



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS WNT NO CANÓNICAS EN CÉLULAS
TRONCALES CANCEROSAS DE COLON**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. SARABIA SÁNCHEZ MIGUEL ANGEL

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARTHA ROBLES FLORES

[Facultad de Medicina](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. JESÚS CHIMAL MONROY

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

DR. MARCO ANTONIO VELASCO VELÁZQUEZ

[Facultad de Medicina](#)

Ciudad de México. Diciembre, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS WNT NO CANÓNICAS EN CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS DE COLON

que presenté para obtener el grado de Doctorado es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

**Miguel Angel Sarabia Sánchez
Número de cuenta: 3 053 193 00**

RECONOCIMIENTOS

La presente tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. Martha Robles Flores, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con financiamiento de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico UNAM.

Los miembros del comité tutorial responsable del desarrollo de la presente tesis fueron:

Dra. Martha Robles Flores (Facultad de Medicina, UNAM)

Dr. Jesús Chimal Monroy (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM)

Dr. Marco Velasco Velázquez (Facultad de Medicina, UNAM)

Los miembros del jurado de examen de grado fueron:

Presidente	Dr. García Sáinz Jesús Adolfo
Secretario	Dra. Lizano Soberón Marcela
Vocal	Dra. Castro Obregón Susana
Vocal	Dra. Chávez González María Antonieta
Vocal	Dr. Ezequiel Moisés Fuentes Pananá

Miguel Angel Sarabia Sánchez fue alumno del Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM y fue apoyado con una beca de posgrado de CONACyT con número de CVU 5500337 y por el Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP) para la participación en congresos nacionales.

Durante el desarrollo del trabajo experimental, se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Cristina Castañeda Patlán. También se reconoce la asesoría técnica en la medición del calcio intracelular del Dr. Juan Carlos Martínez Morales.

Se reconoce la asesoría técnica al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, encargado de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

AGRADECIMIENTOS

Al **Posgrado en Ciencias Bioquímicas, UNAM**, a los coordinadores, docentes, investigadores, administrativos y personal que forman base en la formación de nuevos estudiantes que permitan un bien común.

Al **Consejo Nacional Ciencias y Tecnologías (CONACyT)**, el cual, gracias a los contribuyentes, apoya el inicio, progresión y término de los estudios en posgrado.

A la **Facultad de Medicina, UNAM**, que brinda un espacio polifacético en la formación de estudiantes a distintos niveles académicos, comprometidos al servicio del bienestar social.

A mi Tutora Principal, la **Dra. Martha Robles Flores**, por la oportunidad de desarrollar el presente proyecto de investigación, por las herramientas y recursos para llevarlo a cabo. Agradezco sus consejos y su asesoría en cada etapa de este proyecto. Por su constante paciencia, entusiasmo y empeño en mi dirección formativa.

A los miembros del Comité Tutor, (por orden alfabético) el **Dr. Jesús Chimal Monroy** y el **Dr. Marco Velasco Velázquez**, por la apertura y disposición para comprometerse con mi formación académica e incluso personal.

A los que son y fueron miembros del **Laboratorio del Departamento de Bioquímica** de la Torre de Investigación de la Facultad de Medicina, con quienes he caminado hombro a hombro en el crecimiento académico y personal. En particular, a la **Dra. Cristina Castañeda Patlán**, fundamental en la vida académica dentro del laboratorio. Agradezco su cercanía con cada uno de nosotros, el compromiso de cuidar los recursos, las enseñanzas y consejos en todo momento, así como su ejemplo de fortaleza y templanza para lograr el bien común.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A **Dios**, en primer lugar y el más importante, gracias por todo, de lo extraordinario a lo ordinario, de lo majestuoso a lo discreto, por estar incondicionalmente, por permitir alcanzar este logro, por las experiencias en cada ámbito, por las alegrías y las tristezas, y sobre todo por las personas que he conocido a lo largo de la vida.

A **mi mamá y mi papá**, gracias por tanto, son esfuerzo fundamental en este trabajo. Me enseñaron la perseverancia para luchar por los anhelos. Gracias por confiar en lo que hago, apoyándome y motivándome. Gracias por los consejos y las lecciones. Son el primer eslabón en muchos de mis aprendizajes y la fortaleza en muchos de mis cansancios. Las palabras no alcanzan para agradecerles: Gracias por siempre.

A **Marce**, gracias por ser y estar. Gracias por ser ejemplo en tantos aspectos, que, de forma consciente o inconsciente, me has enseñado a superarme a mí mismo. Gracias por ser inspiración a desafiarme a hacer cosas nuevas. Gracias por ser impulso de ver más allá y resignificar la labor en la ciencia. Gracias por siempre estar.

A **Eduardo**, gracias por ser amigo y hermano. Sin duda, la fraternidad nos ha llevado a lograr cosas que antes veíamos difíciles. Gracias por ser esas palabras de ánimo y de esperanza para mirar hacia lo que uno puede lograr. Gracias por hacer equipo, porque es ahí donde logramos aquello que trasciende más allá de las cuatro paredes del laboratorio para hacer la diferencia en la ciencia.

A **Heriberto** y a **Luz**, gracias por la amistad y la hermandad. Me han enseñado que el laboratorio no solo es lugar de experimentos, sino semillero de amistades que perduran. Los valoro enormemente y agradezco cada experiencia que hemos compartido.

A **Edgar** y **Vane**, gracias por la trascendencia en la amistad a lo largo de tanto tiempo. Por su confianza en mí, que alienta a seguir esforzándose.

A mis amigos de ciencia y de fut, a **Miguel** (tocayo), **Hugo**, **Blad**, **Isaac**, **Paco** y **Martín** (Peña), gracias por la camaradería y las anécdotas vividas, de donde he aprendido y sigo aprendiendo de cada uno.

A mis amigos veteranos de la vida, a **Pepe**, **Juan**, **Filio** y **Jhon**, gracias por su amistad todos estos años y los ánimos que siempre me ofrecieron, los admiro igualmente.

A mis colegas que me acompañaron en esta etapa de formación académica, gracias por su colaboración y amistad que fueron cruciales para lograr este objetivo. A **Angie**, **Carlos**, **Ana**, **Pablo**, **Alex**, **Juan Carlos**, **Pao**, y a ambas **Andreas**, gracias, porque cada uno desde sus formas de ser, me permitieron disfrutar más el quehacer científico y el día a día en el laboratorio. Esto no hubiera sido igual sin la presencia de alguno de ustedes.

A todas aquellas personas que de forma cercana o lejana, constante o esporádicamente, con una palabra o con una acción, han contribuido, no solo al término de este proyecto, sino a mi crecimiento ¡Muchas gracias! Esto me compromete con ustedes y con todos para seguir creciendo y ser parte del crecimiento de quienes me rodean.

Dedicado a quienes luchan y han luchado por hacer de nuestro mundo, un lugar mejor

“La paciencia y la dedicación lo alcanza todo”

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 EL INTESTINO Y LAS CÉLULAS TRONCALES.....	1
1.2 CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS.....	2
1.2.1 Capacidad de auto-renovación.....	4
1.2.2 Diferenciación en células no troncales.....	4
1.2.3 Perfil de marcadores.....	4
1.2.3.1 Oct3/4.....	5
1.2.3.2 Sox2.....	5
1.2.3.3 CD44.....	5
1.2.3.4 CD44v6.....	5
1.2.3.5 CD133.....	5
1.2.4 Subpoblación celular minoritaria.....	6
1.2.5 Potencial tumorigénico.....	6
1.2.6 Esferas, modelo de estudio de las Células Troncales Cancerosas.....	7
1.3 EL CÁNCER COLO-RECTAL, ENFERMEDAD DE VÍA WNT ABERRANTE.....	7
1.4 SEÑALIZACIÓN WNT.....	9
1.4.1 La vía canónica Wnt/ β -catenina.....	10
1.4.1.1 Wnt/ β -catenina y Cáncer Colo-rectal.....	10
1.4.2 La vía no canónica Wnt/calció.....	11
1.4.2.1 Wnt/calció y Cáncer Colo-rectal.....	11
1.4.3 La vía no canónica Wnt/PCP.....	12
1.4.3.1 Wnt/PCP y Cáncer Colo-rectal.....	12
1.4.4 Wnt3a y Wnt5a en el Cáncer Colo-rectal.....	13
1.5 ANTECEDENTES DIRECTOS.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	16
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVOS.....	17

5.1 OBJETIVO GENERAL	17
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
6. METODOLOGÍA.....	18
6.1 LÍNEAS CELULARES	18
6.2 CULTIVOS.....	18
6.2.1 CULTIVO EN MONOCAPA	18
6.2.2 CULTIVO DE ESFERAS	18
6.3 PLÁSMIDOS	18
6.4 TRATAMIENTO CON WNT.....	19
6.5 SISTEMA LENTIVIRAL Y TRANSDUCCIÓN CELULAR	19
6.6 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE β -CATENINA.....	19
6.7 DETERMINACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR	19
6.8 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO	19
6.9 VIABILIDAD CELULAR	20
6.10 FRACCIONAMIENTO CELULAR.....	20
6.11 WESTERN BLOT	20
6.12 SELECCIÓN CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO (CELL SORTING)	21
6.13 ANÁLISIS IN SILICO	21
6.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
7. RESULTADOS	22
7.1 LAS ESFERAS DE CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON SE ENRIQUECEN DE CSC	22
7.2 WNT/ β -CATENINA CAMBIA EN RESPUESTA A WNT3A EN ESFERAS DE RKO Y SW620, MIENTRAS QUE PERMANECE SIN CAMBIOS EN ESFERAS DE SW480	25
7.3 WNT3A Y WNT5A INCREMENTAN LA FORMACIÓN DE ESFERAS DE RKO Y SW620, EN CONTRASTE A SW480, DONDE LA DISMINUYE.....	27
7.4 LOS LIGANDOS WNT AFECTAN LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA EN LAS ESFERAS A CORTO Y LARGO PLAZO, DEPENDIENDO DEL CONTEXTO CELULAR.....	29
7.5 LA ACTIVIDAD DE PLC ES ESENCIAL PARA LA FORMACIÓN DE ESFERAS	32
7.6 LA FORMACIÓN DE ESFERAS REQUIERE DE LA FUNCIÓN DE NFAT	35

7.7 LA VÍA WNT/CALCIO SE ASOCIA CON UNA MENOR SUPERVIVENCIA DE PACIENTES CON CÁNCER COLO-RECTAL.....	38
8. DISCUSIÓN.....	40
9. CONCLUSIONES	47
9.1 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS	47
9.2 CONCLUSIÓN GENERAL.....	48
10. PERSPECTIVAS.....	49
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
12. ANEXOS	74
12.1 ARTÍCULO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DE GRADO.....	74
12.2 ARTÍCULO DE REVISIÓN ACTIVIDAD COMPLEMENTARIA.....	88

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Estructura celular del intestino
- Figura 2 Características moleculares y funcionales de las CSC
- Figura 3 Datos estadísticos del cáncer colo-rectal a nivel global
- Figura 4 Vías de señalización Wnt
- Figura 5 Wnt3a y Wnt5a regulan diferencialmente la vía Wnt/ β -catenina, pero ambos movilizan el calcio intracelular
- Figura 6 PLC participa en el incremento de la migración celular por Wnt3a y Wnt5a, en RKO y SW480
- Figura 7 Auto-renovación de CSC capaces de formar esferas, en relación con una alta actividad transcripcional de Sox2-Oct3/4
- Figura 8 Auto-renovación de CSC con alta actividad transcripcional de Sox2-Oct3/4 en cultivos de esferas
- Figura 9 Esquema experimental para la estimulación de esferas con ligando recombinante Wnt3a o Wnt5a
- Figura 10 Actividad transcripcional dependiente de β -catenina por el estímulo Wnt3a o Wnt5a en esferas
- Figura 11 El pre-tratamiento y tratamiento crónico con Wnt3a o Wnt5a estimula la formación de esferas en RKO y SW620, pero disminuye en SW480
- Figura 12 El tratamiento crónico con Wnt3a o Wnt5a estimula la formación de esferas en RKO y SW620, pero disminuye en SW480
- Figura 13 Efecto de los ligandos Wnt en la capacidad proliferativa de esferas a corto plazo
- Figura 14 Efecto de los ligandos Wnt en la capacidad proliferativa de esferas a largo plazo
- Figura 15 Wnt3a y Wnt5a movilizan calcio, a través de la actividad de PLC, en células derivadas de esferas
- Figura 16 La inhibición de PLC disminuye la formación de esferas
- Figura 17 La inhibición de PLC revierte el aumento de la EFE por ligandos Wnt3a y Wnt5a
- Figura 18 Activación constitutiva de los miembros de la familia NFAT en RKO, SW480 y SW620
- Figura 19 La actividad de NFAT se requiere para la formación de esferas
- Figura 20 La inhibición de NFAT revierte el aumento de la EFE por ligandos Wnt3a y Wnt5a
- Figura 21 Componentes de la vía Wnt/calcio se asocian a los parámetros clínicos de pacientes con cáncer colo-rectal

ABREVIATURAS

AJCC	Comité conjunto estadounidense sobre el cáncer
BM	Membrana basal
CAF	Fibroblastos asociados a cáncer
CaSR	Receptor sensible a calcio
CBC	Células columnares de la base de la cripta
CRC	Cáncer colo-rectal
CSC	Células troncales cancerosas
Dvl	Dishevelled
ECM	Matriz extracelular
EFE	Eficiencia de formación de esferas
ESC	Células troncales embrionarias
FAP	Poliposis adenomatosa familiar
FDA	Administración de alimentos y medicamentos
Fzd	Frizzled
GEPIA2	Análisis interactivo de perfil de expresión de genes 2
ISC	Células troncales intestinales
mGlu	Glutamato metabotrópico
NHR	Dominio regulador
PCP	Polaridad celular planar
Pk	Prickle
PLC	Fosfolipasa C
RHR	Dominio de unión a DNA en el carboxilo terminal
SFB	Suero fetal bovino
TA	Células de amplificación transitoria
TAD	Dominio de activación transcripcional
TCGA	El Atlas del genoma del cáncer
TIC	Células iniciadoras de tumor
TIS	Tumor <i>in situ</i>

RESUMEN

Las Células Troncales Cancerosas (CSC, por las siglas en inglés Cancer Stem Cells) son responsables de mantener el crecimiento tumoral, la quimio-resistencia y la metástasis. Por tanto, comprender las características de las CSC es crucial para avanzar en la terapia del cáncer.

