$ -catenina se elevan en respuesta al ligando wnt3a. Estas células son el prototipo de las células cancerosas impulsadas por BRAF (mutaciones Braf V600E y PIK3CA H1047R) [14 - (Ahmed, 2013)].

Células SW480 de carcinoma humano que expresan una versión truncada de APC, tienen una señalización Wnt canónica constitutivamente activa ( $\beta$ -catenina sobreexpresada) y son el prototipo de células cancerosas impulsadas por KRAS (KRAS G12V, APC A1457T / K1462R, FGFRS400R, TP53 R273H y mutaciones STK11 G58S) [14 - (Ahmed, 2013)].

Células 112CoN inmortalizadas de embrión humano con ruta Wnt normal.

Para cultivar a las células RKO y las células 112CoN se utilizó medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10%, antibióticos (200 mg / ml de estreptomycin y 120 mg / ml de penicilina) y L-glutamina 2 mM. Las células SW480 se mantuvieron en DMEM F-12 suplementado con FBS al 5%, antibióticos y glutamina 2 mM. Todas las células se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, EEUU) y fueron autenticadas en junio de 2017 mediante un análisis de perfil de ADN Short Tandem Repeat realizado en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en la Ciudad de México.

#### **7.4. ANÁLISIS FACS**

Para la tinción de la membrana, las células se separaron y se disociaron en una solución de EDTA 10 mM. La suspensión celular se lavó, se resuspendió en tampón de tinción (PBS suplementado con suero fetal bovino al 4%), se incubó con el anticuerpo primario correspondiente y luego con el anticuerpo secundario. Las células teñidas con el solo anticuerpo secundario se utilizaron como control negativo. Las células se obtuvieron en un Attune Nxt (Thermo Scientific) y los datos se analizaron con el software FlowJo (Tree Star®).

Para la tinción intracelular, las células se separaron de la misma manera, pero inmediatamente se fijaron con paraformaldehído al 1% (m / v) en PBS durante 10 min a 4°C. A continuación, las células fijadas se permeabilizaron con metanol absoluto durante 20 min en hielo y se incubaron con BSA al 3% (m / v) en PBS para evitar interacciones inespecíficas. Se agregaron anticuerpos y se incubaron durante 30 min a 4 ° C en oscuridad. Las células se lavaron e incubaron con anticuerpos secundarios anti-ratón acoplados con FITC o anti-conejo acoplados con FITC. Las células se lavaron con PBS. Finalmente, las muestras se analizaron con un citómetro FACScalibur. Todos los datos fueron analizados por el software FlowJo X.

#### **7.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL**

Se utilizó PCR cuantitativa en tiempo real para medir el nivel de transcripción de ARN de los genes del receptor de FZD. La expresión del gen *housekeeping* de la  $\beta$ -actina se analizó con fines de normalización. La amplificación por PCR se realizó con 20 ng de ADNc, cebador directo e inverso 200 nM y Taqman Master Mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un volumen final de 10  $\mu$ l. La Tabla complementaria 1 muestra los detalles de los diseños del cebador y el número de UPL (Universal Probe Library, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) utilizados para el ensayo de RT-PCR. Las reacciones de PCR se realizaron en un Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) durante 45 ciclos, cada ciclo consiste en desnaturalización durante 15 s a 95 °, hibridación del cebador durante 15 s a 55 ° C y

extensión durante 30 s a 72 ° C y enfriamiento 30 s a 40 ° C. Para el control de calidad de los ensayos de q-PCR, se evaluó la determinación de linealidad y reproducibilidad (VC <10%). La cuantificación relativa del ARNm de los genes diana se realizó utilizando el software Light Cycler 4.1, según el método 2-delta-delta Ct.

## **7.6. ENSAYO DE GEN REPORTERO**

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 1,2 - 1,8 x 10<sup>5</sup> células por pocillo. Veinticuatro horas después de la siembra, las células se colocaron en medio libre de suero y se transfectaron con 1 µg del plásmido reportero (pTOPFlash) o plásmido de control (pFOPFlash) y con 0,05 µg del plásmido pRL luciferasa o plásmido CMV-GFP (transfección control). La actividad de la proteína reportera en los lisados celulares se midió 24 h después de la transfección usando el kit de ensayo de luciferasa dual (Promega, Madison, WI, EE. UU.). La actividad se normalizó con respecto a la actividad de la luciferasa de *Renilla* o con respecto al contenido de proteína en cada muestra.

## **7.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR**

Las células se privaron de suero durante la noche y luego se cargaron con 2,5 µM del indicador fluorescente de Ca<sup>2+</sup> Fura-2 / AM en Krebs-Ringer-HEPES que contenía albúmina de suero bovino al 0,05%, pH 7,4, durante 1 h a 37 ° C, y luego se lavaron tres veces para eliminar el FURA no incorporado. Las células se separaron mediante tripsinización suave con EDTA 10 mM y se incubaron 5 min en ausencia o presencia del inhibidor de PLC 4 µM U-73122. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo con ligandos Wnt3a o Wnt5a (1 µg / ml) a longitudes de onda de excitación de 340 y 380 nm y a una longitud de onda de emisión de 510 nm, con un intervalo de corte establecido en 0,5 s, utilizando un Aminco-Bowman Series 2 Espectrómetro de luminiscencia (Rochester, NY). El [Ca<sup>2+</sup>] se estimó de acuerdo con el método de Grynkiewicz et al. [15 - (G Grynkiewicz, 1985)] utilizando el software proporcionado por AMINCO-Bowman. En algunos experimentos, las células se preincubaron durante la noche con toxina de *Pertussis* (PTX) (100 ng / ml) para inactivar las

proteínas G sensibles a PTX antes de cargarlas con 2,5  $\mu\text{M}$  de Fura-2 / AM en Krebs-Ringer-HEPES que contiene 0,05% de BSA, pH 7,4, durante 1 h a 37 ° C.

## **7.8. DETERMINACIÓN DE FOSFATO DE INOSITOL**

Cultivos celulares confluentes, crecidos en placas de 35 mm, se marcaron con myo- [2-<sup>3</sup>H] - inositol [22,9 Ci / mmol, PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA, EE.UU.)] durante 18-24 h. Las células se lavaron dos veces con amortiguador Krebs-Ringer-Hepes que contenía  $\text{CaCl}_2$  1,3 mM y se incubaron durante 20 min en 2 ml del mismo amortiguador que contenía LiCl 10 mM a 37 ° C en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%. Las incubaciones con ligandos Wnt5a o Wnt3a se realizaron durante el tiempo indicado y la estimulación se detuvo mediante la adición de cloroformo / metanol enfriado con hielo (1: 2, v / v). Los fosfatos de inositol totales se separaron mediante cromatografía Dowex AG1-X8 [16 - (M J Berridge, 1983)].

## **7.9. ENSAYO DE MIGRACIÓN POR CIERRE DE HERIDA**

Se sembraron células RKO o SW480 hasta la confluencia en portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina en medio de cultivo suplementado con FBS al 5% durante 24 h. Luego se produjo un rasguño usando una punta de pipeta estéril. Los cultivos se lavaron con PBS. En este momento (t = 0 h), se fotografiaron los márgenes de la herida. A continuación, las células se cultivaron en medio suplementado con FBS al 0,05% y 5-bromoxiuridina 0,1  $\mu\text{M}$  (añadida 1 h antes de los tratamientos para descartar que los cambios en el número de células migratorias se debieran a un aumento de la proliferación). Sin retirar el medio, se añadieron entonces 300 ng / ml de Wnt3a o Wnt5a en ausencia o presencia del inhibidor de PLC U-73122 (4  $\mu\text{M}$ ) o inhibidor de RhoK Y-27632 (10  $\mu\text{M}$ ) hasta 48 h. Pasado este tiempo, se analizaron los márgenes de la herida en las fotografías utilizando el programa Image J. El porcentaje de cierre se calculó como "área de superficie celular migrada / área de superficie total  $\times$  100".

## **7.10. WESTERN BLOT**

Las células se homogeneizaron en amortiguador RIPA helado (Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, NP40 al 1%, EDTA 1 mM, SDS al 0,1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM, leupeptina 10 µg / ml e inhibidor de tripsina 0,1 mg / ml). Las muestras de proteína (100 µg) se separaron mediante SDS-PAGE al 8 o 10%, seguido de transferencia electroforética sobre membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con leche en polvo descremada al 5% y se incubaron durante la noche a 4°C con el correspondiente anticuerpo primario. La detección se logró utilizando el kit SuperSignal (Pierce) con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano. La señal obtenida usando anticuerpos de actina o β-tubulina se utilizó como control para una carga igual.

## **7.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

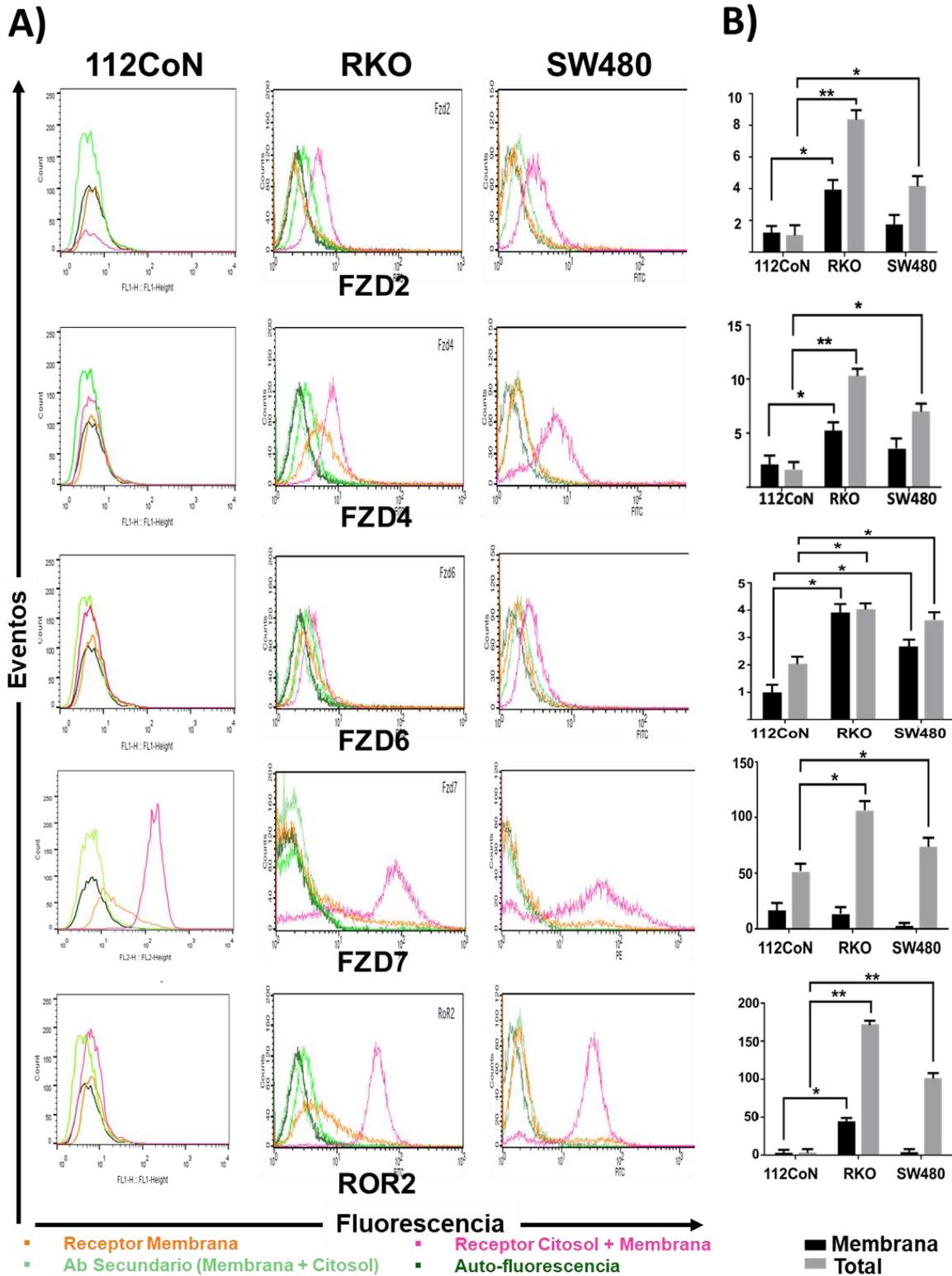
Los datos se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico entre grupos comparables se realizó utilizando ANOVA de una vía con la prueba posterior de Bonferroni o con la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. En ambos casos, el software incluido en el programa GraphPad Prism. En todas las comparaciones estadísticas,  $p < .05$  se consideró significativo.