El papel de la vía canónica Wnt/ β -catenina, tanto en las células troncales normales como en las CSC está ampliamente establecido, mientras que las funciones de las vías Wnt no canónicas en las CSC están menos descritas hasta ahora. Recientemente, nuestro laboratorio reportó que la respuesta canónica y no canónica se pueden activar simultáneamente por un mismo ligando Wnt en células de cáncer colo-rectal. Por otra parte, se describió la movilización de calcio dependiente de la Fosfolipasa C (PLC, por las siglas en inglés Phospholipase C) tras el tratamiento con Wnt3a o Wnt5a, ligandos prototipos que activan la canónica y no canónicas, respectivamente. Por lo tanto, estos hallazgos sugirieron que las vías Wnt no canónicas también pudieran ser relevantes para la subpoblación de CSC.

El objetivo de la presente tesis fue investigar el papel de la vía Wnt/calcio en las CSC de cáncer colo-rectal. Para ello, se sembraron células cancerosas en cultivos de formación de esferas, método por el cual las CSC aumentan su proporción con respecto al número total de células. Además, utilizamos líneas celulares de cáncer colo-rectal con actividad responsiva o constitutiva de la vía Wnt/ β -catenina, para discernir el papel de la vía Wnt/calcio dentro de los efectos funcionales de los ligandos Wnt.

Usando Wnt3a y Wnt5a, encontramos que ambos ligandos promueven la capacidad de formación de esferas y la proliferación celular dependiendo del contexto celular, sin estimular necesariamente la actividad transcripcional dependiente de β -catenina.

La estimulación de la formación de esferas por Wnt3a o Wnt5a requirió la activación de PLC, responsable de la movilización del calcio intracelular, así como de NFAT. Notablemente, la inhibición específica de la PLC o NFAT, usando U73122 y 11R-VIVIT, respectivamente, bloqueó la formación de esferas, a pesar de que cada línea celular evaluada en el presente trabajo, moduló diferencialmente la vía Wnt/ β -catenina.

Por lo tanto, nuestros resultados indican que los ligandos Wnt activan el eje de señalización Wnt/calcio para inducir o mantener la capacidad de auto-renovación de las CSC, demostrando que es esencial para las funciones de las CSC en el cáncer colo-rectal. Los hallazgos abren la perspectiva hacia la posible participación de la vía Wnt/calcio en otras características de las CSC relacionadas con la resistencia al tratamiento y la erradicación de la enfermedad.

ABSTRACT

The Cancer Stem Cells (CSC) are responsible for maintaining tumor growth, chemoresistance, and metastasis. Therefore, understanding CSC characteristics is critical to progress in cancer therapy. While the contribution of the canonical Wnt/ β -catenin signaling in both normal and CSC has been well established, the functions of non-canonical Wnt signaling cascades in CSC are unclear so far. Recently, our group reported that a single Wnt ligand triggers a complex signaling, in which the canonical and non-canonical responses can be simultaneously activated in colon cancer cells. On the other hand, the calcium mobilization dependent on PLC, following treatment with Wnt3a or Wnt5a (prototypic ligands that activate canonical and non-canonical pathways, respectively) was also described, suggesting that non-canonical Wnt pathways might be important in CSC.

The aim of the present thesis was to investigate the role of the Wnt/calcium pathway in CSC of colorectal cancer. We employed sphere-forming cultures as a model of CSC enrichment, that is, wherein CSC increase in proportion to the total number of cells. In addition, we used colorectal cell lines with responsive or constitutive activity of the Wnt/ β -catenin pathway to elucidate the contribution of Wnt/calcium signaling in the functional effects of Wnt ligands.

Using Wnt3a or Wnt5a, we found that both Wnt ligands promote sphere-formation capacity and proliferation without necessarily stimulate β -catenin-dependent transcription.

Upregulation of sphere formation by Wnt3a or Wnt5a required the downstream activation of PLC, engaged in the intracellular calcium mobilization, as well as NFAT. Remarkably, the single specific inhibition of PLC or NFAT, through treatment with U73122 or 11R-VIVIT, respectively, led to impaired sphere formation, despite differential modulation of Wnt/ β -catenin in cell lines addressed in the present study.

Therefore, our results indicate that both types of Wnt ligands activate Wnt/calcium signaling axis to induce and maintain the self-renewal efficiency of CSC, demonstrating to be essential for the functions of CSC derived from colorectal cancer. The findings open the outlook towards the possible involvement of Wnt/calcium in other features of CSC related to the persisting challenge in disease eradication.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 EL INTESTINO Y LAS CÉLULAS TRONCALES

El intestino se forma principalmente de una capa simple de células epiteliales, que posee una alta renovación. El recambio celular depende de las células troncales intestinales denominadas ISC (por las siglas en inglés Intestinal Stem Cells) localizadas en el fondo de las criptas, las cuales generan células que se diferencian conforme migran hacia la vellosidad del intestino delgado, o al vértice de la cripta en el intestino grueso. El tiempo de vida de las células diferenciadas es corto, haciendo que el recambio del epitelio intestinal sea aproximadamente de 3 días, lo que señala lo fundamental de las ISC para la homeostasis de este órgano [1]. En diversos estudios, las ISC también se denominan células CBC (por las siglas en inglés Crypt Base Columnar), debido a su localización en el epitelio intestinal [2].

Las ISC residen en un nicho enriquecido con ligandos Wnt [3]. Las células mesenquimales subepiteliales son parcialmente responsables de este enriquecimiento, ya que producen Wnt2B, ligando asociado a la activación de la vía Wnt/ β -catenina [4]. En referencia a esta vía, las células mesenquimales pericriptales, cercanas al nicho de ISC, expresan el agonista de la vía Wnt/ β -catenina llamado R-spondina 3, lo que refuerza la importancia de la activación de la vía Wnt/ β -catenina en las ISC [5]. En efecto, la vía Wnt/ β -catenina se describe como regulador maestro de las ISC (Figura 1) [6, 7]. Esto se observa incluso en condiciones *ex vivo*, donde la presencia de Wnt3a, agonista prototipo canónico de la vía Wnt/ β -catenina, ya sea adicionado exógenamente o secretado por células Paneth, es importante para el mantenimiento de las ISC [8].

En condiciones *in vivo*, dos subpoblaciones celulares de ISC se identifican a través de los marcadores moleculares Lgr5 y Bmi1. Durante la regeneración del epitelio intestinal, las células Lgr5⁺ activan la vía Wnt/ β -catenina y son mitóticamente activas, mientras que las células Bmi1⁺ no cambian el estado activo de la vía Wnt/ β -catenina, permaneciendo en un estado quiescente. Esto sugiere que, las células Lgr5⁺ contribuyen a la regeneración y las células Bmi1⁺ tienen un aporte menor. Sin embargo, mientras que las células Lgr5⁺ mueren en respuesta al daño por radiación en el intestino, las células Bmi1⁺ proliferan para sostener la remodelación de criptas y vellosidades, lo que denota la importancia de diferentes subpoblaciones celulares en el mantenimiento del intestino [9].

La actividad a los ligandos Wnt en el epitelio intestinal no es exclusivo de las ISC, ya que, por ejemplo, el estímulo con Wnt11 lleva a una mayor proliferación y migración de las células epiteliales intestinales diferenciadas. Si bien, Wnt11 desencadena alteraciones morfológicas, es interesante mencionar que Wnt11 no estimula la transcripción mediada por β -catenina, sino que activa otros efectores como la PKC y la CaMKII [10].

La expresión de los ligandos Wnt en el intestino es un proceso dinámico. Un ejemplo de esto es que al aumentar el calcio exógenamente, se activa al receptor sensible a calcio llamado CaSR, el cual desencadena un incremento en los niveles de Wnt5a. Además, también aumentan los niveles de

Ror2, el cual actúa como co-receptor de ligandos Wnt. Ambos aumentos sugieren un cambio en el microambiente que pudiese favorecer la diferenciación de las ISC [11].

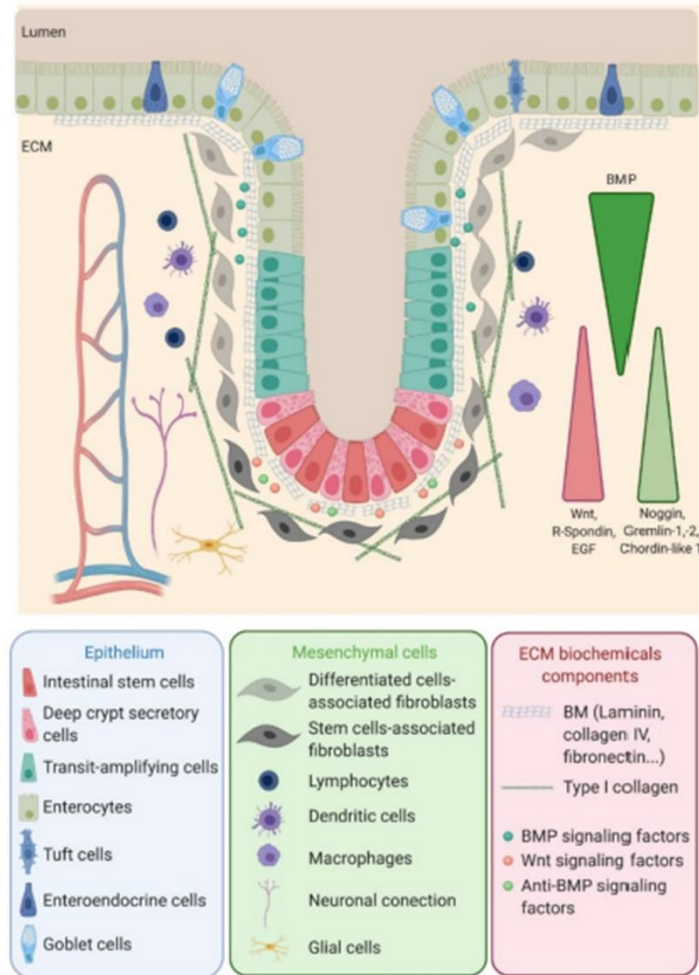


Figura 1. Estructura celular del intestino. Las ISC se localizan en el fondo de la cripta y generan las células de amplificación transitoria (TA) que migran durante su diferenciación hasta la cara luminal. Las señales que provienen de células próximas al epitelio intestinal y de la membrana basal regulan el mantenimiento de las ISC. ECM: Matriz extracelular, BM: Membrana basal. Figura tomada de Onfroy-Roy L *et al.* 2020 [1].

El recambio celular en el intestino es alto, lo que ocasiona que sea un epitelio susceptible a la transformación celular, debido a una entrada constante al ciclo celular, tanto de las ISC como de su progenie. Esto sostiene entonces que, el cáncer colo-rectal pueda originarse de la desregulación de las ISC al alterar el gradiente de señalización de la vía Wnt/ β -catenina que se establece a lo largo del eje de las criptas intestinales, mecanismo molecular importante en el presente trabajo [12].

1.2 CÉLULAS TRONCALES CANCEROSAS

Las células troncales se caracterizan por auto-renovarse y generar células diferenciadas. La regulación de las células troncales es crucial para el desarrollo embrionario, organogénesis y la

homeostasis de los tejidos, siendo este último necesario para el reemplazo celular en los tejidos a lo largo de la vida adulta [13]. Por lo tanto, las alteraciones en las funciones de las células troncales desencadenan enfermedades como el cáncer [14, 15].

Las células troncales cancerosas, referidas en el presente trabajo como CSC, tienen una mayor habilidad de generar tumores, además de que comparten características con las células troncales normales, como la expresión de marcadores de troncalidad, la capacidad de auto-renovación y la diferenciación a células especializadas [16, 17]. Además, la reincidencia del cáncer, la resistencia a agentes citotóxicos y la metástasis se atribuyen principalmente a las CSC [16, 17]. La base molecular de la mayor resistencia a quimioterapia que tienen las CSC se debe en parte, a la sobre-expresión de las bombas transportadoras de membrana tipo ABC, en una mayor capacidad de reparación de DNA y en la resistencia a apoptosis [16–18]. Por ejemplo, las CSC, provenientes de cáncer colo-rectal, mostraron una mayor quimioresistencia que las células diferenciadas engendradas de las CSC [18]. Además, la notable plasticidad que presentan las CSC, así como la entrada y salida a un estado de quiescencia o dormancia en condiciones de estrés, son rasgos cruciales en la resistencia a quimioterapia, radioterapia y, por tanto, a la recurrencia del tumor [19].

Aunque las CSC pueden originarse de células troncales normales [20, 21], o de progenitores comprometidos que reactivan el perfil de troncalidad [22], se argumenta que deben cumplir criterios específicos para conferir el término de CSC (Figura 2), los cuales se explican a continuación.

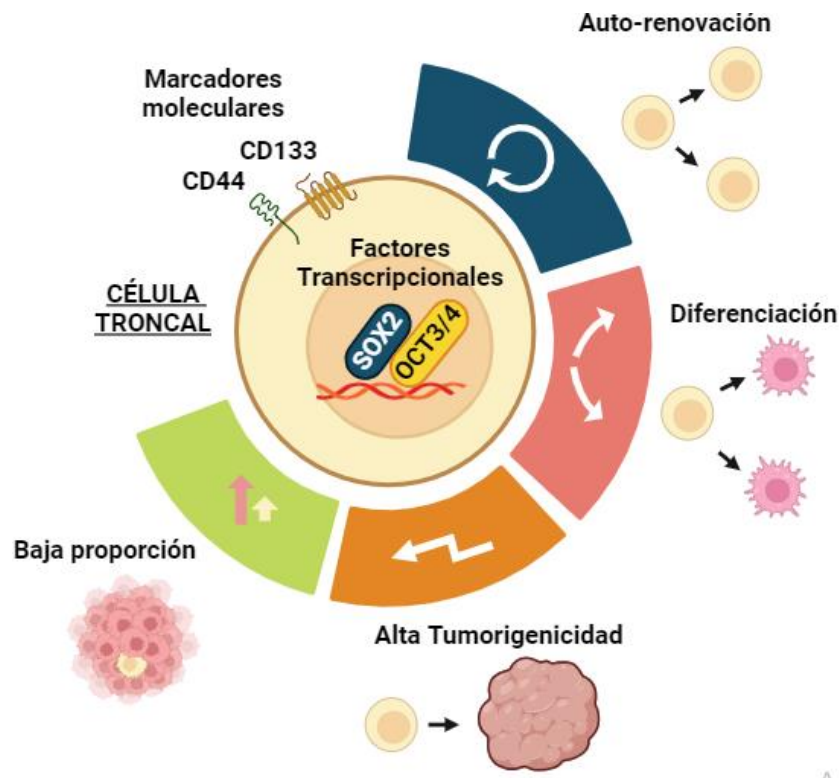


Figura 2. Características moleculares y funcionales de las CSC. Marcadores moleculares (transmembranales y factores de transcripción) y ensayos funcionales que se establecen como criterios en la identificación de CSC.

1.2.1 Capacidad de auto-renovación

La auto-renovación es la característica de una célula en mantener sus características biológicas después de la división celular. Esto implica que la célula preserva su grado de diferenciación y su potencial proliferativo. La división celular de la célula troncal se clasifica en 2 tipos: la división celular simétrica y la división celular asimétrica. En la división celular simétrica, las células generadas poseen similitud entre ellas, ya sea porque ambas son células troncales o ambas son células que se diferenciaron. Por su parte, en la división celular asimétrica, una célula conserva el estado troncal mientras que la otra célula avanza en el grado de diferenciación.

La auto-renovación confiere a las células troncales la capacidad de mantener su estado troncal a pesar de las divisiones celulares, mientras que, son estas mismas células troncales las que pueden generar células diferenciadas, acorde al requerimiento de los tejidos, con el fin de reemplazar a las células muertas. En el cáncer, la auto-renovación permite que las CSC mantengan su capacidad proliferativa y de manera similar a las troncales normales, de generar células diferenciadas que serán parte del resto del tumor.

La capacidad de auto-renovarse de las CSC se atribuye a que éstas pueden provenir de células troncales normales que tuvieron mutaciones, siendo entonces un rasgo inherente [23]. No obstante, también se argumenta que células no troncales pueden adquirir la capacidad de auto-renovación durante la plasticidad de las células cancerosas [24, 25].

1.2.2 Diferenciación en células no troncales

Las células troncales generan células diferenciadas, lo que implica cambios biológicos que se reconocen en el perfil de expresión genética, en la morfología celular y en la pérdida o ganancia de funciones. Esto lleva a que las células que avanzan a una mayor diferenciación, disminuyan el potencial proliferativo, lo que restringe, por tanto, su capacidad de mantener el crecimiento de un tumor [26–28]. No obstante, las células diferenciadas poseen otras características funcionales que favorecen la progresión tumoral [29].

Es importante mencionar que a pesar de que la diferenciación se considera una característica de las células troncales, no es exclusiva de éstas, pues también las células progenitoras o células precursoras son capaces de diferenciarse en distintos linajes [30]. Por lo tanto, la potencialidad de diferenciación debe tomarse con cautela cuando se busca establecer si las células de interés poseen un estado troncal.

1.2.3 Perfil de marcadores

El avance en los estudios sobre las células troncales, normales y cancerosas, ha permitido establecer componentes específicos en este tipo de células, los cuales pueden clasificarse con base en su función en las células. Por una parte, las proteínas transmembranales se consideran marcador de las CSC, ya que su presencia favorece la comunicación de las CSC con el microambiente, tanto con otros tipos celulares como con componentes de la matriz extracelular [31]. Por otra parte, factores transcripcionales se asocian al mantenimiento de un estado no diferenciado, regulando la transcripción a nivel global dentro de las células troncales [32]. A continuación, se describen

brevemente aquellos componentes moleculares que son ampliamente referenciados y que resultan relevantes para fines del presente trabajo.

1.2.3.1 Oct3/4

Oct3/4 es un factor transcripcional que participa en el mantenimiento de las células troncales durante la embriogénesis. Respecto al tejido normal del colon en etapa adulta, la expresión de Oct3/4 se identifica en las CBC. En tumores de colon, la expresión de Oct3/4 se asocia a una peor respuesta clínica, en parte al prevenir la apoptosis de las células cancerosas [33]. Oct3/4 contribuye al crecimiento tumoral, la transición epitelio-mesénquima y la metástasis [33].

1.2.3.2 Sox2

Sox2 es un factor transcripcional principalmente descrito por participar en el estado troncal de las células embrionarias. Dentro de los genes blanco, Sox2 regula la expresión de Oct3/4 [33]. Una vez que Sox2 y Oct3/4 se expresan, forman un complejo transcripcional que modula los niveles de múltiples proteínas [33]. En los tumores de cáncer colo-rectal, Sox2 se expresa en estadios avanzados, e incluso los niveles de Sox2 fueron mayores al comparar con muestras de pacientes sanos. Además, Sox2 también correlaciona con la metástasis y el infiltrado en nódulos linfáticos [33].

1.2.3.3 CD44

CD44 es una glicoproteína de superficie que actúa como receptor, principalmente del ácido hialurónico [31]. El inmunofenotipo CD44⁺/CD24⁻ identifica a CSC de cáncer de mama, dado su alto potencial para formar esferas y tumores [27, 33]. En el cáncer de colon, las células EpCAM^{Alto}/CD44⁺ tienen un mayor potencial tumorigénico, invasivo y metastásico [34], mientras que células CD44⁺ en este mismo tipo de cáncer muestran una mayor quimioresistencia [35]. La sobre-expresión de CD44 se identifica como un evento temprano en la transición de adenoma colo-rectal a carcinoma, e incluso la disminución de CD44 previene la tumorigénesis [33]. De manera relevante, una célula única CD44⁺, proveniente de un paciente con cáncer colo-rectal, es capaz de formar un tumor *in vivo* [36].

1.2.3.4 CD44v6

CD44 exhibe isoformas por splicing alternativo, lo cual depende de 10 exones variables que codifican la región extracelular de este receptor. CD44v6 es una variante de CD44 que, al reducir sus niveles, se afecta la capacidad metastásica de células de cáncer de colon, sin alterar el tamaño de los tumores primarios, lo que indica la asociación de CD44v6 con la metástasis [37]. Esto se corrobora al aumentar la capacidad metastásica por el incremento de la expresión de CD44v6, como respuesta a los factores secretados por las células asociadas al tumor [37].

1.2.3.5 CD133

CD133 (Prominina-1 o AC133) es una glicoproteína transmembranal que se expresa en el epitelio de colon [33]. No obstante, CD133 se relaciona negativamente con la supervivencia de los pacientes con cáncer colo-rectal, glioma y carcinoma hepatocelular [38, 39]. Acorde a esto, la disminución de células CD133⁺ reduce el crecimiento tumoral en cáncer colo-rectal, pancreático y hepático [40, 41]. Las células CD133⁺ de cáncer de colon exhiben la capacidad de auto-renovación, diferenciación y

supervivencia ante la radiación y agentes quimioterapéuticos, en comparación a células CD133⁺, además de que la expresión de CD133 se asoció con el tamaño de los tumores [33, 34, 42]. Asimismo, las células CD133⁺ aisladas de pacientes con cáncer colo-rectal permanecen en un estado no diferenciado y forman tumores en ratón [33].

1.2.4 Subpoblación celular minoritaria

Las células troncales normales tienen una menor tasa de proliferación en comparación a las células diferenciadas derivadas de éstas. En el caso del cáncer, una alta proporción de la masa tumoral se conforma de células cancerosas no troncales que son altamente proliferativas, mientras que las CSC permanecen como minoría celular debido a su menor rango de proliferación. Al cambiar la relación entre divisiones simétricas y asimétricas de las CSC, esta subpoblación celular puede incrementar, a lo cual se le atribuye el término enriquecimiento [43, 44]. Diversos métodos se han desarrollado para el enriquecimiento de CSC, donde el cultivo de esferas es ampliamente utilizado y el cual se explica en una sección más adelante, por ser importante para el presente trabajo [45].

Es importante mencionar que los modelos matemáticos proponen que la proporción de CSC es altamente variable, por lo que, en algunos casos, las CSC no necesariamente constituyen la minoría celular dentro un tumor [46]. Esto en parte, se debe al estadio de progresión del cáncer, tal y como se observó en el carcinoma de células escamosas, donde la frecuencia de CSC incrementó en etapas más avanzadas [47]. Además, las CSC de melanoma aumentan en cantidad al ser trasplantadas en ratones NOD/SCID [48]. Por lo tanto, el criterio de que una minoría celular representa a las CSC, debe complementarse con los demás criterios, para identificar con certidumbre la identidad troncal en una célula cancerosa.

1.2.5 Potencial tumorigénico

El conocimiento acerca de la capacidad de una célula para iniciar un nuevo tumor, ya sea dentro del mismo organismo, o al ser trasplantada a otro organismo, es fundamental para entender la reincidencia de los pacientes con cáncer. Es por ello que, a diferencia de los criterios anteriores, esta característica es punto divergente entre las células troncales normales y las CSC [44]. Este rasgo se basa en la capacidad de las CSC en formar tumores en ensayos de xenotrasplante serial, reestableciendo en cada pase *in vivo*, la organización celular jerárquica y heterogeneidad del tumor parental [49].

En específico, el potencial tumorigénico es el número mínimo de células cancerosas para iniciar el proceso tumorigénico en condiciones *in vivo*. Frecuentemente, se describe el rango de 100-50,000 células, donde a menor número de células requerido indica un mayor potencial tumorigénico. Esta capacidad parcialmente depende de las condiciones experimentales, siendo los trasplantes ortotópicos o ectópicos en ratones NOD/SCID los más usados [50].

En la literatura, el término TIC (por las siglas en inglés Tumor-Initiating Cells) se asigna a las células con alto potencial tumorigénico. Si bien, las CSC son homologadas a las TIC, existen células de amplificación transitoria que también forman un tumor nuevo, por lo que otros criterios deben emplearse de forma complementaria durante el estudio de las células troncales, como lo es la auto-renovación [22].

1.2.6 Esferas, modelo de estudio de las Células Troncales Cancerosas

El estudio de las CSC se basa principalmente en ensayos funcionales relacionados a sus propiedades, en comparación, por ejemplo, a la expresión de marcadores de superficie, debido a la plasticidad fenotípica. El método por excelencia para evaluar la presencia de CSC son los ensayos tumorigénicos, sin embargo, la infraestructura detrás de estos ensayos hace que métodos *in vitro*, como la formación de esferas, sean más utilizados y que, para el presente trabajo, sea la herramienta técnica usada [51].