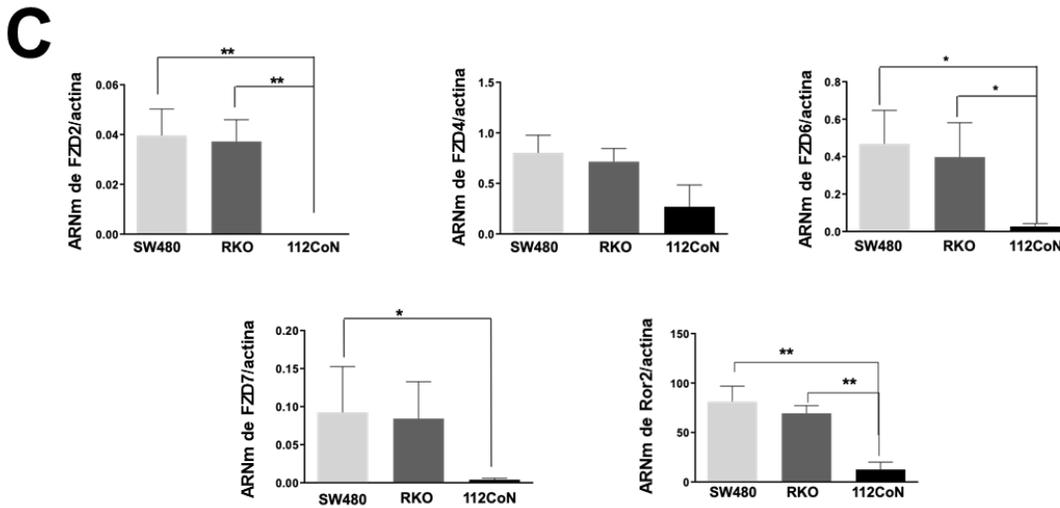
## **8. RESULTADOS**

### **8.1. EL PERFIL DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR WNT MUESTRA DIFERENCIAS ENTRE LAS CÉLULAS DEL COLON NO MALIGNAS Y MALIGNAS**

Se ha reportado que las células de cáncer de colon presentan de forma característica una expresión aberrante de los receptores Wnt<sup>88</sup>. Para explorar la presencia de diferentes receptores de Wnt, se analizó por citometría de flujo el perfil de expresión, tanto de Frizzled (FZDs) como del correceptor no canónico Ror2, en líneas celulares de colon. Se eligieron las líneas celulares de cáncer de colon humano RKO y SW480 por representar dos condiciones distintas de funcionalidad de la ruta Wnt: 1) como representativas de la señalización Wnt normal a las células RKO, que expresa la proteína APC normal; y 2) como representativas de la señalización Wnt constitutivamente activa a las células SW480, que expresa una versión truncada de APC. Asimismo, se eligieron a las células 112CoN de colon como modelo de colon normal humano. La figura 6 (Panel A y B) muestra el claro contraste en los niveles de expresión y variedad de receptores Wnt presentes entre las células de cáncer de colon y las células no malignas, lo que concuerda con informes anteriores<sup>89</sup> donde se utilizó histoquímica para analizar tejidos de colon humano. Como se puede observar, mientras que las células no malignas apenas expresan Fzd4, Fzd7 y Ror2, las células cancerosas muestran altos niveles de expresión de los receptores Fzd2, Fzd4, Fzd6, Fzd7 y Ror2 localizados tanto intracelularmente, como en la membrana celular. Sorprendentemente, aunque se ha considerado que las células cancerosas RKO tienen señalización Wnt "normal", su perfil de expresión de receptores es similar al perfil mostrado por las células cancerosas SW480, que presentan señalización Wnt canónica alterada, y muy diferente al mostrado por las células 112CoN no malignas. Este perfil de expresión de receptores Wnt se hizo utilizando anticuerpos selectivos disponibles comercialmente, y además fue validado mediante un análisis cuantitativo de PCR en tiempo real (Figura 6, panel C). Se midió el nivel de transcripción de ARNm de los genes FZD y Ror2 en células malignas y se comparó con el nivel de expresión encontrado en células no malignas. Se analizó la expresión del gen de mantenimiento actina con fines de normalización. Los resultados mostrados en la Figura 6 (Panel C) confirmaron que mientras que las células 112CoN no malignas expresan niveles

bajos de genes FZD4, FZD7 y Ror2, las células RKO y SW480 de cáncer de colon expresan niveles altos de genes FZD2, FZD4, FZD6, FZD7 y Ror2.





**Fig. 6. Perfil de expresión de los receptores Wnt en células RKO o SW480 de cáncer de colon comparado con el de células de colon 112CoN no malignas.** A) En los histogramas del FACS se muestran la cantidad de eventos (células) asociada a la fluorescencia relativa (expresión del receptor), a mayor fluorescencia mayor presencia de proteína. Para la tinción de la membrana (línea naranja), las células se resuspendieron en tampón de tinción con el anticuerpo primario correspondiente y luego se incubaron con el anticuerpo secundario. Para la expresión total del receptor (expresión del receptor citoplásmico + de membrana; línea rosa), las células se prepararon de la misma manera, pero se fijaron inmediatamente y luego se permeabilizaron como se describe en la sección Materiales y Métodos. B) Se presenta la cuantificación de la fluorescencia relativa promedio de las tinciones del FACS. Los datos representan las medias  $\pm$  SEM de tres ensayos independientes (\*)  $p = 0.05$ ; (\*\*)  $p = 0.01$ . C) Análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real. La amplificación por PCR se llevó a cabo con 20 ng de ADNc, cebador 200 nM y Taqman Master Mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un volumen final de 10  $\mu$ l. Se muestran diferencias significativas en la abundancia relativa de los receptores de Wnt entre las células cancerosas y las no malignas. La expresión del gen de la  $\beta$ -actina se analizó con fines de normalización. Para el control de calidad de los ensayos de q-PCR, se evaluó la determinación de linealidad y reproducibilidad (VC <10%).

## **8.2. Wnt3a PERO NO Wnt5a ESTIMULA LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE $\beta$ -CATENINA EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON RKO**

A continuación, examinamos la capacidad de los ligandos Wnt para estimular en las células de cáncer de colon la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina utilizando el sistema reportero pTOPFlash / FOPFlash. Para ello, medimos la respuesta provocada por el prototipo de ligando canónico Wnt3a, en comparación con Wnt5a, el prototipo del ligando Wnt no canónico. La expresión de estos ligandos se ha reportado en células de colon, y en el caso de Wnt5a, se ha encontrado regulada positivamente en células de cáncer de colon, particularmente en las metastásicas<sup>90</sup>. Veinticuatro horas después de la transfección con los plásmidos pTOPFlash o pFOPFlash, las células malignas RKO y SW480 se privaron de suero durante 12 h y luego se incubaron en ausencia o presencia de 300 ng / ml de Wnt3a, Wnt5a o ambos durante 8 h. Como se puede ver en la Figura 7 (Panel A), en las células RKO cada Wnt usado se comportó como se esperaba: solo el prototipo canónico Wnt3a fue capaz de disparar la actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina. Además, Wnt5a fue suficiente para bloquear la actividad transcripcional inducida por Wnt3a -  $\beta$  catenina, como se esperaba para un ligando Wnt no canónico típico. Cuando comparamos estos resultados con los obtenidos en las células SW480 (Fig.7, panel B), que tienen señalización Wnt canónica activa constitutiva, encontramos que la presencia de Wnt5a no afectó la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina. Además, Wnt3a no indujo un aumento adicional en la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina, ya activa en estas células. Para confirmar que solo Wnt3a es capaz de activar de una manera dependiente de la dosis la actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina en células RKO, se incubaron células privadas de suero en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de ligandos Wnt3a o Wnt5a durante 8 h. Como se puede observar en la Figura 7 (Panel C), la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina se incrementó de forma dosis-dependiente sólo por Wnt3a. En contraste, Wnt5a no estimuló la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina en ninguna concentración probada. Consistente con esto, los niveles de proteína, tanto de  $\beta$ -catenina como de los genes diana canónicos de Wnt, axin2, sólo aumentaron de manera dependiente de la dosis en células estimuladas con Wnt3a (Fig. 7, panel D), lo que confirma que Wnt3a se comporta como un prototipo de ligando canónico de Wnt en Células RKO.

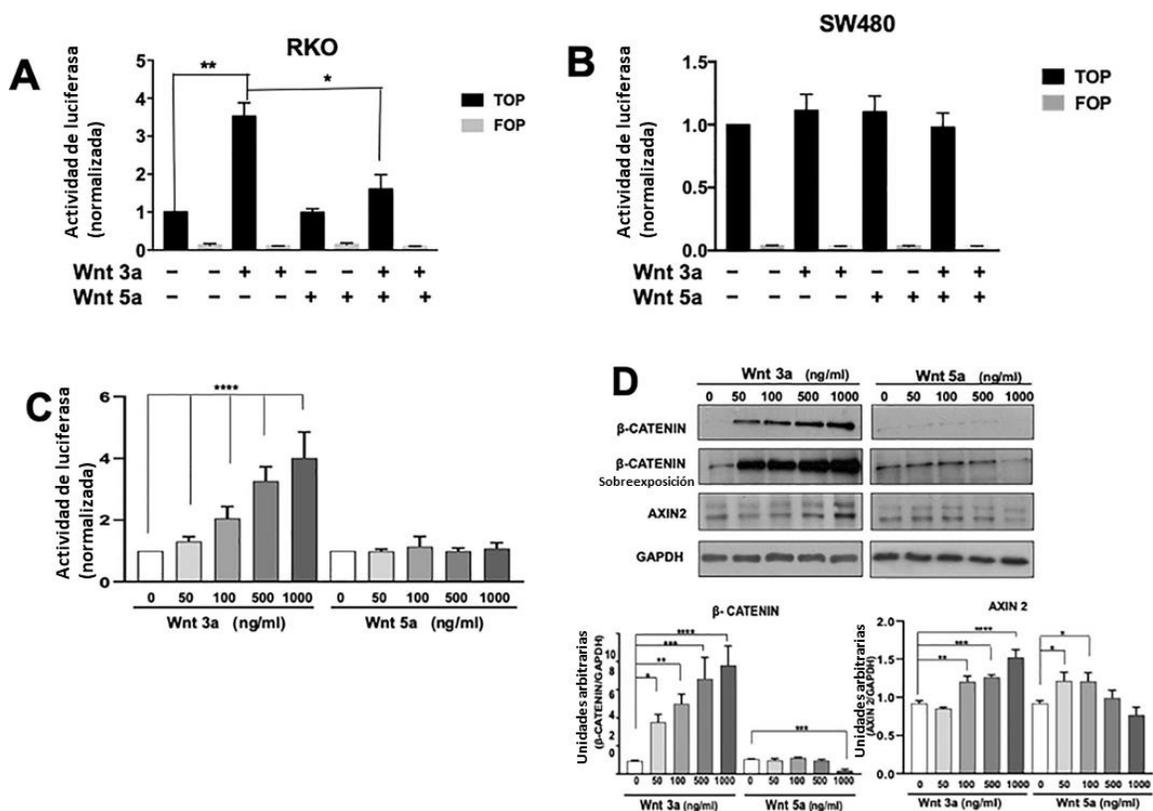


Fig. 7. Inducción por Wnt de la actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina en células RKO y SW480. Las células se cotransfectaron con el plásmido pRL y los plásmidos reporteros TOPFlash o FOPFlash. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se privaron de suero durante 12 h y luego se incubaron con las concentraciones indicadas de Wnt3a, Wnt5a o ambas para estimular las células durante un período de 8 h. Después de la incubación, las células se lavaron, lisaron y se midió la actividad de luciferasa. La actividad se normalizó con respecto a la actividad de la luciferasa de *Renilla* o con respecto al contenido de proteína total en cada muestra. Los resultados representan las medias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . A) En células RKO, la adición de 300 ng/ml de solo Wnt3a fue suficiente para activar la actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina. La adición de solo Wnt5a (300 ng/ml) no tuvo efectos en la actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina. Cuando se adicionó una combinación de ligandos, el Wnt5a bloqueó la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina inducida por Wnt3a. B) En las células SW480, Wnt5a solo, o en combinación con Wnt3a, no afectó a la actividad transcripcional constitutiva de  $\beta$ -catenina, y Wnt3a solo no indujo ningún aumento en la actividad transcripcional constitutiva de  $\beta$ -catenina. C) Curva de dosis-respuesta de la actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina inducida por Wnt3a o Wnt5a en concentraciones crecientes en células de cáncer de colon RKO. D) Western blot de los niveles de proteína  $\beta$ -catenina y axina2 en función de la concentración de ligandos Wnt. Se

utilizó GAPDH como control de carga igual. Se muestra un análisis densitométrico de los cambios en los niveles de proteína  $\beta$ -catenina o axina2 inducidos por Wnt con respecto a los niveles de GAPDH. Los datos representan las medias  $\pm$  SEM de tres ensayos independientes.

### **8.3. TANTO Wnt5a COMO wnt3a ESTIMULAN LA MOVILIZACIÓN INTRACELULAR DE CALCIO EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON**

Se planteó como objetivo caracterizar la señalización inducida por Wnt5a en el cáncer de colon. Hay varias rutas activadas por ligandos no canónicos, principalmente la señalización de Wnt/PCP (polaridad celular planar) y la señalización de Wnt-/Ca<sup>2+</sup>. Primero examinamos si Wnt5a activaba la vía Wnt / Ca<sup>2+</sup> en células RKO. En vista de que Wnt3a estimuló la señalización de Wnt/ $\beta$ -catenina en estas células, decidimos utilizar este ligando como control negativo para comparar con los posibles efectos inducidos por Wnt5a en la movilización de calcio intracelular. Se cargaron células RKO privadas de suero con el indicador fluorescente de Ca<sup>2+</sup> Fura-2 / AM, como se describe en la sección Materiales y Métodos, y se llevaron a cabo mediciones de fluorescencia durante la estimulación de células con ligando Wnt3a o Wnt5a. Se encontró que Wnt5a inducía claramente la movilización de Ca<sup>2+</sup> en las células RKO, tal y como se esperaría de un ligando Wnt no canónico. Sorprendentemente, el ligando de Wnt3a canónico también indujo movilización de Ca<sup>2+</sup> en estas células como se muestra en la Figura 8 (Panel A). Inesperadamente, tanto Wnt5a como Wnt3a indujeron en las células RKO la movilización de Ca<sup>2+</sup> de una manera dependiente de la dosis, como se puede observar en la Figura 8 (Panel C y D). Además, y también de forma inesperada, cuando realizamos el mismo experimento en células SW480, encontramos que en estas células tanto los ligandos Wnt3a como los ligandos Wnt5a eran capaces de estimular también la movilización de Ca<sup>2+</sup>, como se muestra en la Figura 8 (Panel B). Los efectos fueron relativamente pequeños usando 1  $\mu$ g / ml de ligandos Wnt, pero se observaron de manera consistente. Por lo tanto, estos resultados indicaron que el ligando Wnt3a podría acoplarse simultáneamente, en las mismas células, a la activación de las rutas Wnt /  $\beta$ -catenina canónica y Wnt / Ca<sup>2+</sup> no canónica.