El método de formación de esferas, descrito por primera vez hace aproximadamente 20 años en células de tumor de cerebro [52], se basa en que una célula única es capaz de originar una esfera por expansión clonal. Es un método para la propagación de las CSC, en el cual se requiere de una disociación mecánica y enzimática para obtener una suspensión de células únicas. La suspensión celular se siembra a una baja densidad celular en un medio de cultivo específico, en condiciones de baja adherencia para promover la proliferación como estructuras esféricas no adherentes clonales. La ausencia de adhesión induce la muerte celular por anoikis de células diferenciadas, por lo que las células de tumor menos diferenciadas, dentro de las cuales están las CSC, sobreviven y proliferan para generar el resto de células que constituirán a las esferas. Es crucial hacer énfasis que las esferas no son estructuras homogéneas con células no diferenciadas, sino que abarca un rango de entidades celulares diferentes que asientan la base de una heterogeneidad inter-esferas e intra-esferas, lo que explica la expresión variable de marcadores de troncalidad o diferenciación, sin embargo es el enriquecimiento de las CSC el principal objetivo [53].

El medio de cultivo que se emplea carece de suero fetal bovino, a diferencia del medio de cultivo estándar usado en cultivos de monocapa. No obstante, el medio de cultivo se suplementa con factores que favorecen la proliferación de células troncales, siendo los más recurrentes bFGF y EGF. Asimismo, dependiendo del tipo de cáncer, otros factores pueden usarse, dentro de los cuales Wnt3a es descrito para esferas de cáncer colo-rectal [54]. Es por ello que, en esferas, las células se mantienen predominantemente menos diferenciadas, con la expresión escasa o nula de marcadores de diferenciación, como por ejemplo de CK20 en células de cáncer de colon [55].

Las CSC dependen de un microambiente permisivo que permite preservar la habilidad de auto-renovarse y originar células progenitoras diferenciadas. Si bien, un ensayo de formación de esferas carece de células estromales y componentes de la matriz extracelular que establezcan este microambiente, las mismas células de las esferas producen componentes específicos como tenascina C, e incluso componentes del medio de cultivo pueden usarse para asemejar su propio nicho *in vivo* [56, 57]. Finalmente, es importante mencionar que el propósito del cultivo de esferas es primordialmente estudiar las propiedades de las CSC, en lugar de mimetizar un tejido canceroso, ya que no replica la estructura tridimensional y la complejidad del microambiente de un tumor *in vivo*.

1.3 EL CÁNCER COLO-RECTAL, ENFERMEDAD DE VÍA WNT ABERRANTE

El Cáncer Colo-rectal, referido en el presente trabajo como CRC, ocupa el segundo lugar como el tipo de cáncer con el mayor número estimado de casos de muerte y de prevalencia, mientras que ocupa

el tercer lugar con la mayor incidencia en el mundo (Figura 3) [58, 59]. En los años recientes, la incidencia de CRC esporádico aumentó, siendo incluso a una edad cada vez más temprana, lo cual se atribuye al estilo de vida y a las condiciones ambientales [60]. Esto remarca la relevancia que continúa siendo el CRC en la actualidad, pese a los avances en el área clínica [61]. El CRC es el tipo de cáncer que se origina en el segmento final del sistema gastrointestinal, es decir, en el colon y el recto [12], el cual posee características específicas que resultan relevantes en el inicio y progresión del cáncer, anteriormente mencionadas.

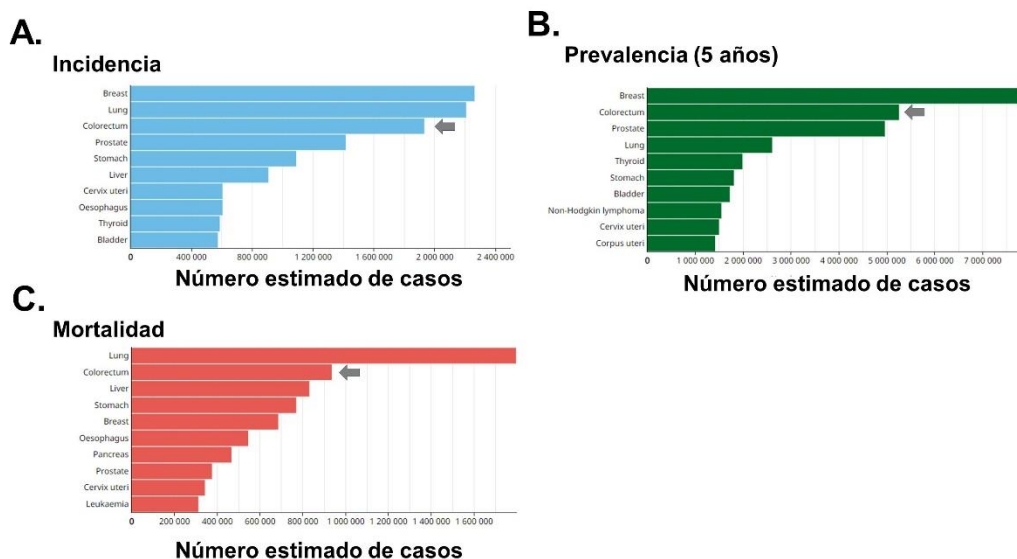


Figura 3. Datos estadísticos del cáncer colo-rectal a nivel global. Número estimado de casos en la Incidencia (A), Prevalencia de 5 años (B) y Mortalidad (C) de pacientes con CRC, incluyendo ambos sexos y todas las edades. Gráficas tomadas de GLOBOCAN, 2023.

La señalización Wnt/ β -catenina está frecuentemente desregulada en el CRC, donde las mutaciones en el gen *APC*, son las más tempranamente detectadas. *APC* es una proteína de andamiaje que contribuye a la formación del complejo proteico encargado de la degradación de β -catenina, por lo que mutaciones en *APC*, lleva a que su actividad antagónica sobre β -catenina se reduzca y por tanto, la actividad de β -catenina se incremente [62]. En el caso del cáncer colo-rectal hereditario, pacientes con FAP (por las siglas en inglés Familiar Adenomatous Polyposis), tienen mutaciones en *APC* de línea germinal. Estos pacientes con mutaciones heterocigóticas en *APC*, comúnmente pierden el segundo alelo en células individuales, las cuales pueden originar adenomas colorectales y pólipos en adultos jóvenes que los predisponen a desarrollar cáncer [63]. Debido a que los adenomas son altamente proliferativos, representan un contexto de riesgo para mutaciones adicionales que lleven a la transformación celular. Por ejemplo, las mutaciones adicionales en *KRAS*, *TP53* y *SMAD4* favorecen que estos pólipos progresen hacia la malignidad tumoral [2]. Por su parte, las mutaciones somáticas en *APC* se identifican en cerca del 85% de las neoplasias intestinales esporádicas, desde adenomas hasta carcinomas, dentro de las cuales, el 90% resulta en una versión trunca de la proteína *APC* [64]. Las mutaciones en *APC* llevan a que su actividad antagónica sobre la vía Wnt/ β -catenina disminuya, no obstante, distintas mutaciones en *APC* llevan a diferentes niveles de activación de esta vía, la cual se describe cada vez más compleja, y que se discute a detalle en la siguiente sección [65].

1.4 SEÑALIZACIÓN WNT

La señalización Wnt debe su nombre al ligando Wnt, el cual se une al receptor Frizzled (Fzd), proteína transmembranal que desencadena uno o varios mecanismos, siendo 3 los principales: la vía Wnt/ β -catenina, la vía Wnt/Polaridad Celular Planar (referida de forma abreviada como Wnt/PCP) y la vía Wnt/calcio [66]. La vía Wnt/ β -catenina fue la primera descrita en respuesta a ligandos Wnt, por lo que se le denominó vía Wnt canónica, mientras que las vías independientes de β -catenina, donde se incluyen las vías Wnt/PCP y Wnt/calcio, se clasificaron como vías Wnt no canónicas [65]. A nivel de los ligandos Wnt, se clasifican como ligandos Wnt activadores de la vía Wnt canónica (Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a y Wnt10b), y ligandos Wnt activadores de las vías Wnt no canónicas (Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt7a, Wnt7b y Wnt11), sin embargo, esto no es definitivo y corresponde evaluarlo en cada caso [67].

La predicción del tipo de señalización con base a los receptores es difícil, ya que los receptores Fzd forman homo-oligómeros y hetero-oligómeros [68]. En años recientes, se argumenta que los complejos que forman los ligandos Wnt con los receptores en conjunto con los co-receptores son los que determinan la señalización. Bajo esta idea, Wnt3a y Wnt5a, ligandos prototipos canónico y no canónico, llevan a la fosforilación de LRP5/6 y Ror2, respectivamente [69]. Entender los mecanismos que se activan en respuesta al ligando Wnt, permite entonces regular procesos en los cuales participan (Figura 4A). Es por ello que se explican brevemente, así como su relación con el CRC.

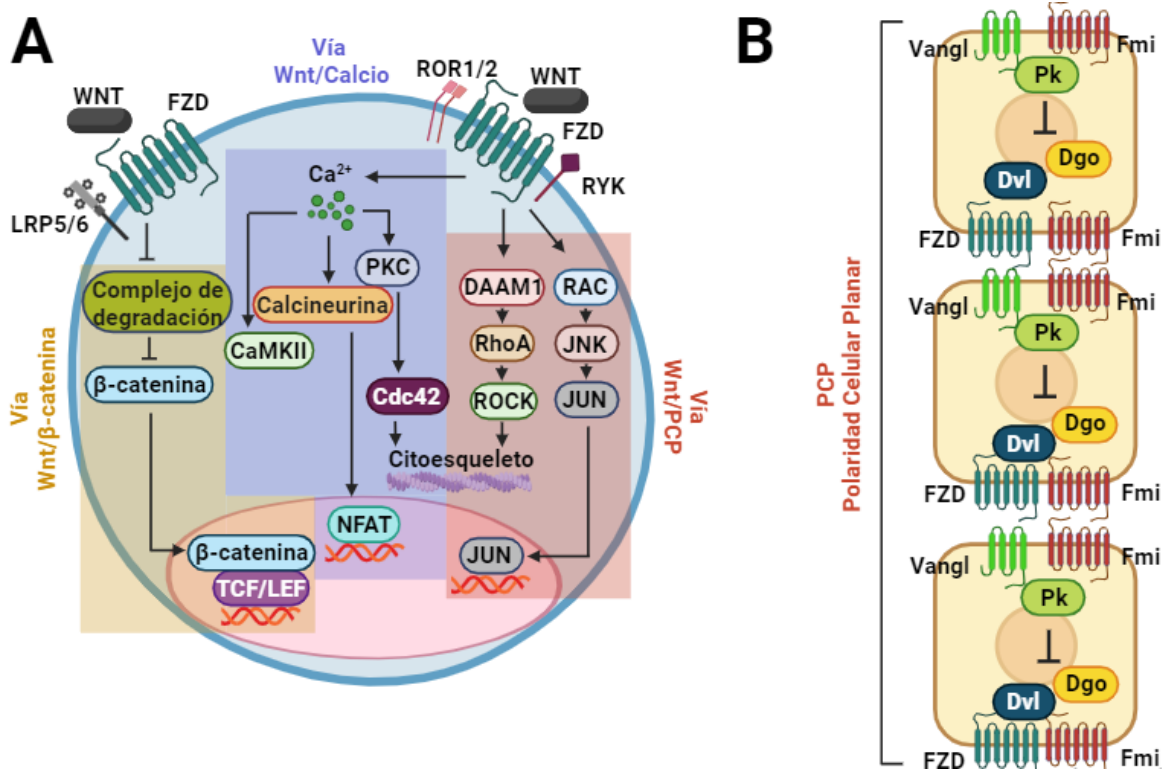


Figura 4. Vías de señalización Wnt. A) La vía Wnt/ β -catenina se denomina canónica y depende de la transcripción mediada por β -catenina. Las vías Wnt no canónicas abarcan la vía Wnt/calcio y Wnt/PCP. La vía

Wnt/calció activa efectores como CaMKII, Calcineurina y PKC, a través de la movilización de calcio intracelular, para favorecer la actividad de NFAT, y a Cdc42 para regular el citoesqueleto. Por su parte, la vía Wnt/PCP estimula a RAC y RhoA para el rearreglo del citoesqueleto y a JUN para la modulaci3n transcripcional. **B)** Polarizaci3n de estructuras epiteliales a trav3s de la se1alizacion PCP con la formaci3n de los complejos proteicos Fmi-Fzd-Dvl-Dgo y Fmi-Vangl-Pk que se estabilizan o se antagonizan inter- o intra-celularmente, respectivamente. Figura modificada de Sarabia-S1nchez MA *et al.* 2023 [70]

1.4.1 La v1a can3nica Wnt/ β -catenina

La transcripci3n dependiente del coactivador transcripcional β -catenina es el rasgo distintivo de esta v1a de se1alizacion. En ausencia de los ligandos Wnt, β -catenina citos3lica es degradada a trav3s del proteosoma. Esto se debe a que β -catenina se fosforila por medio de un complejo multiproteico formado por las prote1nas de anclaje APC y Axina, y de las cinasas CKI α y GSK3 β . El estado fosforilado de β -catenina se reconoce por β -TrCP, una ligasa de ubiquitina E3, la cual se encarga de poliubiquitarla para su posterior degradaci3n v1a proteosoma.

La uni3n del ligando Wnt a Fzd inhibe la actividad del complejo que fosforila a β -catenina, al reclutar a Axina, GSK3 β y CKI α a la membrana, donde estas dos 1ltimas fosforilan a LRP5/6. La relocalizaci3n de Axina a la membrana plasm1tica le permite asociarse con Dishevelled (Dvl) para formar el complejo Axina-Dvl-Fzd-LRP5/6, el cual una vez que forma el se1alósoma, es endocitado [71].

Por su parte, β -catenina se estabiliza y se acumula en el citoplasma para translocar al n1cleo. Dentro del n1cleo, β -catenina regula la transcripci3n de los genes blanco al interactuar con factores de transcripci3n de la familia TCF/LEF. Tambi3n, β -catenina se une a prote1nas de la familia Legless como BCL9 y BCL9L, asociados a los coactivadores de la familia PYGO, remodeladores de la cromatina. En ausencia de β -catenina, TCF recluta a TLE para formar un complejo represor encargada de la desacetilaci3n de histonas y, por tanto, la compactaci3n de la cromatina. En contraste, cuando β -catenina se une a los factores TCF/LEF, recluta co-activadores transcripcionales como p300 para favorecer la diferenciaci3n o CBP para mantener el estado troncal [72].

1.4.1.1 Wnt/ β -catenina y C1ncer Colo-rectal

Como se mencion3 anteriormente, el CRC se considera una enfermedad de v1a Wnt aberrante, en espec1fico, de la v1a Wnt/ β -catenina, debido a las frecuentes mutaciones tempranamente detectadas en APC, antagonista de la v1a [62]. En un modelo murino, se demostr3 que la restauraci3n de los niveles de APC revierte los adenomas hacia un tejido normal, lo que resalta que la activaci3n constitutiva de la v1a Wnt/ β -catenina es fundamental para el proceso tumorig3nico [65]. Acorde a esto, la acumulaci3n de β -catenina en el n1cleo se detecta en m1s del 80% de los tumores de CRC [73]. Asimismo, una alta expresi3n de β -catenina se relaciona a una baja sobrevida libre de enfermedad, sobrevida espec1fica de c1ncer y sobrevida global en pacientes con CRC [74].

La v1a Wnt/ β -catenina se relaciona con m1ltiples procesos celulares en el c1ncer como la proliferaci3n, la angi3nesis, la supervivencia, la quimioresistencia, la transici3n epitelio-mes3nquima, la adhesi3n, la migraci3n y la invasi3n celular [75, 76]. Adem1s, se observ3 que CAF (por las siglas en ingl3s Cancer-Associated Fibroblasts) secretan exosomas que transportan ligandos Wnt para activar la v1a Wnt/ β -catenina y as1, promover caracter1sticas de CSC [77].

En condiciones normales, la regulación de la vía Wnt/ β -catenina sobre el mantenimiento de las ISC es crucial, y cambios en esta, como la supresión de APC, desencadena la formación de hiperplasias epiteliales y adenomas [78, 79].

1.4.2 La vía no canónica Wnt/calcio

Wnt5a es el ligando Wnt más descrito en activar la vía Wnt/calcio en células cancerosas [80, 81]. El reconocimiento de Wnt5a no solo depende de receptores Fzd, sino también de co-receptores Ror1/2. En el caso de Ror1/2, se clasifica como pseudocinasa de la familia de RTK, ya que carece de la actividad intrínseca de cinasa de tirosina, mientras que se fosforila por MET y SRC para activar vías de señalización río abajo [82].

El complejo Wnt/Fzd y la fosforilación de Ror por GSK3 β activa a PLC que se localiza en la membrana plasmática, la cual genera IP3 y DAG a partir del Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato. IP3 difunde a través del citosol e interactúa con los canales de calcio localizados en la membrana del retículo endoplásmico para liberar calcio, lo que activa a la cinasa CaMKII y a la fosfatasa Calcineurina. Los iones de calcio, en conjunto con DAG, activan a PKC, la cual se encarga de regular componentes del citoesqueleto de actina y miosina, a través de Cdc42. Tanto CaMKII como PKC activan efectores como NF- κ B y CREB. Por su parte, Calcineurina regula positivamente a miembros de la familia NFAT, al desfosforilar el dominio regulador, desenmascarando así la señal de localización nuclear y, por tanto, favoreciendo la traslocación nuclear de NFAT. Incluso se describe que Calcineurina se localiza dentro del núcleo para mantener el estado desfosforilado y la localización nuclear de NFAT.

Los miembros de la familia NFAT tienen un dominio de activación transcripcional (TAD), un dominio regulador (NHR) y un dominio de unión a DNA en el carboxilo terminal (RHR). El dominio NHR posee los sitios de unión para las cinasas CK-1, GSK3 y DYRK; así como para la fosfatasa Calcineurina. Una vez en estado desfosforilado, NFAT se une a elementos de DNA similares a los sitios NF κ B. Aunque NFAT se une con baja afinidad al DNA, es la formación del complejo NFAT-AP1 lo que incrementa la afinidad, ya que además de formar dímeros, NFAT actúa sinérgicamente con otros factores transcripcionales como c-Fos y c-Jun. Finalmente, la vía Wnt/calcio también puede activar a PDE6, regulando así el estado metabólico de las células, al disminuir los niveles de cGMP [67].

1.4.2.1 Wnt/calcio y Cáncer Colo-rectal

La vía Wnt/calcio se asocia principalmente a capacidades relacionadas con la invasividad y metástasis de las células cancerosas [83]. En CRC, Wnt5a se sobreexpresa en muestras de pacientes [84] e incluso se identifica enriquecido en el estroma de los tumores [85]. La presencia de Wnt5a en el estroma promueve sitios de adhesión, donde los tumores se forman focalmente y se estimula la migración, que en este reporte se definió como migración direccional, porque a diferencia de la migración aleatoria, ésta se cuantificó a partir de la distancia recorrida hacia la zona libre de células en el cultivo *in vitro*. Además, también se favoreció la invasión de las células de CRC, sin cambiar de forma evidente la capacidad tumorigénica [86].

El estudio de la regulación epigenética muestra que Wnt5a está frecuentemente silenciado en células de CRC, debido a la metilación de su promotor [87]. No obstante, los macrófagos al cultivarse con células cancerosas, aumentan la expresión de Wnt5a, con acción autócrina o parácrina. Wnt5a induce la polarización de los macrófagos al fenotipo M2, activando la vía CaMKII-

ERK1/2-STAT3. Esta polarización de los macrófagos contribuye a un mayor crecimiento tumoral, invasión y metástasis de las células cancerosas de colon. A la vez, en el co-cultivo con los macrófagos, las células cancerosas activan la vía Wnt/ β -catenina y la actividad de JNK para favorecer la capacidad invasiva [85, 88].

Se propone que uno de los mecanismos por el cual actúan algunos compuestos con actividad anticancerosa, incluyendo sobre las células de cáncer de colon, es a través de la inhibición de canales de calcio [89, 90], sin embargo, el calcio que actúa como segundo mensajero en respuesta a los ligandos Wnt representaría un mecanismo alternativo.

1.4.3 La vía no canónica Wnt/PCP

PCP se refiere a la polarización de distintos epitelios dentro de la estructura del epitelio, sin embargo, también incluye la polaridad en células no epiteliales [67]. En la vía Wnt/PCP participa Fzd, la cadherina atípica Fmi y la tetraspanina Vangl, además de las proteínas citoplasmáticas Dvl, Dgo y Prickle (Pk) [91]. En presencia del ligando Wnt, se forman principalmente dos complejos, el primero formado de Fmi-Fzd-Dvl-Dgo y el segundo formado por Fmi-Vangl-Pk. Estos complejos se estabilizan entre células vecinas, con la interacción intercelular que establecen Fmi-Fzd y Fmi-Vangl. A la vez, estos complejos se antagonizan dentro de la misma célula por interacciones negativas entre Dvl-Dgo y Pk, lo que genera una localización asimétrica de los complejos a lo largo de un plano (Figura 4B) [92].

La unión de Wnt5a a Fzd requiere de Ror2 para formar el complejo Vangl-Ror2 [93]. Dvl favorece la fosforilación de Vangl2 por CKI, lo que regula su localización y función [94]. La vía Wnt/PCP actúa sobre la actividad de las GTPasas pequeñas Rac y Rho, lo que produce la reestructuración del citoesqueleto necesaria para la polaridad celular y la migración.

La GTPasa RhoA no solo repercute en el citoesqueleto, sino también en la regulación transcripcional, ya que activa a JNK para que transloque al núcleo y fosforile a AP-1, el cual recluta coactivadores transcripcionales que modulan la expresión de genes blanco.

1.4.3.1 Wnt/PCP y Cáncer Colo-rectal

La vía Wnt/PCP regula la capacidad migratoria, invasiva y metastásica en diversos tipos de cáncer, lo que se asocia a su participación en la migración coordinada durante el desarrollo embrionario [95].

La asimetría de los componentes de la vía Wnt/PCP se describe en células cancerosas, donde los complejos con Fzd se localizan en las protuberancias celulares, mientras que los complejos con Vangl se identifican en las áreas no protuberantes [96]. Al disminuir los niveles de Vangl1, se restringe la progresión y la metástasis del cáncer de colon [97]. Incluso, la alta expresión de Vangl1 se relaciona con un mayor riesgo de reincidencia en los pacientes con cáncer de mama. También otros componentes como Celsr1, Pk1 y CK1- ϵ incrementan en linfocitos B de pacientes con leucemia linfocítica crónica [98].

Wnt1 se secreta en exosomas y favorece la proliferación y migración de células de CRC al activar RHO y JNK, componentes de la vía Wnt/PCP [99]. Por su parte, Wnt2 también favorece la invasividad de las células de CRC mediante c-Jun/AP-1 [100]. Además, el eje de señalización Wnt11/Fzd7 activa JNK y c-Jun para favorecer la proliferación, migración e invasión de células cancerosas de colon [101].

También se describen otros mecanismos con la participación de proteínas G como las subunidades G $\beta\gamma$, en la capacidad invasiva de células de CRC en respuesta a Wnt2 [100].

1.4.4 Wnt3 y Wnt5a en el Cáncer Colo-rectal

En la mayoría de los mamíferos, son 19 ligandos Wnt que desencadenan una señal a través de una variedad de receptores y mecanismos moleculares río abajo [66]. Dentro de la caracterización, Wnt3a se considera prototipo de ligando Wnt canónico, ya que predominantemente activa la vía Wnt/ β -catenina, mientras que Wnt5a es el prototipo de ligando Wnt no canónico, debido a que inhibe la vía Wnt/ β -catenina, a través de estimular una o varias vías Wnt no canónicas. Esta clasificación se ha tomado como referencia en el estudio de la señalización Wnt, sin embargo, es importante mencionar que no es categórico y que, cada ligando Wnt puede modificar la señalización en función al contexto celular.

En tejidos de CRC, la expresión de Wnt3a es alta y en el medio condicionado de cultivos primarios, los niveles de Wnt3a es mayor en células de pacientes con CRC que las de donadores sanos [102]. Wnt3a se asocia a la transición epitelio-mesénquima, a estadios tardíos del cáncer y a un peor pronóstico en pacientes con CRC [102]. Asimismo, Wnt3a se localiza principalmente en los sitios primarios del tumor en comparación a los sitios metastásicos [102].

Por su parte, Wnt5a es el ligando más referenciado en activar la vía Wnt/calció en células cancerosas, sin embargo, se le asocia tanto a funciones oncogénicas como supresoras de tumor [80, 81]. Al restringir la activación de la vía Wnt/ β -catenina, el papel de supresor tumoral se atribuye a Wnt5a. Por ejemplo, la expresión ectópica de Wnt5a favorece la degradación de β -catenina, inhibiendo la formación de colonias [103]. En parte se debe a que, ante altos niveles de calcio extracelular, Wnt5a/Ror2 inducen la expresión de la ligasa de ubiquitina Siah2, encargada de la degradación de β -catenina [104]. Es importante mencionar que Wnt5a/Ror2 también puede ser responsable de la metástasis y la quimioresistencia, al favorecer la actividad de β -catenina en células de cáncer de mama [105], lo que demuestra que la modulación de la vía Wnt/ β -catenina por Wnt5a depende del contexto celular. Acorde a esto, la expresión de Wnt5a se asocia a un pronóstico favorable en pacientes con cáncer de colon de Dukes B [106].

1.5 ANTECEDENTES DIRECTOS

Previamente en nuestro laboratorio, se usaron células RKO y SW480, que son líneas celulares establecidas de pacientes con cáncer colo-rectal, las cuales expresan la versión silvestre y la versión trunca de APC, respectivamente. Es decir, las células RKO son responsivas para activar la vía Wnt/ β -catenina, mientras que las células SW480 tienen la activación constitutiva de esta misma. El análisis de proteínas transmembranales demostró que ambas líneas celulares expresan receptores Fzd (Fzd2, Fzd4, Fzd6, Fzd7) y el co-receptor Ror2, en comparación a una línea celular no maligna, lo que indicó que pueden reconocer ligandos Wnt [107].