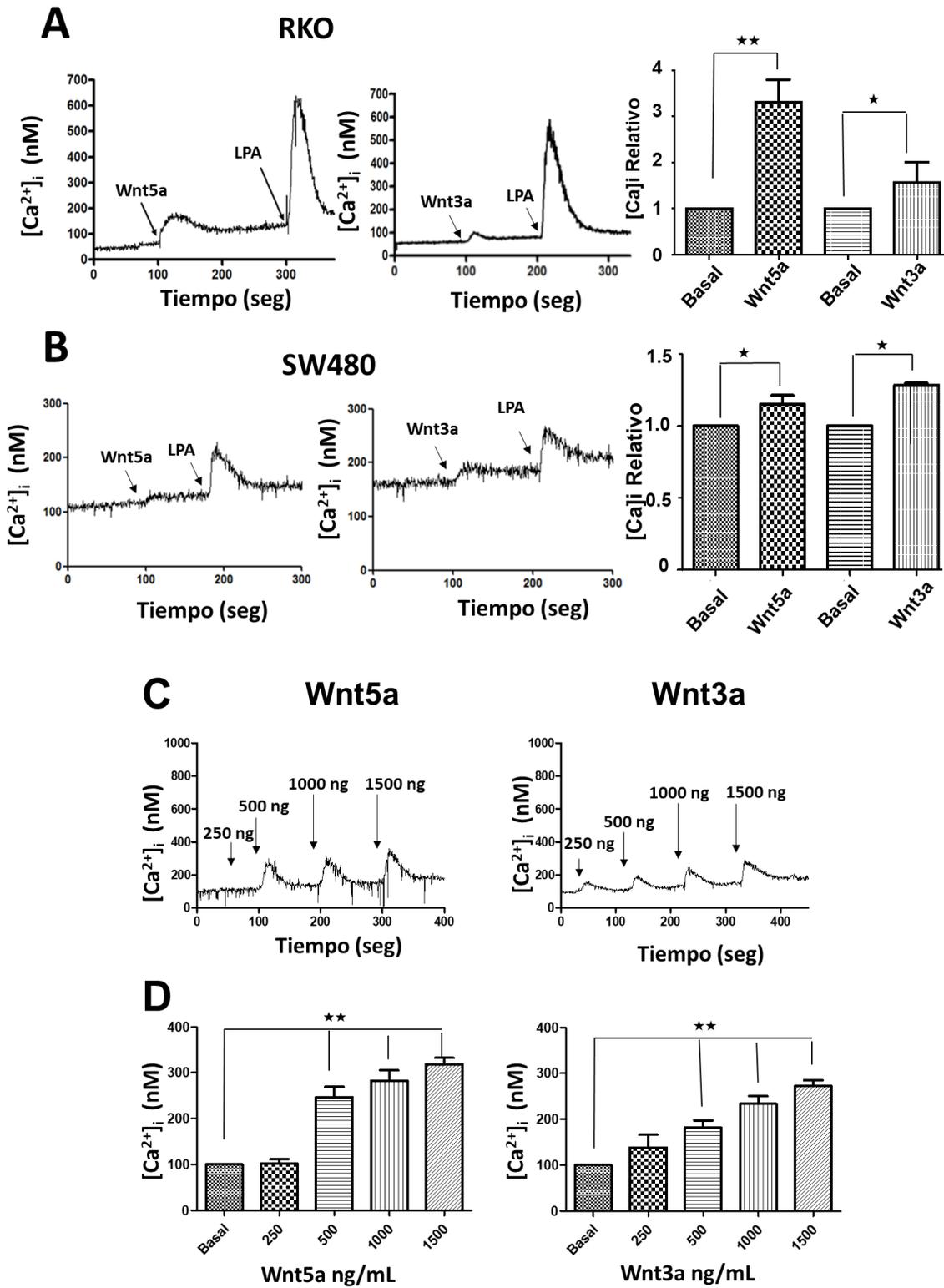


Figura 8. **Wnt5a**, así como como **Wnt3a** movilizan  $\text{Ca}^{2+}$  en células de cáncer de colon. Se muestra un curso temporal de la concentración de calcio intracelular estimulada por el

ligando Wnt5a o por el ligando Wnt3a, tanto en células RKO (panel A) como en células SW480 (panel B), se utilizó LPA como control. En los paneles C y D se muestra un curso temporal de la concentración de calcio intracelular en respuesta a diferentes concentraciones del ligando Wnt5a o del Wnt3a. Las células se privaron de suero durante la noche y luego se cargaron con 2,5  $\mu\text{M}$  de Fura-2 / AM en Krebs-Ringer-HEPES que contenía BSA al 0,05%, pH 7,4, durante 1 hora a 37 ° C. Las células se lavaron y separaron mediante tripsinización suave con EDTA 10 mM. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo con ligandos Wnt3a o Wnt5a (1  $\mu\text{g}$  / ml) utilizando un espectrómetro de luminiscencia Aminco-Bowman Serie 2. Se utilizó LPA como control positivo. Las trazas son representativas de cuatro experimentos que utilizan diferentes preparaciones de células y los gráficos de barras corresponden a las cuantificaciones obtenidas de los cuatro experimentos (media  $\pm$  SEM) normalizando con respecto a la concentración basal de  $\text{Ca}^{2+}$ . \* P <0.05; \*\* P <0.01

#### **8.4. TANTO Wnt-5a COMO Wnt3a ACTIVAN PLC EN CÉLULAS RKO**

A continuación, se investigó si la movilización de calcio inducida por Wnt5a o por Wnt3a en células RKO dependía de la activación de la fosfolipasa C (PLC). Las células cargadas con el indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$  Fura-2 / AM se incubaron previamente durante 10 min en ausencia (control) o presencia del inhibidor de PLC 4  $\mu\text{M}$  U-73122. A continuación, las células se incubaron en ausencia o presencia de Wnt5a (1  $\mu\text{g}$  / ml) o Wnt3a (utilizando 1,75  $\mu\text{g}$  / ml para aumentar la señal y la posibilidad de observar un efecto negativo del inhibidor). Los cambios de fluorescencia inducidos por cada ligando se muestran en la Figura 9, Panel A (Wnt5a) y Panel B (Wnt3a). Se puede observar que la capacidad de Wnt5a o Wnt3a para aumentar la concentración de calcio en el citosol se bloqueó significativamente mediante el tratamiento previo de las células RKO con el inhibidor específico de PLC U-73122. Por lo tanto, estos resultados confirmaron que tanto Wnt5a como Wnt3a están acoplados a la estimulación de PLC en células RKO.

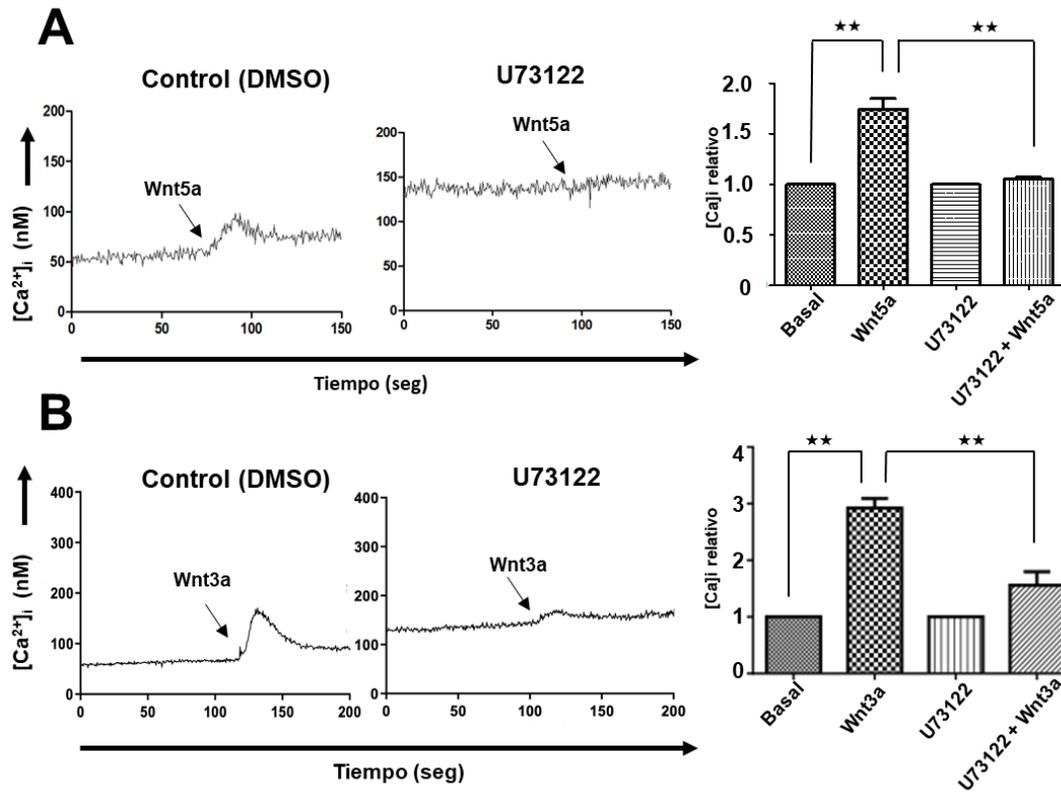


Figura 9. **Wnt5a, así como Wnt3a activan a la PLC en las células RKO.** Se muestran un curso temporal en la concentración intracelular de calcio. También se muestra un histograma con el aumento relativo máximo en la concentración intracelular de calcio, en presencia o ausencia de la U73122. La inhibición selectiva de la PLC en las células fue suficiente para disminuir significativamente la liberación de calcio inducida por Wnt5a (panel A) y Wnt3a (panel B). Las células RKO se privaron de suero durante la noche y luego se cargaron con 2,5  $\mu$ M de Fura-2 / AM en Krebs-Ringer-HEPES que contenía BSA al 0,05%, pH 7,4, durante 1 hora a 37°C. Las células se lavaron y separaron mediante tripsinización suave con EDTA y se incubaron durante 10 minutos en ausencia o presencia del inhibidor de PLC 4 $\mu$ M U-73122. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo en ausencia (vehículo) o presencia de Wnt5a (1  $\mu$ g / ml) o Wnt3a (1,75  $\mu$ g / ml) utilizando un espectrómetro de luminiscencia Aminco-Bowman Serie 2. Las trazas son representativas de cuatro experimentos que utilizan diferentes preparaciones de células y el gráfico de barras corresponde a las cuantificaciones obtenidas de los cuatro experimentos (media  $\pm$  SEM) normalizando con respecto a la concentración basal de Ca<sup>++</sup>. \* p < 0,05; \*\* p < 0,01

## 8.5. Wnt-5a ACTIVA PLC VÍA UNA PROTEÍNA G SENSIBLE A LA TOXINA *PERTUSSIS* EN CÉLULAS RKO

Se ha informado que los receptores FZD se acoplan con proteínas G heterotriméricas, como las de la subfamilia  $G_i$  y  $G_q$ <sup>91</sup>. Por lo tanto, también se exploró la posibilidad de que en las células cancerosas de colon se activara PLC en respuesta a una estimulación de proteína  $G_{i/0}$  inducida por Wnt5a o por Wnt3a. Para esto se preincubaron las células RKO con toxina *Pertussis* (PTX), que ADP-ribosila las proteínas  $G_{i/0}$  dando como resultado su inactivación. Las células se incubaron durante la noche con PTX (100 ng / ml) porque se ha reportado que este tratamiento inactiva las proteínas G sensibles a la PTX<sup>92</sup>. Como se puede observar en la Figura 10 (Panel A), el pretratamiento de las células RKO con PTX disminuyó notablemente, la respuesta de movilización de  $Ca^{2+}$  mediada por Wnt5a, lo que sugiere que tanto las proteínas G sensibles como las insensibles a la PTX (no se abolió la señal por completo) pueden participar en la transducción de señales inducida por Wnt5a. En contraste, el pretratamiento de las células con PTX no afectó la movilización de  $Ca^{2+}$  inducida por Wnt3a en comparación con la movilización de  $Ca^{2+}$  parcialmente afectada promovida por LPA, utilizada como control positivo de la eficacia del pretratamiento de PTX (Fig. 10, panel B). Curiosamente, la capacidad de Wnt3a para estimular la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina tampoco se vio afectada por el pretratamiento de las células con PTX, como se puede ver en la Figura 10 (Panel C) y no dependen de una estimulación de la proteína  $G_{i/0}$ . Para determinar si la movilización de  $Ca^{2+}$  observada es resultado del uso de las reservas del retículo endoplásmico a través de inositol trifosfato ( $IP_3$ ), se midió mediante cromatografía Dowex AG1-X8 los fosfatos de inositol totales producidos por la estimulación con Wnt5a y mediada por PLC. El curso temporal de  $IP_3$  producido se muestra en la Figura 10 (Panel D). Estos resultados indicaron que hubo un aumento del pico de  $IP_3$  45 minutos después de la estimulación de las células con Wnt5a. Juntos, nuestros resultados indican que la señalización no canónica de Wnt /  $Ca^{2+}$  en las células de cáncer de colon RKO inducidas por Wnt5a opera activando PLC a través de una proteína  $G_{i/0}$  sensible a PTX para generar  $IP_3$ , que a su vez induce la liberación de  $Ca^{2+}$  del RE.

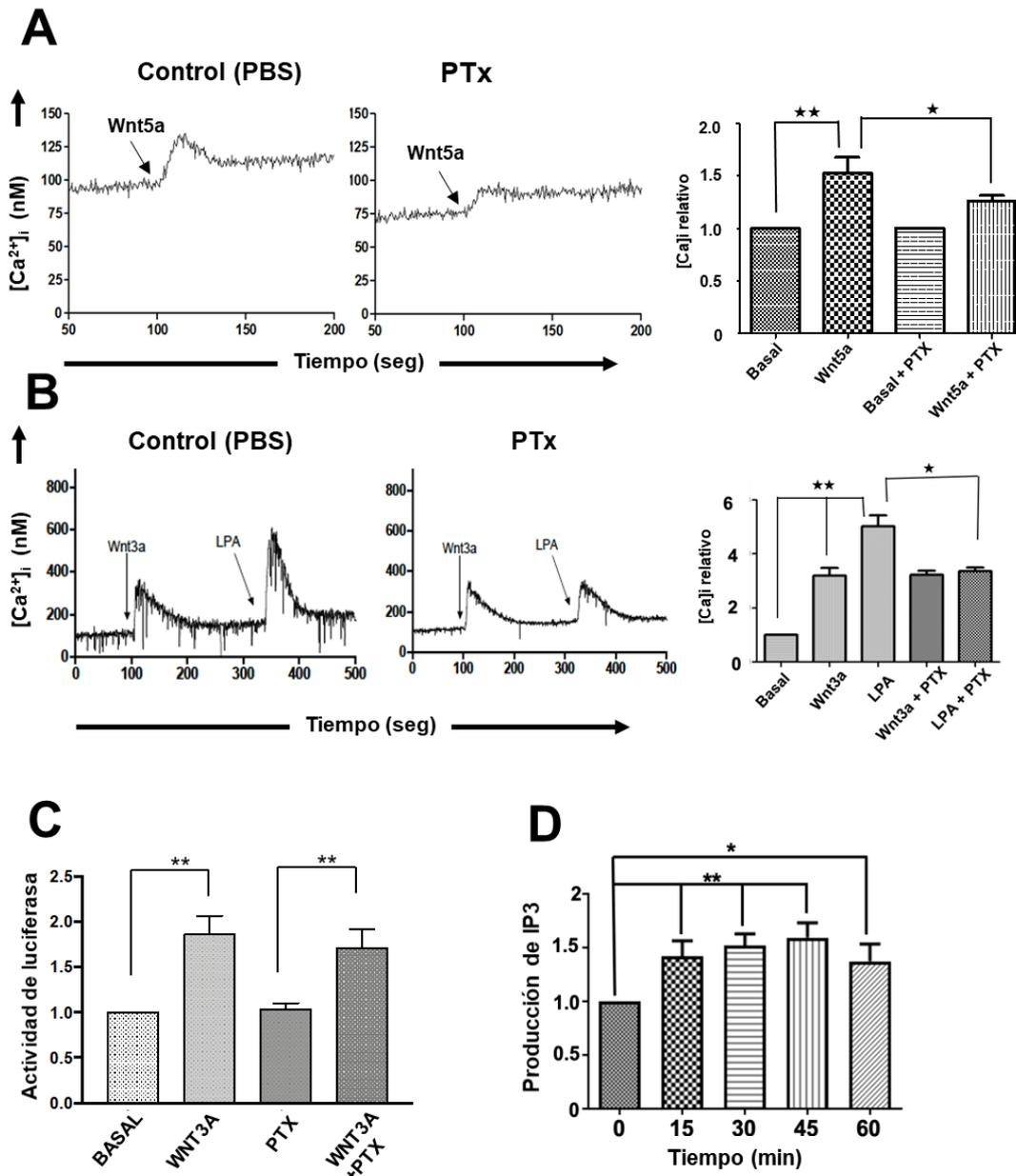


Figura 10. La señalización de Wnt5a es inhibida por PTx, pero la de Wnt3a no. A y B) Se muestran un curso temporal en la concentración intracelular de calcio. También se muestra un histograma con el aumento relativo máximo en la concentración intracelular de calcio, en presencia o ausencia de la PTx. Mientras que la movilización de Ca<sup>2+</sup> inducida por Wnt5a depende de la proteína G<sub>i/o</sub> sensible a la toxina *Pertussis*, la movilización de Ca<sup>2+</sup> inducida por Wnt3a no depende de la activación de G<sub>i</sub> / 0. Las células se preincubaron durante la noche con PTX (100 ng / ml) para inactivar las proteínas G sensibles a PTX y luego se cargaron con 2,5 μM de Fura-2 / AM en Krebs-Ringer-HEPES que contenía 0,05% de BSA,

pH 7,4, durante 1 hora. a 37 ° C para medir la movilización de Ca ++, las células se lavaron y separaron mediante tripsinización suave con EDTA. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo con 1 µg / ml de Wnt5a (panel A) o Wnt3a (panel B), utilizando un espectrómetro de luminiscencia Aminco-Bowman Serie 2. C) El pretratamiento de células con PTX no afecta la actividad transcripcional mediada por β-catenina inducida por Wnt3a. Las células se cotransfectaron con los plásmidos reporteros pRL y TOPFlash. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se privaron de suero durante 12 horas y se incubaron durante la noche en ausencia o presencia de PTX (100 ng / ml). Luego, las células se incubaron en ausencia o presencia de Wnt3a (500 ng / ml) durante un período de 8 h. Después de la incubación, las células se lavaron, lisaron y se ensayó la actividad luciferasa. La actividad se normalizó con respecto a la actividad de la luciferasa de *Renilla* o con respecto al contenido de proteína total en cada muestra. \*\* p <0.01 D) Las células RKO se marcaron con myo- [23H] -inositol durante 18-24 h, se lavaron con tampón Krebs-Ringer-Hepes que contenía CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM y se incubaron durante 20 min en el mismo tampón que contenía LiCl 10 mM a 37 ° C en 1 atm de CO<sub>2</sub> al 5%. Las incubaciones con Wnt5a se realizaron durante los tiempos indicados y la estimulación se detuvo mediante la adición de cloroformo / metanol enfriado con hielo (1: 2, v / v). Los fosfatos de inositol totales se separaron mediante cromatografía Dowex AG1-X8 y se evaluó el IP<sub>3</sub> producido en los tiempos indicados. Los resultados presentados en cada panel son representativos de al menos tres experimentos que utilizan diferentes preparaciones de células. \* p <0.05; \*\* p <0.01

## **8.6. LA FUNCIÓN DE TIROSINA CINASA DE ROR2 NO ES NECESARIA PARA ACTIVAR PLC EN LAS CÉLULAS RKO, PERO ES NECESARIA PARA ANTAGONIZAR LA SEÑALIZACIÓN CANÓNICA WNT INDUCIDA POR Wnt3a**

Es bien sabido que Wnt5a puede unirse no sólo a los receptores de FZDs sino también al receptor tipo tirosina cinasa Ror2. Ror2 también puede unirse a los ligandos canónicos y no canónicos como correceptor junto a FZD<sup>93</sup>. También se ha informado de que la actividad tirosina cinasa de Ror2 es necesaria para los efectos inhibidores de Wnt5a sobre la señalización de Wnt / β-catenina<sup>93,94</sup>. En contraste, otros autores han encontrado que el dominio citoplásmico de Ror2, donde se encuentra el dominio cinasa, es prescindible para su función<sup>95</sup>. Dado que se encontró que las células de cáncer de colon expresan Ror2 y que

Wnt5a antagoniza la actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina inducida por Wnt3a en células RKO, se investigó a continuación si la actividad de cinasa de Ror2 se requiere para la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por Wnt5a, así como para la capacidad de Wnt5a de antagonizar la actividad transcripcional de  $\beta$ -catenina inducida por Wnt3a. Con este fin, se transfectaron células RKO con el gen silvestre de Ror2 o con el gen de Ror2 con la función de tirosina cinasa inactiva para examinar los efectos de su sobreexpresión en las células RKO. La Figura 11 (Panel A) muestra que tanto el tipo silvestre como el mutante deficiente en cinasa Ror2 Y641,645,646F se expresaron a niveles equivalentes en células RKO transfectadas. Curiosamente, los resultados presentados en la Figura 11 (Panel B) mostraron claramente que la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por el tratamiento con Wnt5a de las células RKO no se vio afectada en absoluto por la expresión del mutante Ror2 deficiente en cinasa de Tyr en comparación con las células que expresan Ror2 de tipo silvestre. Sin embargo, en las células RKO transfectadas con el reportero de señalización Wnt canónico, junto con el Ror2 de tipo silvestre o con el Ror2 mutado deficiente en actividad de Tyr cinasa, la capacidad de Wnt5a para antagonizar la actividad transcripcional mediada por  $\beta$ -catenina inducida por Wnt3a (expresada como unidades relativas de luciferasa) se vio afectada negativamente de manera significativa en comparación con el control o con las células que expresan Ror de tipo silvestre, como se puede observar en la Figura 11 (Panel C). Por lo tanto, estos resultados indican que la señalización de Wnt5a opera de forma dual, activando la vía Wnt /  $\text{Ca}^{2+}$  de una manera independiente de la actividad de Tyr cinasa de Ror2 e inhibiendo la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina de una manera dependiente de la actividad de Tyr cinasa de Ror2 en las células de cáncer de colon.

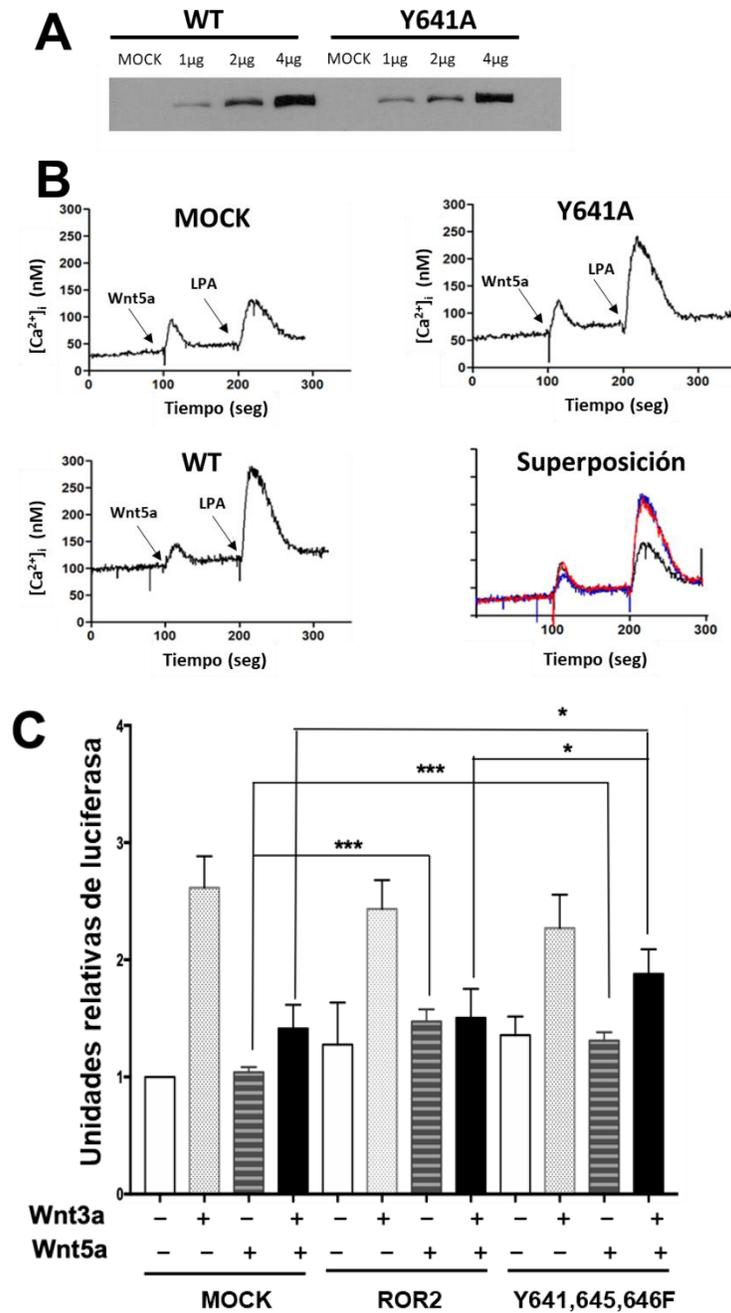


Figura 11. **No se requiere la actividad de tirosina cinasa de Ror2 para que Wnt5a induzca la movilización de  $Ca^{2+}$ .** A) Se transfectaron células RKO con cantidades crecientes de plásmido que codifica Ror2 de tipo silvestre o Ror2 sin actividad cinasa (Y641, 645, 646F), se utilizó el plásmido vacío (MOCK) como control. B) 24 h después de la transfección, las células RKO se privaron de suero durante la noche y luego se cargaron con 2,5  $\mu$ M de Fura-2 / AM en Krebs-Ringer-HEPES que contenía BSA al 0.05%, pH 7.4, durante