Al analizar la señalización en respuesta a ligandos Wnt, el tratamiento con Wnt3a estimuló la actividad transcripcional mediada por β -catenina en RKO. Esto se evaluó con el sistema reportero TOP/FOP, el cual expresa luciferasa mediante un promotor que posee sitios de unión a TCF, factor transcripcional que se une a β -catenina (TOP), en relación al que posee estos sitios de unión mutados y que por tanto se usa como control negativo (FOP). Al adicionar Wnt5a junto al tratamiento con Wnt3a, se observó que esta actividad transcripcional disminuyó, demostrando que Wnt5a inhibe la activación de β -catenina por Wnt3a. Por su parte, solo Wnt5a no indujo cambios en la actividad del reportero (Figura 5A). Por lo tanto, y como fue de esperarse, Wnt3a actuó como ligando prototipo canónico y Wnt5a como ligando prototipo no canónico, acorde a lo descrito en otros trabajos [69, 108]. En cuanto a SW480, Wnt3a y Wnt5a carecieron de un cambio en la actividad transcripcional dependiente de β -catenina, lo que refuerza la evidencia de la activación constitutiva de la vía Wnt/ β -catenina en esta línea celular (Figura 5C) [107].

Lo interesante radicó en que tanto Wnt5a como Wnt3a desencadenaron la movilización de calcio en RKO y SW480 (Figura 5B, D). Este hallazgo resultó relevante, ya que, por una parte, Wnt3a no solo fue capaz de activar la transcripción mediada por β -catenina, es decir la vía Wnt/ β -catenina, sino que también movilizó calcio en RKO, por un mecanismo dependiente de PLC, lo cual se relaciona con la vía Wnt/calcio (Figura 5A-B). Esto demostró que un mismo ligando Wnt fue capaz de activar dos tipos de vías Wnt de forma simultánea en un mismo tipo de células. Por otra parte, aunque la vía Wnt/ β -catenina fue constitutivamente activa en SW480, ya que no hubo cambios en presencia de Wnt3a o Wnt5a, la movilización de calcio fue hallado en respuesta a ambos ligandos en estas mismas células, aunque de forma más discreta para Wnt5a que para Wnt3a (Figura 5C-D) [107].

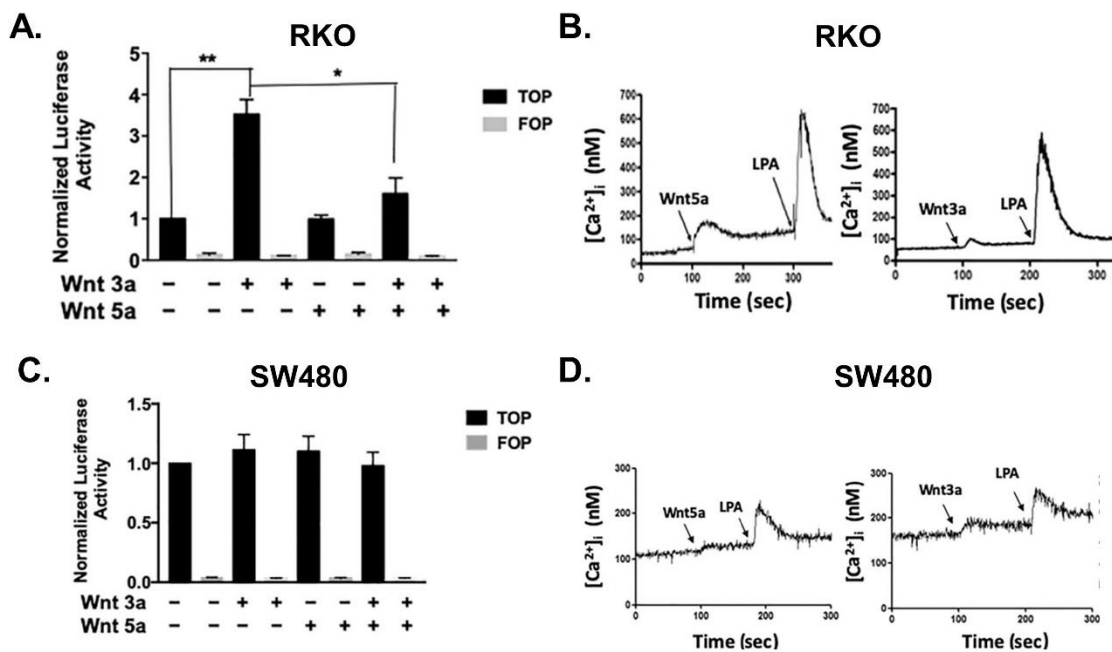


Figura 5. Wnt3a y Wnt5a regulan diferencialmente la vía Wnt/ β -catenina, pero ambos movilizan el calcio intracelular. Cuantificación de la actividad transcripcional dependiente de β -catenina en presencia o ausencia de Wnt3a, Wnt5a, o ambos, en RKO (A) y SW480 (C) por medio del sistema de plásmidos reportero TOP/FOP. Análisis de los niveles intracelulares de calcio en respuesta a Wnt3a o Wnt5a en RKO (B) y SW480 (D). LPA se usó como control positivo de movilización de calcio. Modificado de Flores-Hernández E *et al.* 2020 [107].

Con base a la movilización de calcio, se sugería que los ligandos Wnt pudieran regular funciones celulares como la migración, ya que está ampliamente relacionada a la vía Wnt/calcio [83]. Efectivamente, ambos ligandos Wnt favorecieron la migración tanto en SW480, como en RKO (Figura 6). Para ambas líneas celulares, el uso del inhibidor de PLC llamado U73122 restringió este efecto por Wnt3a y Wnt5a (Figura 6), lo que estableció que ambos ligandos activan la vía Wnt/PLC/calcio para contribuir a la migración que, al analizar a RKO y SW480, pudiera ser simultáneo o no, a la activación de la vía Wnt/ β -catenina, respectivamente (Figura 5) [107].

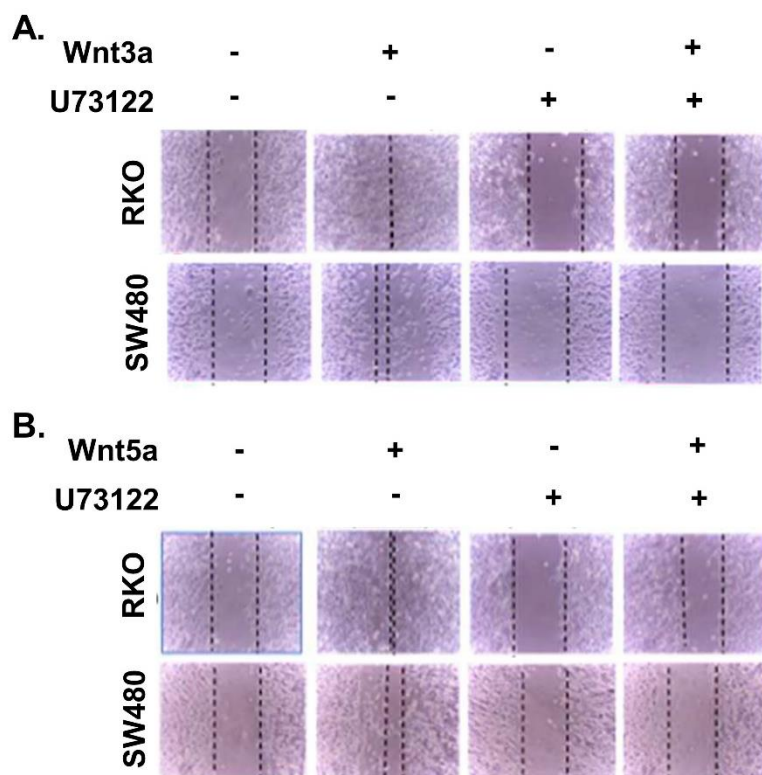


Figura 6. PLC participa en el incremento de la migración celular por Wnt3a y Wnt5a, en RKO y SW480. Imágenes representativas por microscopía de campo claro de los ensayos de cierre de herida bajo el tratamiento con Wnt3a (**A**) y Wnt5a (**B**) adicionado con el inhibidor de PLC U73122. La línea discontinua indica el promedio de las células movilizadas. Modificado de Flores-Hernández E *et al.* 2020 [107].

Debido a que los estudios se realizaron en condiciones estándar de monocultivo, dentro del cual se reconoce la presencia de CSC, pero en una baja proporción, quedó por determinarse si la vía Wnt/calcio también pudiese ser relevante para este tipo de células.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La vía Wnt canónica es importante en las células troncales cancerosas. Por otro lado, se sabe que las vías Wnt/ β -catenina y Wnt/calció se activan simultáneamente en células de cáncer de colon. Sin embargo, es poco lo que se conoce acerca de la vía Wnt/calció en las CSC, en relación a la población celular total.

3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La vía Wnt/calció está activa o puede activarse en células troncales cancerosas de colon para regular funciones propias a este tipo de células?

4 HIPÓTESIS

La vía Wnt/calció opera en las células troncales cancerosas de colon para regular funciones como la auto-renovación y la proliferación.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Conocer el papel de la vía Wnt/calció en las células troncales cancerosas de líneas celulares de cáncer colo-rectal, usando la formación de esferas como modelo de cultivo enriquecido de células troncales cancerosas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar el cultivo de esferas a partir de líneas celulares de CRC, como método de estudio de las CSC.
2. Analizar la activación de la vía Wnt canónica en respuesta a Wnt3a y Wnt5a en el cultivo de esferas.
3. Evaluar el efecto de los ligandos Wnt3 y Wnt5a en las características de las CSC como la auto-renovación y la proliferación.
4. Determinar la activación de la vía Wnt/calció en respuesta a Wnt3a y Wnt5a en el cultivo de esferas.
5. Describir el efecto de la inhibición de la vía Wnt/calció en la capacidad de formar esferas.

6 METODOLOGÍA

6.1 LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares cancerosas (RKO, SW480 y SW620) y las líneas de fibroblastos secretores de Wnt3 o Wnt5a (L-Wnt3a y L-Wnt5a, respectivamente) se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA, USA). RKO es un prototipo de células de cáncer de colon con mutación en *BRAF* y con la vía Wnt canónica responsiva. SW480 y SW620 son células de cáncer de colon con mutación en *KRAS* y con la vía Wnt canónica constitutivamente activa, debido a que tienen la forma truncada de APC. SW480 y SW620 se obtuvieron del mismo paciente, del tumor primario y de la metástasis a nódulo linfático, respectivamente.

6.2 CULTIVOS

6.2.1 Cultivo en monocapa

Las células RKO crecieron en DMEM suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%. SW480 y SW620 creció en DMEM F-12 suplementado con SFB al 5%. El medio de cultivo para RKO, SW480 y SW620 fue adicionado con 2 mM de L-glutamina y antibióticos (100 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Estreptomina y 25 µg/ml de Anfotericina). Los fibroblastos L-Wnt3a o L-Wnt5a crecieron en DMEM suplementado con SFB al 10% y 4 mM de L-glutamina. Todas las líneas celulares se cultivaron a 37°C en presencia de CO₂ al 5% y O₂ al 21%.

6.2.2 Cultivo de esferas

Las células se colectaron de un cultivo estándar de monocapa por tripsinización con Tripsina (Gibco No. Cat. 15090-046). Las células viables se cuantificaron por tinción con Azul de Tripiano y se sembraron a una densidad celular de 1 célula/µl en medio DMEM-F12 libre de SFB y suplementado con 1X de B27 (Gibco No. Cat. 17504-044), 20 ng/ml de EGF (Merck, Sigma-Aldrich No. Cat. GF144) y antibióticos (Gibco No. Cat. 15240-062) que contienen 100 U/ml de Penicilina, 100 µg/ml de Estreptomina y 25 µg/ml de Anfotericina. Además, se adicionó 10 µg/ml de Gentamicina (*In vitro*, S.A.). La siembra se realizó en placas de ultrabaja adherencia (Corning No. Cat. 3474) y para el mantenimiento de los cultivos se adicionó medio fresco cada tercer día. Para cultivos secuenciales, las esferas se disociaron en células individuales con el uso de TrypLETM Express, según las instrucciones del fabricante (Gibco No. Cat. 12604-013). La Eficiencia de Formación de Esferas (EFE) se midió usando la fórmula: [Número de esferas/número de células sembradas] x 100.

6.3 PLÁSMIDOS

En el presente trabajo se utilizaron los siguientes plásmidos: TOP-GFP-mCherry (Addgene #35491), M50 Super 8x TOPFlash (Addgene #12456) y M51 Super 8xTOPFlash (Addgene #12457) como herramienta de estudio para la actividad transcripcional dependiente de β-catenina. Los plásmidos pSORE6/mCherry, y pSORE6/GFP se usaron para medir la actividad transcripcional dependiente del complejo Sox2-Oct3/4, siendo los plásmidos pCMV/mCherry y pCMV/GFP los controles negativos.

6.4 TRATAMIENTO CON WNT

Las células se cultivaron en ausencia o presencia de los ligandos recombinantes humanos Wnt3a (No. Cat. 5036-WN-010 R&D Systems) o Wnt5a (No. Cat. 645-WN-010 R&D Systems) en el rango de concentración de 50-500 ng/ml, según se indique. En el caso donde se señale, el medio condicionado obtenido de los fibroblastos L-Wnt3a o L-Wnt5a se usó como fuente de ligandos Wnt, siendo el control negativo aquel proveniente de fibroblastos carentes del vector de expresión para Wnt.

6.5 SISTEMA LENTIVIRAL Y TRANSDUCCIÓN CELULAR

La formación de los lentivirus se realizó mediante la co-transfección de los plásmidos pCMV-VSV-G (Addgene #8454), pCMV-dR8.2 (Addgene #8455) y el plásmido de interés, en las células HEK-293T. Los lentivirus se cosecharon del sobrenadante a las 72 h post-transfección y se almacenaron a -80°C hasta su uso. En la transducción celular, las células blanco se expusieron al sobrenadante viral durante 24 h en presencia de Polibreno (5-20 µg/ml). Las células transducidas se seleccionaron con Puromicina (Sigma No. Cat. P8833) en un rango de concentración de 5-10 µg/ml durante 10 días (solo en los casos donde el plásmido contenía el cassette de resistencia). En el caso de los plásmidos sin resistencia a antibiótico, las células transducidas se seleccionaron por análisis de la fluorescencia mediante el equipo FACSaria sorter.

6.6 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE β -CATENINA

La actividad transcripcional dependiente de β -catenina se midió con el plásmido TOP-GFP-mCherry. Primero, las células se transdujeron con un sistema lentiviral y posteriormente, se aislaron por medio del equipo FACSaria sorter para seleccionar a las células transducidas con base a la fluorescencia por mCherry, cuya expresión es constitutiva. Las células positivas a mCherry se corroboraron por citometría usando el equipo Attune Nxt. Después, las células se sembraron en condiciones de cultivo de esferas y se estimularon cada tercer día con DMSO (vehículo), 250 ng/ml de Wnt3a o 250 ng/ml de Wnt5a. Al día 11, las esferas se disgregaron a células individuales y se analizó la positividad a GFP, reportero de la actividad transcripcional dependiente de β -catenina, por medio del citómetro Attune Nxt.

6.7 DETERMINACIÓN DEL CALCIO INTRACELULAR

El calcio se cuantificó como se describió previamente [107]. De manera breve, las células se incubaron en medio libre de suero durante 1 h a 37°C. Después, 2.5 µM de Fura-2/AM (No. Cat. F1201 Invitrogen) se adicionó a las células en medio Krebs-Ringer-HEPES con 0.05% de BSA a pH 7.4, y se incubaron durante 1 h a 37°C. Las células se lavaron y se incubaron 5 min en ausencia o presencia de 4 µM del inhibidor de PLC U73122 (Sigma Aldrich, St Louis, Mo, USA). La detección de la fluorescencia se realizó en el espectrómetro de luminiscencia AMINCO-Bowman Series 2 (Rochester; NY) a dos longitudes de onda de excitación: 340 y 380 nm; y una longitud de emisión de 510 nm, con un intervalo de lectura de 0.5 s.

6.8 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

U73122 es un inhibidor selectivo y permeable a la célula dirigido contra las Fosfolipasas específicas de Fosfatidilinositol tipo C, lo que impide la activación por agonista de PLC (IC_{50} = 1-2.1 µM), aunque también se reporta que inhibe a 5-lipooxigenasa. 11R-VIVIT (Merck No. Cat. 480401) es un péptido

que actúa como inhibidor competitivo de los miembros de la familia NFAT, uniéndose al sitio conservado de acoplamiento a Calcineurina. Para el tratamiento de los cultivos de esferas, U-73122 o 11R-VIVIT se adicionó en las concentraciones indicadas cada tercer día, siendo el medio suplementado con el vehículo DMSO como control negativo.

6.9 VIABILIDAD CELULAR

Las esferas se trataron con U73122, 11R-VIVIT o el vehículo DMSO cada tercer día en las concentraciones indicadas y las células viables se cuantificaron al día 11 de formación de esferas. Brevemente, las esferas fueron disgregadas a células individuales y se adicionó Yoduro de Propidio (Invitrogen P1304MP) a una dilución de 1:2000, para la detección de fluorescencia en el citómetro Attune Nxt.

6.10 FRACCIONAMIENTO CELULAR

Las células se centrifugaron a 2800 rpm durante 9 min. El pellet se resuspendió en el Buffer de lisis de Citoplasma (10 mM de HEPES, 1.5 mM de MgCl₂, 10 mM de KCl, 0.5% de Tritón X-100, pH 8), se homogeneizó y se agitó vigorosamente. Los lisados se incubaron a 4°C durante 15 min, se le adicionó 1% de NP-40 (Igepal CA-630 Sigma I3021) y nuevamente se agitaron vigorosamente. Los lisados se centrifugaron a 900 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se extrajo y se almacenó a -80°C como fracción citoplasmática. Por su parte, el pellet se resuspendió en el Buffer de lisis del Núcleo (5 mM de HEPES, 0.75 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 0.25% de Tritón X-100, 0.5 M de NaCl, 0.1 M de EDTA, 10% de Glicerol, 0.25 mM de DTT), se homogeneizó y se agitó vigorosamente. Los lisados se incubaron durante 15 min a 4°C y se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se extrajo y se almacenó a -80°C como fracción nuclear.

6.11 WESTERN BLOT

Los lisados de células totales se realizaron con Buffer RIPA (50 mM de Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 0.5% de Desoxicolato de Sodio, 1% de NP-40, 0.1% de SDS) bajo agitación vigorosa cada 10 min durante 3 h. Los buffers para lisar células usados en el presente trabajo fueron suplementados con inhibidores de proteasas (0.1 mg/ml de Inhibidor de Tripsina, 20 µM de Leupeptina, 1 mM de PMSF) y fosfatasa (1 mM de Na₃VO₄, 25 mM NaF, 1mM de Pirofosfato de Sodio, 20 µM de Apropitina). Los lisados se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se extrajo para su almacenamiento a -80°C hasta su uso. Las proteínas se cuantificaron mediante el ensayo de proteína de Bradford (BioRad Protein Assay Dye Reagent concentrate No. Cat. 5000 006) y se separaron por SDS-PAGE. Después, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con leche al 3% en TBS durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios acorde a las instrucciones del fabricante, durante 12 h a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: β-catenina no fosforilada (No. Cat. 8814 Cell Signaling) con dilución 1:1000, NFAT1 (No. Cat. 610703 BD Biosciences) con dilución 1:500, NFAT2 (No. Cat. 556602 BD Biosciences) con dilución 1:500, NFAT3 (sc-271597 Santa Cruz Biotechnology) con dilución 1:500, NFAT4 (sc-8405 Santa Cruz Biotechnology) con dilución 1:500, Lamin B1 (ab16048 Abcam) con dilución 1:2000, α-Tubulina (T9026 Sigma) con dilución 1:1000. Una vez incubados con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron con Buffer de lavado (TBS con 0.025% de Tween 20) y se incubaron con los anticuerpos secundarios (R&D Systems Anticuerpos acoplados a HRP anti-IgG de ratón y conejo con No. Cat.

HAF007 y HAF008, respectivamente), con dilución 1:2000, durante 2 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios y secundarios se diluyeron en TBS con 0.05% de Tween 20. Las membranas se revelaron con SuperSignal Kit (Pierce) en el equipo C-DiGit Blot scanner (LI-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA) y la cuantificación de la señal se realizó con el Software Image Studio™ Lite (LI-COR Biosciences).

6.12 SELECCIÓN CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO (CELL SORTING)

Las células se obtuvieron por tripsinización de cultivos de monocapa o con el uso de TrypLE™ Express de cultivos de esferas. Para el sistema reportero SORE6, la fluorescencia de células transducidas con el plásmido pCMV/mCherry o pCMV/GFP se usó como control negativo de fluorescencia, ya que los plásmidos pCMV poseen los sitios de respuesta al complejo Sox2-Oct3/4 mutados y por tanto, inactivos. En el caso del sistema reportero TOP-GFP-mCherry, la selección de las células transducidas se realizó con base a la fluorescencia basal de células sin transducir. Cada selección celular se realizó en el equipo FACSaria sorter y en los casos donde se indique, se sembró una célula única por cada pozo de placas de baja adherencia con medio de cultivo de formación de esferas.

6.13 ANÁLISIS *IN SILICO*

La cuantificación de la firma genética de la familia de NFAT se realizó con GEPIA2 (por las siglas en inglés Gene Expression Profiling Interactive Analysis 2) considerando el límite del grupo medio [109]. Para el análisis del mRNA de CAMK2B en las diferentes etapas del CRC, acorde al AJCC (por las siglas en inglés American Joint Committee on Cancer) se usaron los datos públicos TCGA de Pan-Cancer.

6.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se representan como el promedio \pm el error estándar del promedio de al menos 3 experimentos independientes. La prueba *t* de Student se usó para comparar el promedio de dos grupos. Para la comparación múltiple entre 3 o más grupos, se utilizó ANOVA, y posteriormente un análisis de Bonferroni. El valor de $p < 0.05$ se estableció como estadísticamente significativo.

7 RESULTADOS

7.1 LAS ESFERAS DE CÉLULAS DE CÁNCER DE COLON SE ENRIQUECEN DE CSC

El cultivo para formación de esferas es un modelo *in vitro* ampliamente descrito para estudiar células troncales normales y cancerosas [51]. Para establecer si las líneas celulares RKO, SW480 y SW620 tienen la capacidad de sobrevivir y proliferar en estas condiciones de cultivo, las células se sembraron a baja densidad clonal en placas no adherentes y en ausencia de suero. La Eficiencia de Formación de Esferas (EFE) se cuantificó con base a la relación de las esferas formadas entre las células sembradas. Los resultados mostraron que una subpoblación de células generó esferas, sin embargo, SW480 tuvo la EFE más baja en comparación a RKO y SW620, las cuales tuvieron una EFE similar (Figura 7A). El análisis de la auto-renovación de las células que formaron esferas, se realizó por medio de cultivos secuenciales. Para esto, el cultivo de esferas a partir de células obtenidas de monocapa se consideró como la primera generación. Posteriormente, las esferas de la primera generación se disociaron a células individuales y se sembraron en un nuevo cultivo de formación de esferas, al cual se le denominó segunda generación. Finalmente, las esferas de la segunda generación se disociaron nuevamente y se sembraron en un nuevo cultivo para formar esferas de tercera generación. La cuantificación de la EFE en cada generación demostró que una subpoblación celular mantiene la capacidad de formar esferas, es decir, que las células se auto-renovaron y, por lo tanto, que las esferas se constituyeron de CSC (Figura 7A). El concepto de enriquecimiento de CSC hace referencia a dos aspectos que pueden observarse en el cultivo de esferas. El primero es respecto a la proporción relativa de las CSC con respecto a la población celular total, la cual es mayor en cultivos de esferas que en cultivos adherentes. El segundo es en relación a que la proporción relativa de CSC aumenta a través de los cultivos de esferas secuenciales. Para este último, se ha observado que no necesariamente sucede, ya que las CSC pueden optar por una división simétrica para aumentar el número de CSC, o una división asimétrica, lo que mantiene constante el número de CSC dentro del cultivo celular [43, 44].

El estado troncal también se relaciona con la actividad transcripcional de Oct3/4, Sox2 y NANOG [110]. Es por ello que, para corroborar la presencia de CSC en los cultivos de esferas, se usó un plásmido reportero denominado pSORE6, el cual tiene una secuencia de elemento de respuesta al complejo transcripcional Sox2-Oct3/4, que regula la expresión de mCherry o GFP, según el plásmido utilizado. Como control negativo, se usó el plásmido pCMV, el cual tiene estas secuencias del elemento de respuesta mutadas, por lo que la expresión de la proteína fluorescente solo depende del promotor mínimo de CMV (Citomegalovirus). Es de mencionarse que se omitió la transducción del sistema reportero pCMV/pSORE6 en células SW620, ya que el objetivo también fue conocer si la presencia o ausencia de la versión trunca de APC causaba un cambio en la relación entre la actividad de Sox2-Oct3/4 y las CSC. No obstante, queda por definir si SORE6 también podría ser marcador molecular de las CSC en una línea celular proveniente de metástasis, como lo es SW620.

Los plásmidos pCMV/mCherry o pSORE6/mCherry se transdujeron en RKO para generar células RKO^{CMV} y RKO^{SORE6}. Por su parte, los plásmidos pCMV/GFP o pSORE6/GFP se transdujeron en SW480 para generar células SW480^{CMV} y SW480^{SORE6}. El análisis por citometría de flujo identificó una

subpoblación celular positiva a la actividad dependiente de Sox2-Oct3/4, a la cual se le denominó SORE6^+ , en esferas de $\text{RKO}^{\text{SORE6}}$ y $\text{SW480}^{\text{SORE6}}$, en comparación a las células transducidas con el plásmido control, RKO^{CMV} y $\text{SW480}^{\text{CMV}}$ (Figura 7B).