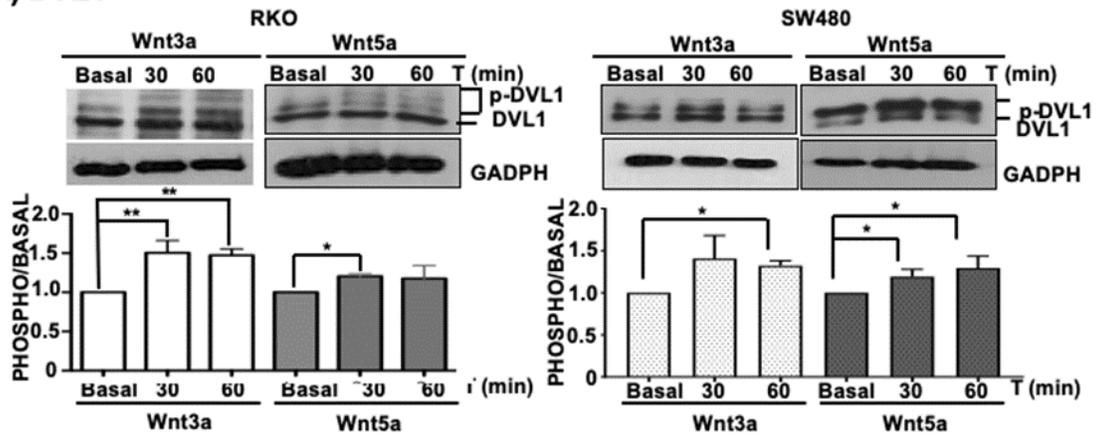
1 hora a 37 ° C. Las células se lavaron y separaron mediante tripsinización suave con EDTA. Las mediciones de fluorescencia se llevaron a cabo con Wnt5a (1 µg / ml) utilizando un espectrómetro de luminiscencia Aminco-Bowman Serie 2. Se utilizó LPA como control positivo. Las trazas son representativas de tres experimentos que utilizan diferentes preparaciones de células. C) Se requiere actividad de Ror2-tirosina cinasa para antagonizar la señalización de Wnt canónica por Wnt5a en células de cáncer de colon RKO. Las células se cotransfectaron con el plásmido pTOPFlash y con el vector de plásmido vacío (MOCK) o con el plásmido que codifica Ror2 de tipo silvestre o Ror2 sin actividad de cinasa (Y641, 645, 646F). 24 horas después de la transfección, las células RKO se privaron de suero durante 12 h y luego se incubaron con Wnt3a (200 ng / ml), Wnt5a (200 ng / ml) o ambos para estimular las células durante un período de 8 h. Después de la incubación, las células se lavaron, lisaron y se ensayó la actividad luciferasa. La actividad se normalizó con respecto a la actividad de la luciferasa de *Renilla* o con respecto al contenido de proteína en cada muestra. Los resultados representan las medias ± SEM de al menos tres experimentos independientes. \* p <0.05; \*\*\* p <0.001.

### **8.7. TANTO Wnt5a COMO Wnt3a INDUCEN HIPERFOSFORILACIÓN Y ESTABILIZACIÓN SIMULTÁNEAS DE Dvl1, Dvl2 Y Dvl3**

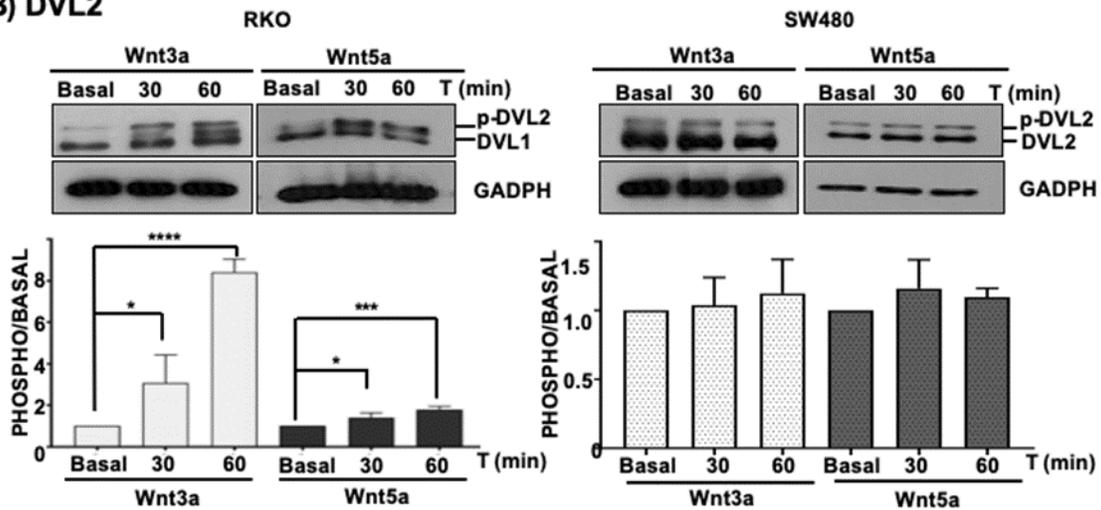
La proteína Dvl actúa como punto de ramificación en la vía de señalización mediada por los distintos ligandos Wnt, por esto son componentes esenciales de la señalización tanto canónica como no canónica. Se ha reportado anteriormente que Dvl1, Dvl2 y Dvl3 se sobreexpresan en las células de cáncer de colon en comparación con las células de colon no malignas. También se ha reportado que el tratamiento con Wnt3a induce rápidamente la hiperfosforilación y estabilización de Dvl2 y Dvl3 y que la fosforilación de Dvl3 inducida por Wnt3a-PKCζ es necesaria para evitar la degradación de Dvl3 a través del proteasoma. Para caracterizar mejor la señalización no canónica en las células de cáncer de colon, examinamos aquí el efecto del tratamiento de células con Wnt5a en comparación con el tratamiento con Wnt3a sobre la fosforilación y la ubicación intracelular de Dvl. Las líneas celulares de carcinoma de colon RKO y SW480 se seleccionaron de nuevo como ejemplos representativos de señalización Wnt normal y señalización Wnt canónica constitutivamente activa, respectivamente. La Figura 12 (Páneos A, B y C) muestra los cursos temporales de

fosforilación para cada isoforma de Dvl en respuesta a Wnt5a o Wnt3a, comparando los datos obtenidos en células RKO contra los de células SW480. La especificidad de los anticuerpos Dvl contra cada isoforma Dvl se confirmó en células HEK-293, como se muestra en la Figura S1 complementaria. La fosforilación se visualizó como un cambio inducido por Wnt en la movilidad electroforética de las tres isoformas de Dvl, visualizadas en el Western blot como dos bandas correspondientes a Dvl fosforilado (P-Dvl, banda superior) y Dvl (banda inferior). Sorprendentemente, se puede ver en estas figuras que ambos ligandos indujeron la fosforilación y acumulación simultáneas de las tres isoformas de Dvl en ambos tipos de células de cáncer de colon.

### A) DVL1



### B) DVL2



### C) DVL3

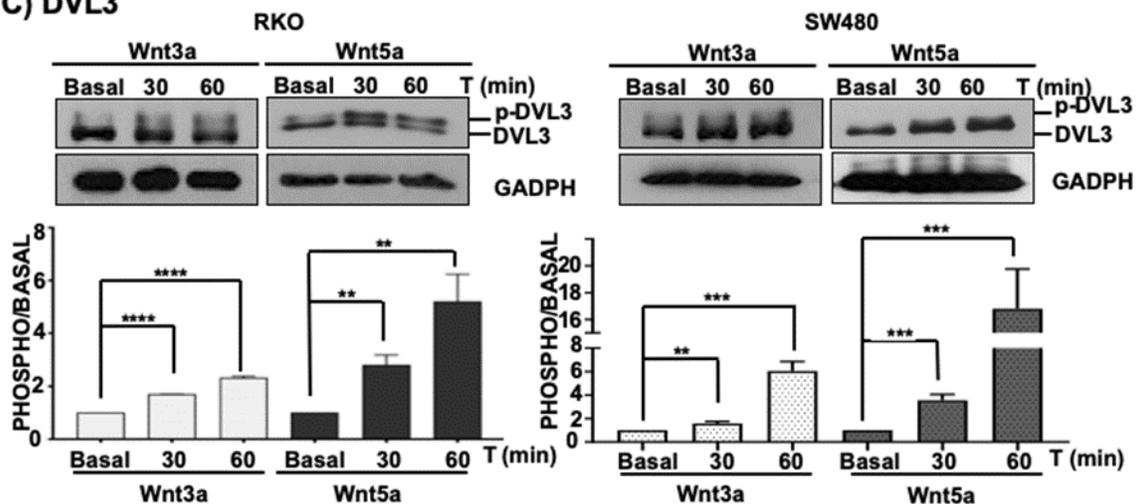


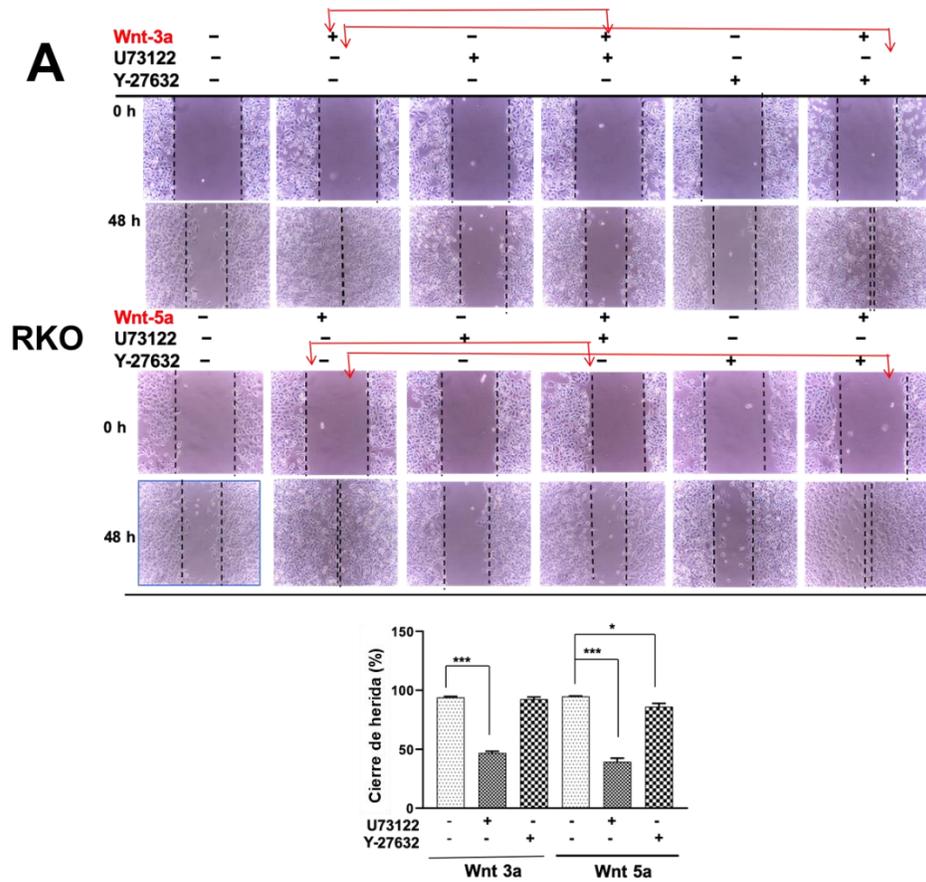
Figura 12. DVL1, 2 y 3 se fosforilan y estabilizan en respuesta a los ligandos Wnt5a y Wnt3a. Se presentan los cursos temporales de fosforilación de isoformas Dvl inducida por Wnt3a y Wnt5a en células RKO y SW480 de cáncer de colon. Las células RKO y SW480 se

incubaron en ausencia (basal o Tiempo 0) o presencia de Wnt3a o Wnt5a (300 ng / ml) durante 30 o 60 min. A continuación, las células se lavaron, lisaron y las muestras de extractos celulares totales (100 µg) se sometieron a SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de PVDF. El análisis del Western Blot se realizó usando anticuerpos contra cada isoforma de Dvl como se indica en cada panel o contra GAPDH (usado como un control de carga igual). Se realizó un análisis densitométrico para estimar el nivel total de cada expresión de isoforma Dvl (bandas P-Dvl y Dvl) en células malignas RKO y SW480 que se normalizaban con respecto a la fosforilación basal endógena. Los datos representan las medias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### **8.8. TANTO Wnt5a COMO Wnt3a PROMUEVEN LA MIGRACIÓN CELULAR DEPENDIENTE DE PLC EN RKO Y EN CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON SW480**

Las cascadas de señalización Wnt independientes de  $\beta$ -catenina están involucradas en la regulación de la polaridad celular, el movimiento celular direccional y la migración celular, activando efectores río abajo tales como ROCK (inhibido por Y27632) o PLC (inhibido por U73122). Para investigar los efectos de Wnt5a y Wnt3a sobre la migración celular, realizamos ensayos de cierre de heridas (Wound-healing) en células de cáncer de colon RKO y SW480. Con este propósito, las células se cultivaron hasta la confluencia y luego se hicieron raspaduras en la monocapa celular. Los márgenes de la herida se fotografiaron en este momento ( $t = 0$  h). A continuación, las células se cultivaron en medio complementado con FBS al 0,05% en ausencia o presencia de ligandos Wnt5a o Wnt3a y en ausencia o presencia del inhibidor de PLC U-73122 o el inhibidor de RhoK Y-27632 durante un máximo de 48 h, para explorar la posibilidad de dependencia de la activación de PLC y/o de RhoK de la migración celular. Los resultados obtenidos en las células RKO (Fig. 13, panel A) y SW480 (Fig. 13, panel B) mostraron que tanto el ligando Wnt5a (prototipo no canónico) como el ligando Wnt3a (prototipo canónico) estimularon la migración celular en células de cáncer de colon RKO (Fig. 13, panel A) y SW480 (Fig. 13, panel B). Además, se puede ver en la Figura 13 (Panel A) que mientras que la migración inducida por Wnt5a o por Wnt3a en células RKO se bloqueó principalmente con el inhibidor de PLC U73122 y muy poco con el

inhibidor de RhoK Y-27632, sorprendentemente, la migración de células SW480 (Fig. 13, panel B) inducida por Wnt5a o por Wnt3a se bloqueó significativamente tanto por el inhibidor de PLC como por el inhibidor de RhoK.



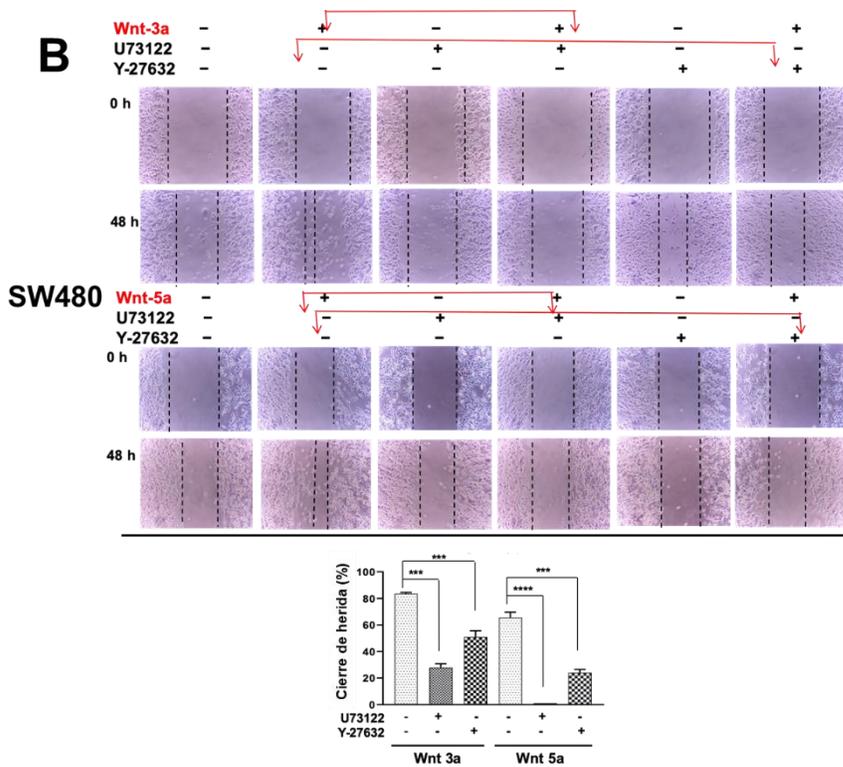


Figura 13. El ligando canónico Wnt3a y el ligando no canónico Wnt5a promueven la migración dependiente de PLC en células de cáncer de colon RKO o SW480. Las células se sembraron hasta la confluencia en portaobjetos revestidos con poli-D-lisina en medio de cultivo al que se le añadió FBS al 5%. Después de 24 h, se hizo un surco (herida) a la monocapa celular utilizando una punta estéril de micropipeta. Los cultivos se lavaron con PBS. En este momento (t = 0 h), se fotografiaron los márgenes de la herida. A continuación, las células se cultivaron en medio suplementado con FBS al 0,05% en ausencia o presencia de 300 ng / ml de ligandos Wnt3a o Wnt5a y en ausencia o presencia del inhibidor de PLC U-73122 (4  $\mu$ M) o inhibidor de RhoK Y-27632. (10  $\mu$ M) durante un máximo de 48 h, y se fotografiaron los márgenes de la herida. Las imágenes se analizaron usando el programa Image J y luego se calculó el porcentaje de cierre de la herida de al menos tres experimentos independientes. Los datos representan las medias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes \* p <0.05; \*\* p <0.01; \*\*\* p <0.001; \*\*\*\* p <0.0001.

## 9. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La señalización Wnt se ha definido como uno de los contribuyentes más importantes a la tumorigénesis. Aunque está bien establecido que la señalización Wnt canónica se activa de forma aberrante en la mayoría de los cánceres colorrectales (CCR), la implicación de la señalización Wnt no canónica en la carcinogénesis y en la progresión del CCR aún no está clara. La señalización no canónica Wnt, la cual es independiente de la actividad transcripcional de la  $\beta$ -catenina, abarca varias cascadas de señalización, que regulan la migración celular y la polaridad durante la morfogénesis embrionaria. Es importante destacar que la pérdida de la adhesión normal y la polaridad celular, junto con la adquisición de motilidad e invasividad, también son pasos fundamentales durante la progresión del tumor y la metástasis.

Los Frizzles (FZD) funcionan como receptores no convencionales acoplados a proteína G (clase F) que son activados por la familia Wnt de lipoglicoproteínas secretadas. En mamíferos, diecinueve Wnts pueden unirse a 10 FZD, activando así diferentes vías tales como Wnt /  $\beta$ -catenina, Wnt / polaridad celular planar y Wnt /  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>17,18</sup>. Sin embargo, muchos aspectos de los eventos iniciales en la transducción de la señal siguen siendo poco conocidos. Por ejemplo, el reconocimiento selectivo de Wnts o la capacidad de "decodificación" sigue siendo enigmático porque las interacciones Wnt / Frizzled son en gran medida incompatibles con el reconocimiento monoespecífico. A este respecto, aunque recientemente se ha reportado la existencia de módulos de decodificación de Wnt en las células que distinguen entre los ligandos de Wnt y permiten que las células respondan a un ligando Wnt particular de forma selectiva<sup>25</sup>, el grado de especificidad de unión de Wnt / FZD en los mamíferos permanece poco claro. Además, también es poco comprendida la participación de las proteínas G heterotriméricas en la señalización Wnt, ya que algunas respuestas parecen ser independientes de ellas, así como de qué depende la especificidad de los FZD para acoplarse a una proteína G o a otra, y activar selectivamente las vías de señalización río abajo <sup>13,14</sup>. Históricamente, solo la ruta Wnt /  $\text{Ca}^{2+}$  ha sido reconocida como la ruta Wnt dependiente de proteína G, pero la evidencia experimental acumulada ha demostrado que las proteínas G heterotriméricas desempeñan un papel más global en la red de señalización Wnt, incluida la ruta Wnt /  $\beta$ -catenina <sup>14</sup>. Kilander et al. <sup>26</sup> compararon las

capacidades de señalización de varios Wnt recombinantes en la línea celular tipo microglía N13 y observaron que solo Wnt3a inducía la señalización de Wnt /  $\beta$ -catenina, mientras que todos los Wnt sondeados (Wnt3a, Wnt-4, Wnt -5a, Wnt5b, Wnt-7a y Wnt-9b) condujeron a la activación de proteínas G heterotriméricas sensibles a la toxina pertussis (PTX) <sup>14,36</sup>. Sorprendentemente, aquí encontramos que Wnt5a depende parcialmente de la proteína G (Gi / 0) sensible a PTX para activar la fosfolipasa C, sugiriendo que alguna otra proteína G pudiera estar también involucrada en su señalización, tal como la proteína Gq.

Gregorieff y col. <sup>20</sup> han informado previamente el patrón de expresión de FZD4, FZD6, FZD7 y la proteína 5 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP5) en las células epiteliales de la cripta, y la expresión de FZD4 y FZD6 en células epiteliales y mesenquimales diferenciadas del intestino delgado y el colon. En particular, Holcombe et al. <sup>21</sup> reportaron que el cáncer de colon se caracteriza por la expresión aberrante de genes Wnt específicos y receptores FZD. Encontraron cambios en la expresión de algunos ligandos y receptores en el cáncer de colon en comparación con la mucosa colónica normal y, curiosamente, observaron un alto grado de expresión del receptor FZD, especialmente en el margen de invasión celular en tumores poco diferenciados. De acuerdo con esto, aquí encontramos un claro contraste entre los niveles de expresión y la variedad de receptores Wnt expresados en células de cáncer de colon en comparación con células de colon no malignas. Sin embargo, la cuestión de por qué las células de cáncer de colon necesitan tantas proteínas Wnts y receptores Frizzled sigue sin dilucidarse.

El elemento de unión intracelular más ampliamente reconocido para los receptores de clase FZD es la proteína de andamiaje DVL, que funciona en la encrucijada de las vías Wnt /  $\beta$ -catenina y Wnt no canónicas<sup>23</sup>. Se ha reportado que Dvl1, Dvl2 y Dvl3 se sobreexpresan en las células de cáncer de colon en comparación con las células de colon no malignas <sup>24</sup>. Además, es bien sabido que la proteína cinasa C (PKC) es uno de los efectores claves de la señalización no canónica Wnt, particularmente en la vía Wnt /  $\text{Ca}^{2+}$ , y también se ha demostrado previamente que la actividad de señalización y la estabilidad de Dvl están reguladas positivamente por fosforilación mediada por PKC $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\zeta$  en respuesta al tratamiento con Wnt3a <sup>24</sup>. A este respecto, se ha demostrado que la fosforilación inducida por Wnt3a de Dvl3 por PKC $\zeta$  es necesaria para evitar la degradación de Dvl3 a través del proteosoma <sup>24</sup>. Sin embargo, aunque es bien sabido que un ligando Wnt puede estimular más

de una isoforma de Dvl, aquí encontramos que Dvl activado por ligando puede participar simultáneamente en las vías tanto canónicas como no canónicas de Wnt. Curiosamente, también mostramos aquí que, aunque tanto Wnt5a como Wnt3a estimulan simultáneamente las tres isoformas de Dvl, no producen los mismos efectos en ellas, ya que observamos que mientras Wnt5a indujo la reubicación de Dvl2 a la membrana celular y al núcleo después de 30 min, Wnt3a indujo la reubicación de Dvl2 al citoplasma y al núcleo, pero después de 60 min de tratamiento.

Está bien establecido que Ror1 y Ror2 son receptores o correceptores para Wnts, particularmente para Wnt5a. A este respecto, se ha informado que Wnt5a es capaz de inducir homodimerización y autofosforilación de Ror2 <sup>19,27 y 28</sup>, que recuerda a los mecanismos de activación inducidos por ligandos descritos para otros receptores con actividad de Tyr cinasa (RTKs). Según esto, Mikels et al. <sup>36</sup> han demostrado mediante análisis de mutación y delección del receptor Ror2 que la actividad de tirosina cinasa es necesaria para que Ror2 medie los efectos inhibidores de la señalización de Wnt5a sobre la señalización canónica de Wnt. Nuestros resultados concuerdan con esto, ya que encontramos en este estudio que las células RKO de cáncer de colon que expresaban Ror2 nulo en su actividad de tirosina cinasa mostraron una disminución en la capacidad de Wnt5a para antagonizar la señalización canónica /  $\beta$ -catenina inducida por Wnt3a, en comparación con células que expresaban el tipo silvestre de Ror2. Sin embargo, y de manera interesante, también encontramos que la movilización de  $Ca^{2+}$  inducida por Wnt5a en estas células no se vió afectada por la expresión de Ror2 de tipo silvestre o mutante, de acuerdo con otros informes que indican que Ror2 también puede producir respuestas independientes de su actividad de cinasa <sup>22,23</sup>.

El principal hallazgo obtenido en este trabajo fue la demostración de que las vías Wnt/  $Ca^{2+}$  y Wnt / beta-catenina pueden ser activadas simultáneamente por un mismo ligando, en este caso Wnt3a, y que las rutas canónicas y no canónicas son interdependientes. Por lo tanto, los ligandos Wnt parecen inducir redes de señalización complejas que integran múltiples vías en lugar de activar alternativamente una única ruta lineal. De acuerdo con esta noción, la acumulación de evidencia experimental ha desafiado la noción de que las vías canónicas y no canónicas operan de manera independiente o antagónica, como generalmente se ha considerado hasta ahora. En este sentido, Thrasivoulou et al. en 2013 <sup>22</sup> proporcionó la primera evidencia de que seis de siete ligandos Wnt, [incluidos los ligandos Wnt que antes

se pensaba que actuaban solo a través de la beta-catenina (Wnt 3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt9b y Wnt10b)] aumentan los niveles intracelulares e intranucleares de  $Ca^{2+}$  con cinéticas distintas en varias líneas celulares de cáncer (líneas celulares de cáncer de próstata, mama y vejiga), proponiendo un modelo convergente de red de señalización Wnt donde las vías de  $Ca^{2+}$  y  $\beta$ -catenina pueden actuar de manera coordinada <sup>22</sup>. Nuestros datos están de acuerdo con esto ya que inesperadamente encontramos que en células de cáncer de colon con diferentes contextos genéticos de señalización Wnt (normal o constitutivamente activa), tanto Wnt5a como Wnt3a promueven la movilización de  $Ca^{2+}$  y la migración celular dependiente de PLC. Además, Grumolato et al.<sup>29</sup> demostraron que los ligandos Wnt3a canónicos prototipo y Wnt5a no canónicos activan específicamente co-receptores endógenos completamente no relacionados, LRP5 / 6 y Ror1 / 2, respectivamente, pero río abajo en la señalización, sí comparten elementos tales como Dvl, axin y GSK-3beta <sup>29</sup>. En apoyo de esto, también se ha reportado que tanto Wnt3a, un ligando canónico prototipo, y Wnt5a, un ligando no canónico prototipo, inducen un aumento en la actividad de GSK-3 $\beta$  en células de cáncer de colon <sup>30</sup>. Sin embargo, las consecuencias que produce cada uno en la célula son diferentes, dependiendo de cuál complejo receptor-correceptor interaccione con el ligando en la membrana: el Wnt3a canónico promueve la fosforilación mediada por GSK-3 $\beta$  y la regulación positiva del correceptor LRP5/6 para participar en la formación del signalosoma, mientras que Wnt5a no canónico promueve la fosforilación de Ror2 en Ser864 para inducir la migración celular. En este sentido, Yamamoto et al. <sup>31</sup> demostraron por primera vez que Ror2 se fosforila en residuos de serina / treonina tras la estimulación de células cultivadas que expresan Ror2 de forma endógena con Wnt5a pero no con Wnt3a y que la inhibición o el agotamiento de GSK-3beta bloquea esta fosforilación y migración celular.

Finalmente, reforzando la visión de la señalización Wnt como un todo, Van Amerongen y Nusse <sup>23</sup> han discutido que la evidencia experimental y los modelos actuales de señalización Wnt tanto en el desarrollo como en la enfermedad son insuficientes para explicar las respuestas complejas que a menudo se observan y han propuesto una nueva visión que considera la integración de múltiples estímulos, a menudo simultáneos, a nivel de la unión del receptor Wnt y la respuesta intracelular posterior. Nuestros datos presentados aquí y los reportados anteriormente <sup>22, 23, 29 y 31</sup> están completamente de acuerdo con este nuevo concepto.

## 10. CONCLUSIONES

Las células malignas expresan una mayor cantidad y diversidad de receptores para ligandos Wnt en comparación con células no malignas

Solamente Wnt3a estimula la actividad transcripcional mediada por B-catenina y por lo tanto es ligando canónico.

Wnt5a no estimula la actividad transcripcional mediada por beta-catenina, pero sí la reprime. En este sentido es no canónico. Wnt5a, además requiere la actividad de tirosina cinasa de Ror2 para antagonizar la vía canónica.

Tanto los ligandos canónicos como no canónicos son capaces de estimular PLC, movilizar Ca<sup>2+</sup> y estimular migración celular

Wnt5a estimula parcialmente a PLC a través de proteína G sensible a PTx

Tanto Wnt3a como Wnt5a inducen simultáneamente hiperfosforilación y estabilización de Dvl1, Dvl2 y Dvl-3

Nuestros resultados refuerzan el modelo actual de señalización Wnt, que propone que la vía Wnt opera como un todo, en el que podemos obtener respuestas simultáneas canónicas y no canónicas por un solo ligando.

## 11. PERSPECTIVAS

Se deben realizar trabajos encaminados a dilucidar cuál es el mecanismo mediante el cual los ligandos Wnt discriminan y se unen selectivamente a un receptor o complejo receptor/co-receptor para activar la respuesta deseada según el contexto celular. También es necesario profundizar en la compleja red de eventos río abajo del receptor una vez activada la señalización; cómo decide la célula cuál o cuáles de las posibles rutas de transducción se potenciarán y cuáles se atenuarán una vez activado un receptor específico por un ligando específico.

Se puede investigar si alguna otra proteína G está involucrada en la señalización de Wnt5a utilizando inhibidores específicos de proteína G, por ejemplo para proteína Gq.

Se puede investigar qué papel juegan las vías Wnt no canónicas en células troncales, y en células troncales cancerosas.

Se debe investigar si la ruta Wnt no canónica tiene algún otro efecto en el fenotipo tumoral y cuáles son los mecanismos moleculares involucrados. Una vez sabido esto, se deberá trabajar para encontrar mecanismos efectivos de regular eventos relacionados a la iniciación y progresión maligna con el fin de desarrollar terapias efectivas que ayuden a las personas que sufren este padecimiento.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer. Organización Mundial de la salud. <https://gco.iarc.fr/today/home>
2. Jeong WJ, Yoon J, Park JC, Lee SH, Lee SH, Kaduwal S, Kim H, Yoon JB, Choi KY. Ras stabilization through aberrant activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes intestinal tumorigenesis. *Sci Signal*. 2012 Apr 10;5(219):ra30. doi: 10.1126/scisignal.2002242. PMID: 22494971.
3. Debebe Z, Rathmell WK. Ror2 as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther*. 2015 Jun; 150:143-8. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.01.010. Epub 2015 Jan 19. PMID: 25614331.
4. Gujral TS, Chan M, Peshkin L, Sorger PK, Kirschner MW, MacBeath G. A noncanonical Frizzled2 pathway regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cell*. 2014 Nov 6;159(4):844-56. doi: 10.1016/j.cell.2014.10.032. PMID: 25417160; PMCID: PMC4243058.
5. Arthofer E, Hot B, Petersen J, Strakova K, Jäger S, Grundmann M, Kostenis E, Gutkind JS, Schulte G. WNT Stimulation Dissociates a Frizzled 4 Inactive-State Complex with  $G\alpha_{12/13}$ . *Mol Pharmacol*. 2016 Oct;90(4):447-59. doi: 10.1124/mol.116.104919. Epub 2016 Jul 25. PMID: 27458145; PMCID: PMC5034691.
6. Dijksterhuis JP, Petersen J, Schulte G. WNT/Frizzled signalling: receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signalling and its physiological relevance: IUPHAR Review 3. *Br J Pharmacol*. 2014 Mar;171(5):1195-209. doi: 10.1111/bph.12364. PMID: 24032637; PMCID: PMC3952798.
7. Aldaco-Sarvide F., Pérez-Pérez P., Cervantes-Sánchez G., Torrecillas-Torres L., Erazo-V A. E. Mortalidad por cáncer en México 2000-2010: el recuento de los daños. *Gaceta Mexicana de Oncología*. Vol. 11. Núm. 6. Páginas 371-379 (Noviembre 2012)
8. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Comunicado de prensa núm. 105/21. 4 de febrero de 2021.
9. INEGI. 2018. Red Nacional de Metadatos. Estadísticas Vitales. Mortalidad, Defunciones Generales 2017. <https://www.inegi.org.mx/rnm/index.php/catalog/407/datafile/F5/V158>
10. OPS/OMS. 2020. Cáncer. <https://www.paho.org/es/temas/cancer>
11. Mondragón-Sánchez R y Fuentes-Carrasco M. Variaciones en un periodo de 24 años del cáncer colorrectal y gástrico en México. *Rev Gastroenterol Mex*, Vol 68, Núm 2, 2003.
12. Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2016). Guyton y Hall: Compendio de fisiología médica (13a ed. pp. 797-847. Barcelona: Elsevier.

13. Radtke, F. Clevers, H. 2005. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*. 307: 1904-1909.
14. Sancho, E., Batlle, E., & Clevers, H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), 695–723. doi:10.1146/annurev.cellbio.20.010403.
15. Sherr, C. J. (1996). Cancer Cell Cycles. *Science*, 274(5293), 1672–1677. doi:10.1126/science.274.5293.1672.
16. van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*. 2009;71:241-60. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163145. PMID: 18808327.
17. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*. 2017 Mar;36(11):1461-1473. doi: 10.1038/onc.2016.304. Epub 2016 Sep 12. PMID: 27617575; PMCID: PMC5357762.
18. Bienz, M. Clevers, H. 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*. 103: 311-20.
19. Logan, CY. Nusse, R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 20: 781-810.
20. Miller, J.R. The Wnts. *Genome Biol* 3, reviews3001.1 (2001). <https://doi.org/10.1186/gb-2001-3-1-reviews3001>
21. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 15: 638-642.
22. He, T.C et al. 1998. Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. (1998) *Science* 4: 1509-1512.
23. Angers, S., Moon, R. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 468–477 (2009). <https://doi.org/10.1038/nrm2717>.
24. Oishi I, Suzuki H, Onishi N, et al. The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signaling pathway. *Genes Cells* 2003;8:645^54.
25. Lu X, Borchers AG, Jolicoeur C, et al. PTK7/CCK-4 is a novel regulator of planar cell polarity in vertebrates. *Nature* 2004;430:93^ 8.
26. Lu W, Yamamoto V, Ortega B, et al. Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 2004;119:97^108.

27. Tao W, Pennica D, Xu L, et al. Wrch-1, a novel member of the Rho gene family that is regulated by Wnt-1. *Genes Dev* 2001;15:1796-807.
28. Boutros M, Paricio N, Strutt DI, et al. Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling. *Cell* 1998;94:109-18.
29. Ishitani T, Kishida S, Hyodo-Miura J, et al. The TAK1-NLK mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca<sup>2+</sup> pathway to antagonize Wnt/beta-catenin signaling. *Mol Cell Biol* 2003;23:131-9.
30. Katoh Y, Katoh M. Conserved POU-binding site linked to SP1-binding site within FZD5 promoter: Transcriptional mechanisms of FZD5 in undifferentiated human ES cells, fetal liver/spleen, adult colon, pancreatic islet, and diffuse-type gastric cancer. *Int J Oncol*. 2007 Mar;30(3):751-5. PMID: 17273778.
31. Masuko Katoh and Masaru Katoh. 2007. WNT Signaling Pathway and Stem Cell Signaling Network. *Clin Cancer Res*;13(14): 4042-4045.
32. Rathinam R, Berrier A, Alahari SK. Role of Rho GTPases and their regulators in cancer progression. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011 Jun 1;16(7):2561-71. doi: 10.2741/3872. PMID: 21622195.
33. Katoh M. Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. *Stem Cell Rev*. 2007 Jan;3(1):30-8. doi: 10.1007/s12015-007-0006-6. PMID: 17873379.
34. Isakov, N. (2018). Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Seminars in Cancer Biology*, 48, 36-52. doi:10.1016/j.semcancer.2017.04.012
35. Gokmen-Polar, Y., Murray, N., Velasco, M., Gatalica, Z., Fields, A. 2001. Elevated protein kinase C  $\beta$ -II is an early promotive event in colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 61: 1375-1381.
36. Schenkelaars Q, Fierro-Constain L, Renard E, Hill AL, Borchiellini C. Insights into Frizzled evolution and new perspectives. *Evolution & Development*. 2015;17(2):160-169.
37. Chen W, ten Berge D, Brown J, Ahn S, Hu LA, Miller WE, Caron MG, Barak LS, Nusse R, Lefkowitz RJ. Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science*. 2003;301:1391-1394. doi: 10.1126/science.1082808.
38. Dubois L, Lecourtois M, Alexandre C, Hirst E, Vincent JP. Regulated endocytic routing modulates wingless signaling in *Drosophila* embryos. *Cell*. 2001;105:613-624. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00375-0.
39. Wang Y, Macke JP, Abella BS, Andreasson K, Worley P, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J. A large family of putative transmembrane receptors homologous to

the product of the *Drosophila* tissue polarity gene frizzled. *J Biol Chem.* 1996;271:4468–4476. doi: 10.1074/jbc.271.8.4468.

40. The Wnt Gene Homepage. <http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>

41. Thorpe CJ, Schlesinger A, Bowerman B. Wnt signalling in *Caenorhabditis elegans*: regulating repressors and polarizing the cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 2000;10:10–17. doi: 10.1016/S0962-8924(99)01672-4.

42. Gradl D, Kuhl M, Wedlich D. Keeping a close eye on Wnt-1/wg signaling in *Xenopus*. *Mech Dev.* 1999;86:3–15. doi: 10.1016/S0925-4773(99)00129-X.

43. Ueno K, Hiura M, Suehiro Y, Hazama S, Hirata H, Oka M, Imai K, Dahiya R, Hinoda Y. Frizzled-7 as a potential therapeutic target in colorectal cancer. *Neoplasia.* 2008 Jul;10(7):697-705. doi: 10.1593/neo.08320. PMID: 18592008; PMCID: PMC2435005.

44. Holcombe RF, Marsh JL, Waterman ML, et al. Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma. *Molecular Pathology* 2002;55:220-226.

45. Kumawat, K., & Gosens, R. (2016). WNT-5A: signaling and functions in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 73(3), 567–587. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2076-y>

46. Ring L, Neth P, Weber C, Steffens S, and Faussner A. 2014.  $\beta$ -Catenin-dependent pathway activation by both promiscuous “canonical” WNT3a–, and specific “noncanonical” WNT4– and WNT5a–FZD receptor combinations with strong differences in LRP5 and LRP6 dependency. *Cellular Signalling*. Volume 26, Issue 2, February 2014, Pages 260-267

47. Slusarski DC, Corces VG, Moon RT. Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature.* 1997 Nov 27;390(6658):410-3. doi: 10.1038/37138. PMID: 9389482.

48. Azimian-Zavareh, V., Dehghani-Ghobadi, Z., Ebrahimi, M. et al. Wnt5A modulates integrin expression in a receptor-dependent manner in ovarian cancer cells. *Sci Rep* 11, 5885 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85356-6>

49. Minami, Y., Oishi, I., Endo, M., and Nishita, M. (2009). Ror-family Receptor Tyrosine Kinases in Noncanonical Wnt Signaling: Their Implications in Developmental Morphogenesis and Human Diseases. *Dev. Dyn.* 239, NA. doi:10.1002/dvdy.21991

50. Yu J, Chen L, Cui B, Widhopf GF 2nd, Shen Z, Wu R, Zhang L, Zhang S, Briggs SP, Kipps TJ. Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. *J Clin Invest.* 2016 Feb;126(2):585-98. doi: 10.1172/JCI83535. PMID: 26690702; PMCID: PMC4731190.

51. Povinelli BJ, Nemeth MJ. Wnt5a regulates hematopoietic stem cell proliferation and repopulation through the Ryk receptor. *Stem Cells*. 2014 Jan;32(1):105-15. doi: 10.1002/stem.1513. PMID: 23939973; PMCID: PMC5576736.
52. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol*. 2006 Apr;4(4):e115. doi: 10.1371/journal.pbio.0040115. Epub 2006 Apr 4. PMID: 16602827; PMCID: PMC1420652.
53. van Amerongen R, Fuerer C, Mizutani M, Nusse R. Wnt5a can both activate and repress Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during mouse embryonic development. *Dev Biol*. 2012 Sep 1;369(1):101-14. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.06.020. Epub 2012 Jul 4. PMID: 22771246; PMCID: PMC3435145.
54. Katoh M: WNT/PCP signaling pathway and human cancer. *Oncol Rep* 14: 1583-1588, 2005
55. Witze ES, Litman ES, Argast GM, Moon RT and Ahn NG: Wnt5a control of cell polarity and directional movement by polarized redistribution of adhesion receptors. *Science* 320:365-369, 2008.
56. Oishi I, Suzuki H, Onishi N, et al: Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* 8:645-654, 2003.
57. Zhang X, Zhu J, Yang GY, et al: Dishevelled promotes axon differentiation by regulating aPKC. *Nat Cell Biol* 9: 743-754, 2007.
58. Dejmeck J, Säfholm A, Kamp Nielsen C, Andersson T and Leandersson K: Wnt5a/Ca<sup>2+</sup>-induced NFAT activity is counter-acted by Wnt5a/Yes-Cdc42-CK1 $\cdot$  signaling in human mammary epithelial cells. *Mol Cell Biol* 26: 6024-6036, 2006.
59. Fukuda T, Chen L, Endo T, et al: Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 3047-3052, 2008.
60. Dissanayake SK, Wade M, Johnson CE, et al: The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282:17259-17271, 2007.
61. Swain RK, Katoh M, Medina A and Steinbeisser H: Xenopus frizzled-4S, a splicing variant of Xfz4, is a context-dependent activator and inhibitor of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Cell Commun Signal* 3: 12, 2005.
62. Lejeune S, Huguet EL, Hamby A, Poulson R and Harris AL: Wnt5a cloning, expression, and up-regulation in human primary breast cancers. *Clin Cancer Res* 1: 215-222, 1995.

63. Iozzo RV, Eichstetter I and Danielson KG: Aberrant expression of the growth factor Wnt5A in human malignancy. *Cancer Res* 55: 3495-3499, 1995.
64. Leris AC, Roberts TR, Jiang WG, Newbold RF and Mokbel K: WNT5A expression in human breast cancer. *Anticancer Res* 25:731-734, 2005.
65. Pukrop T, Klemm F, Hagemann T, et al: Wnt5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 5454-5459, 2006.
66. Huang CL, Liu D, Nakano J, et al: Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor: an expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23: 8765-8773, 2005.
67. Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, et al: Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell* 1: 279-288, 2002.
68. Kumagai T, Tomari K, Shimizu T and Takeda K: Alteration of gene expression in response to BMP2 in androgen-dependent human prostate cancer LNCaP cells. *Int J Mol Med* 17: 285-291, 2006.
69. Wang Q, Williamson M, Bott S, et al: Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer. *Oncogene* 26:6560-6565, 2007.
70. Bui TD, Zhang L, Rees MC, Bicknell R and Harris AL: Expression and hormone regulation of Wnt2, 3, 4, 5a, 7a, 7b and 10b in normal human endometrium and endometrial carcinoma. *Br J Cancer* 75: 1131-1136, 1997.
71. Saitoh T, Mine T and Katoh M: Frequent up-regulation of WNT5A mRNA in primary gastric cancer. *Int J Mol Med* 9: 515-519, 2002.
72. Smith K, Bui TD, Poulson R, Kaklamanis L, Williams G and Harris AL: Up-regulation of macrophage Wnt gene expression in adenoma-carcinoma progression of human colorectal cancer. *Br J Cancer* 81: 496-502, 1999.
73. Ying J, Li H, Yu J, et al: WNT5A exhibits tumor-suppressive activity through antagonizing the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, and is frequently methylated in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 14: 55-61, 2008.
74. Crnogorac-Jurcevic T, Efthimiou E, Capelli P, et al: Gene expression profiles of pancreatic cancer and stromal desmoplasia. *Oncogene* 20: 7437-7446, 2001.
75. Pilarsky C, Ammerpohl O, Sipos B, et al: Activation of Wnt signalling in stroma from pancreatic cancer identified by gene expression profiling. *J Cell Mol Med* 12: 2823-2835, 2008.
76. Saitoh T and Katoh M: Expression and regulation of WNT5A and WNT5B in human cancer. *Int J Mol Med* 10: 345-349, 2002.

77. Uren A, Wolf V, Sun YF, Azari A, Rubin JS and Toretsky JA: Wnt/Frizzled signaling in Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 43: 243-249, 2004.
78. Blanc E, Le Roux G, Bénard J and Raguénez G: Low expression of Wnt5a gene is associated with high-risk neuroblastoma. *Oncogene* 24: 1277-1283, 2005.
79. Bonifas JM, Pennypacker S, Chuang PT, et al: Activation of expression of Hedgehog target genes in basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol* 116: 739-742, 2001.
80. Haider AS, Peters SB, Kaporis H, et al: Genomic analysis defines a cancer-specific gene expression signature for human SCC. *J Invest Dermatol* 126: 869-881, 2006.
81. Khan NI, Bradstock KF and Bendall LJ: Activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor ALL. *Br J Haematol* 138: 338-348, 2007.
82. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Cordeu L, et al: WNT5A is inactivated by aberrant methylation in ALL. *Eur J Cancer* 43:2736-2746, 2007.
83. Katoh M and Katoh M: STAT3-induced WNT5A signaling loop in embryonic stem cells, adult normal tissues, chronic persistent inflammation, rheumatoid arthritis and cancer. *Int J Mol Med* 19: 273-278, 2007.
84. Qian Li & Hong Chen (2012) Silencing of Wnt5a during colon cancer metastasis involves histone modifications, *Epigenetics*, 7:6, 551-558, DOI: 10.4161/epi.20050
85. Jianming Ying, Hongyu Li, Jun Yu, Ka Man Ng, Fan Fong Poon, Sze Chuen Cesar Wong, Anthony T.C. Chan, Joseph J.Y. Sung, Qian Tao; WNT5A Exhibits Tumor-Suppressive Activity through Antagonizing the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Is Frequently Methylated in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* 1 January 2008; 14 (1): 55–61. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1644>
86. Elvira R.M. Bakker, Asha Mooppilmadham Das, Werner Helvensteijn, Patrick F. Franken, Sigrid Swagemakers, Martin A. van der Valk, Timo L.M. ten Hagen, Ernst J. Kuipers, Wendy van Veelen, Ron Smits, Wnt5a promotes human colon cancer cell migration and invasion but does not augment intestinal tumorigenesis in Apc 1638N mice, *Carcinogenesis*, Volume 34, Issue 11, November 2013, Pages 2629–2638, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt215>
87. Ueno K, Hiura M, Suehiro Y, Hazama S, Hirata H, Oka M, Imai K, Dahiya R, Hinoda Y. Frizzled-7 as a potential therapeutic target in colorectal cancer. *Neoplasia*. 2008 Jul;10(7):697-705. doi: 10.1593/neo.08320. PMID: 18592008; PMCID: PMC2435005.
88. Elvira R.M. Bakker, Asha Mooppilmadham Das, Werner Helvensteijn, Patrick F. Franken, Sigrid Swagemakers, Martin A. van der Valk, Timo L.M. ten Hagen, Ernst J. Kuipers, Wendy van Veelen, Ron Smits, Wnt5a promotes human colon cancer cell migration and invasion but does not augment intestinal tumorigenesis in Apc 1638N mice ,

89. You XJ, Bryant PJ, Jurnak F, Holcombe RF. Expression of Wnt pathway components frizzled and disheveled in colon cancer arising in patients with inflammatory bowel disease. *Oncol Rep.* 2007 Sep;18(3):691-4. PMID: 17671721.
90. Nichols AS, Floyd DH, Bruinsma SP, Narzinski K, Baranski TJ. Frizzled receptors signal through G proteins. *Cell Signal.* 2013 Jun;25(6):1468-75. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.03.009. Epub 2013 Mar 19. PMID: 23524329; PMCID: PMC3640709.
91. Nichols AS, Floyd DH, Bruinsma SP, Narzinski K, Baranski TJ. Frizzled receptors signal through G proteins. *Cell Signal.* 2013 Jun;25(6):1468-75. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.03.009. Epub 2013 Mar 19. PMID: 23524329; PMCID: PMC3640709.
92. Roarty, K., Pfefferle, A., Creighton, C. et al. Ror2-mediated alternative Wnt signaling regulates cell fate and adhesion during mammary tumor progression. *Oncogene* 36, 5958–5968 (2017). <https://doi.org/10.1038/onc.2017.206>
93. Mikels A, Minami Y, Nusse R. Ror2 receptor requires tyrosine kinase activity to mediate Wnt5A signaling. *J Biol Chem.* 2009 Oct 30;284(44):30167-76. doi: 10.1074/jbc.M109.041715. Epub 2009 Aug 31. PMID: 19720827; PMCID: PMC2781572.
94. Grumolato L, Liu G, Mong P, Mudbhary R, Biswas R, Arroyave R, Vijayakumar S, Economides AN, Aaronson SA. Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev.* 2010 Nov 15;24(22):2517-30. doi: 10.1101/gad.1957710. PMID: 21078818; PMCID: PMC2975928.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

Thiele S, Rachner TD, Rauner M, Hofbauer LC. WNT5A and its receptors in the bone-cancer dialogue. *J Bone Miner Res.* 2016;31(8):1488–96.

Pourreyaon C, Reilly L, Proby C, Panteleyev A, Fleming C, McLean K, et al. (2012) Wnt5a Is Strongly Expressed at the Leading Edge in Non-Melanoma Skin Cancer, Forming Active Gradients, while Canonical Wnt Signalling Is Repressed. *PLoS ONE* 7(2): e31827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031827>

Thiele, S., Zimmer, A., Göbel, A., Rachner, T. D., Rother, S., Fuessel, S., Froehner, M., Wirth, M. P., Muders, M. H., Baretton, G. B., Jakob, F., Rauner, M., & Hofbauer, L. C. (2018). Role of WNT5A receptors FZD5 and RYK in prostate cancer cells. *Oncotarget*, 9(43), 27293–27304. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25551>

Sheldahl, L.C., Park, M., Malbon, C.C., and Moon, R.T. 1999. Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr.Biol.* 9: 695–698.

Kuhl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. (2000) The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* Jul;16(7):279-83.

Bejsovec A. (2005) Wnt Pathway Activation: New Relations and Locations. *Cell*, Vol. 120, 11–14, January 14

Montcouquiol, M., Crenshaw E. B., Kelley, M. W. (2006) Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annu Rev Neurosci.*;29:363-86

Veeman M. T., Axelrod J. D. Moon R. T. (2003) A Second Canon: Functions and Mechanisms of  $\beta$ -Catenin-Independent Wnt Signaling. *Developmental Cell*, Vol. 5, 367–377, September

Sinner D et al. Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 2007 Nov;27(22):7802-15.

MacLeod RJ, Hayes M y Pacheco I. Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:403-411, 2007.

Ying J et al. WNT5A exhibits tumor-suppressive activity through antagonizing the Wnt/beta-catenin signaling and is frequently methylated in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Jan 1;14(1):55-61.

Smith K et al. Up-regulation of macrophage wnt gene expression in adenoma-carcinoma progression of human colorectal cancer. *Br J Cancer.* 1999 Oct;81(3):496-502.

Liang H et al. Noncanonical Wnt signaling promotes apoptosis in thymocyte development. *J Exp Med.* 2007 Dec 24;204(13):3077-84.

Torii K et al. Anti-apoptotic action of Wnt5a in dermal fibroblasts is mediated by the PKA signaling pathways. *Cell Signal*. 2008 Jul;20(7):1256-66.

Macian F. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*. 2005 Jun;5(6):472-84.

Viola JP, Carvalho LD, Fonseca BP, Teixeira LK. NFAT transcription factors: from cell cycle to tumor development. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Mar;38(3):335-44. Epub 2005 Mar 8.

Sugimura R et al. Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche. *Cell*. 2012 Jul 20;150(2):351-65.

Kim J et al. Wnt5a is secreted by follicular dendritic cells to protect germinal center B cells via Wnt/Ca<sup>2+</sup>/NFAT/NF- $\kappa$ B-B cell lymphoma 6 signaling. *J Immunol*. 2012 Jan 1;188(1):182-9.

Huang T et al. Nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins repress canonical Wnt signaling via its interaction with Dishevelled (Dvl) protein and participate in regulating neural progenitor cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem*. 2011 Oct 28;286(43):37399-405.

Gregory MA et al. Wnt/Ca<sup>2+</sup>/NFAT signaling maintains survival of Ph<sup>+</sup> leukemia cells upon inhibition of Bcr-Abl. *Cancer Cell*. 2010 Jul 13;18(1):74-87.

Bradley EW, Drissi MH. WNT5A regulates chondrocyte differentiation through differential use of the CaN/NFAT and IKK/NF-kappaB pathways. *Mol Endocrinol*. 2010 Aug;24(8):1581-93.

Corral RS et al. Bombesin induces cyclooxygenase-2 expression through the activation of the nuclear factor of activated T cells and enhances cell migration in Caco-2 colon carcinoma cells. *Oncogene*. 2007 Feb 15;26(7):958-69.