Para conocer si las células SORE6^+ se relacionan con capacidades asociadas a las CSC en RKO y SW480, estas células se sembraron a nivel de célula única por pozo en condiciones de formación de esferas. La EFE se cuantificó y se comparó con la EFE de células SORE6^- , las cuales se sembraron bajo las mismas condiciones. Los resultados mostraron que la EFE fue mayor en las células SORE6^+ que en las células SORE6^- , tanto para $\text{RKO}^{\text{SORE6}}$ como $\text{SW480}^{\text{SORE6}}$ (Figura 7C), lo que demostró que la actividad reportera del plásmido pSORE6 identifica a células con una mayor capacidad de formar esferas, rasgo de las CSC.

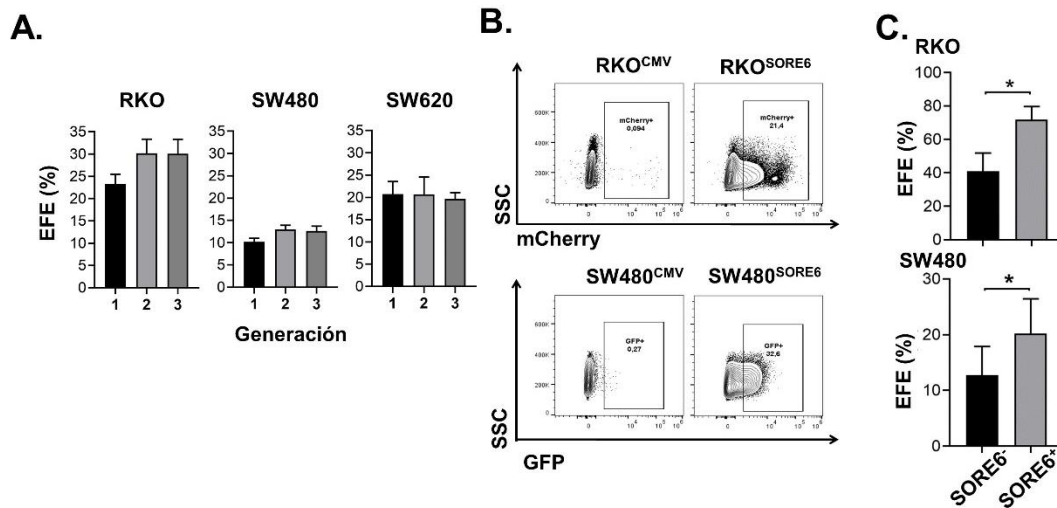


Figura 7. Auto-renovación de CSC capaces de formar esferas, en relación con una alta actividad transcripcional de Sox2-Oct3/4. **A)** Cuantificación de la EFE de RKO, SW480 y SW620 de tres generaciones consecutivas de formación de esferas. **B)** Diagramas de densidad de células RKO transducidas con pCMV/mCherry o pSORE6/mCherry y células SW480 con pCMV/GFP o pSORE6/GFP. **C)** Cuantificación de la EFE de cultivos de células únicas aisladas de las subpoblaciones celulares SORE6^- y SORE6^+ de $\text{RKO}^{\text{SORE6}}$ y $\text{SW480}^{\text{SORE6}}$. Los datos se representan como el Promedio \pm Error Estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con una prueba t de Student (C) o ANOVA de una vía (A), seguida de una comparación múltiple de Bonferroni. * $p < 0.05$.

Para corroborar que el sistema reportero SORE6 identifica principalmente a CSC, se evaluó la auto-renovación. Para ello, las células transducidas con pCMV o pSORE6 se sembraron en condiciones de formación de esferas y se realizaron los cultivos secuenciales para saber si el porcentaje de células SORE6^+ se mantenía. El análisis por citometría de flujo reveló que la proporción de células SORE6^+ fue similar a lo largo de las generaciones de las esferas, e incluso incrementó en la tercera generación, siendo estadísticamente significativo en $\text{RKO}^{\text{SORE6}}$ (Figura 8A). Para saber si el porcentaje de las células SORE6^+ en los cultivos secuenciales se relacionaba con la capacidad de formar esferas, se midió la EFE en la primera, segunda y tercera generación de las células transducidas. La cuantificación de la EFE demostró que el porcentaje de células que sobreviven y forman esferas se mantiene a lo largo de los cultivos secuenciales en las células transducidas con pCMV o pSORE6 (Figura 8B). Incluso, acorde a lo observado en el aumento de células SORE6^+ , la EFE incrementó en

RKO^{SORE6} en la tercera generación (Figura 8B). Además, la EFE se midió en las células transducidas con pCMV para descartar la posibilidad de que la transducción afectase la capacidad de auto-renovación. Como mostraron los datos, la EFE de RKO^{CMV} y SW480^{CMV} se mantuvo en cultivos secuenciales, e incluso incrementó en la tercera generación (Figura 8B). Por lo tanto, el sistema CMV/SORE6 permitió establecer que los cultivos de esferas contienen CSC, las cuales pueden identificarse, además de la capacidad de auto-renovación, por la alta actividad del complejo transcripcional Sox2-Oct3/4.

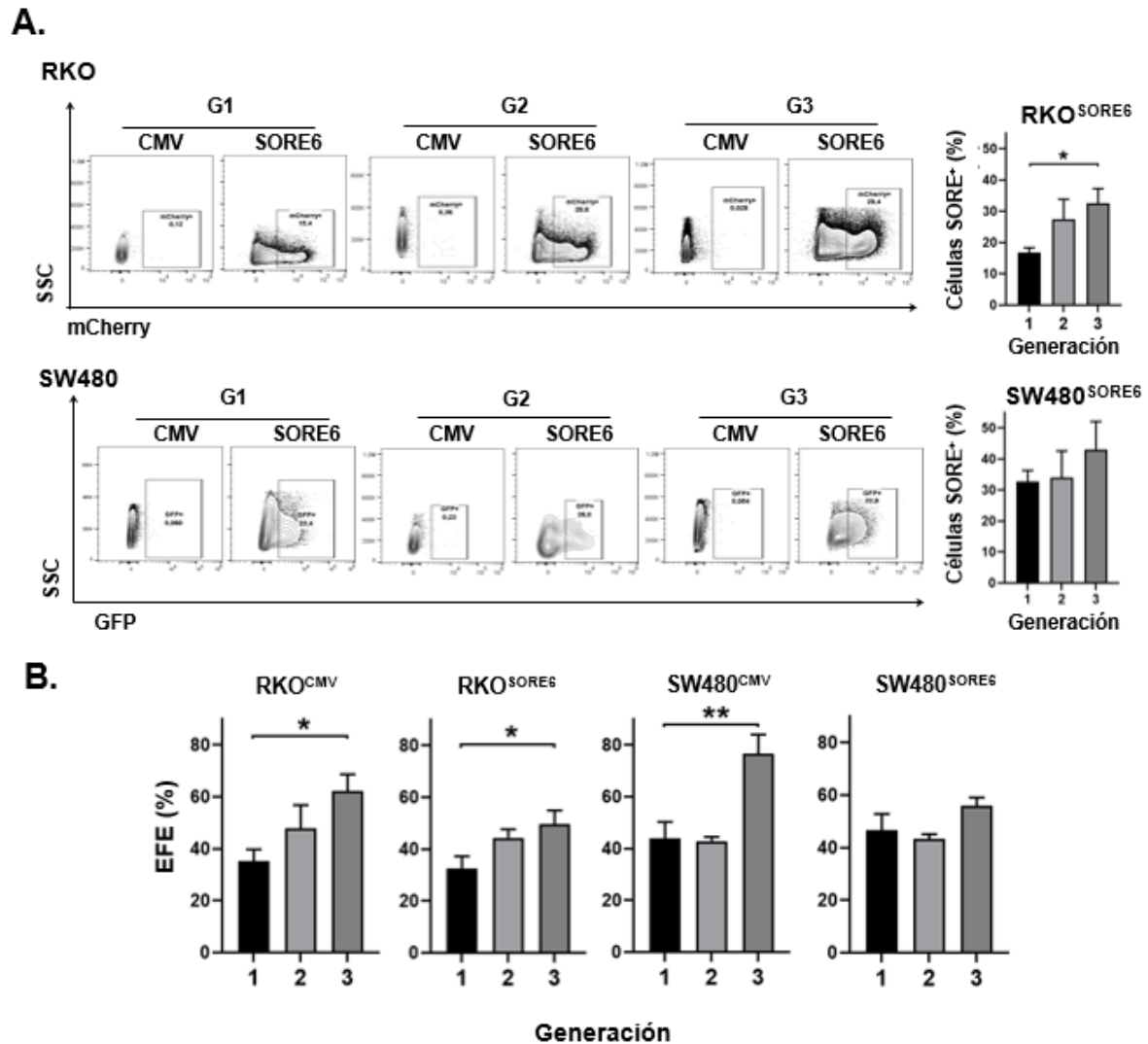


Figura 8. Auto-renovación de CSC con alta actividad transcripcional de Sox2-Oct3/4 en cultivos de esferas.
A) Diagrama de densidad de RKO^{SORE6} y SW480^{SORE6} de tres generaciones consecutivas (panel izquierdo). Cuantificación del porcentaje de células SORE6⁺ en cada generación de formación de esferas (panel derecho).
B) Cuantificación de la EFE de RKO^{CMV}, RKO^{SORE6}, SW480^{CMV} y SW480^{SORE6} de tres generaciones consecutivas de formación de esferas. Los datos se representan como el Promedio ± Error Estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía, seguida de una comparación múltiple de Bonferroni. *p<0.05; **p<0.005.

7.2 WNT/ β -CATENINA CAMBIA EN RESPUESTA A WNT3A EN ESFERAS DE RKO Y SW620, MIENTRAS QUE PERMANECE SIN CAMBIOS EN ESFERAS DE SW40

La respuesta de la vía Wnt canónica a los ligandos Wnt, en particular a Wnt3a, es parcialmente regulado por las mutaciones en los componentes que constituyen esta vía [107]. En el presente trabajo, RKO son células que expresan la versión silvestre de la proteína APC, por lo que la vía Wnt canónica carece de una sobre-activación de APC. Por su parte, SW480 y SW620 son células que expresan la forma trunca de APC y, por lo tanto, poseen la vía Wnt canónica constitutivamente activa [107]. Acorde a esto, previamente se demostró que el ligando prototipo canónico Wnt3a activa la actividad reportera dependiente de la transcripción por β -catenina, mientras que el ligando prototipo no canónico Wnt5a inhibió esta activación por Wnt3a [107]. No obstante, estos hallazgos fueron en condiciones de cultivo de monocapa, por lo que fue de interés saber si esto mismo ocurría en el cultivo de esferas. Para ello, se transdujeron las células RKO, SW480 y SW620 con el sistema reportero TOP-GFP-mCherry, el cual permite analizar la actividad transcripcional dependiente de β -catenina mediante la expresión de GFP, a la vez que identifica a las células transducidas debido a la expresión constitutiva de mCherry. Una vez generadas las células RKO^{TOP/GFP}, SW480^{TOP/GFP} y SW620^{TOP/GFP}, se sembraron en condiciones de formación de esferas y los cultivos fueron suplementados con los ligandos recombinantes Wnt3a o Wnt5a cada tercer día, según se muestra en el esquema experimental (Figura 9). Se realizaron ensayos bajo una sola estimulación al inicio de la formación de esferas (tratamiento agudo), pero debido a que la respuesta en la actividad reportera fue baja (datos no mostrados), se optó por el tratamiento crónico.

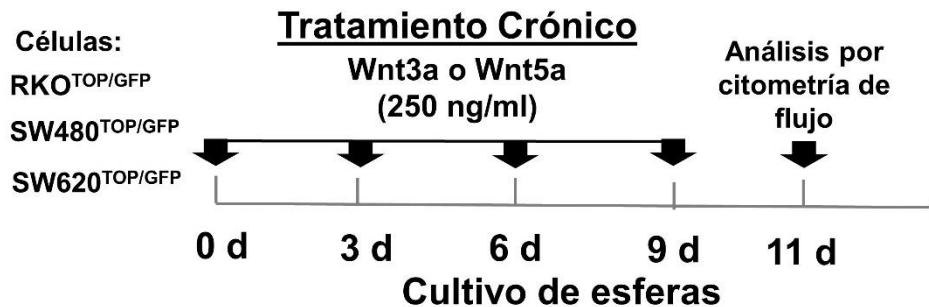


Figura 9. Esquema experimental para la estimulación de esferas con ligando recombinante Wnt3a o Wnt5a.

Los resultados, en concordancia a lo reportado en condiciones de monocapa, mostraron que el porcentaje de células GFP⁺ incrementó en esferas de RKO^{TOP/GFP} en presencia de Wnt3a, pero no de Wnt5a (Figura 10A). Acorde a esto, los niveles de la forma activa de β -catenina, es decir no fosforilada en los residuos serina 33, serina 37 y treonina 41, aumentan en las esferas de RKO de segunda generación estimuladas con Wnt3a, pero no con Wnt5a, lo que demuestra que la vía Wnt canónica se activa por Wnt3a en esferas de RKO (Figura 10B). Por su parte, las esferas de SW480^{TOP/GFP} mostraron una alta actividad del reportero en condiciones basales, la cual permaneció similar pese a la presencia de Wnt3a o Wnt5a, lo que demostró que la vía Wnt canónica está constitutivamente activa y, por tanto, no responde a ligandos Wnt en SW480 (Figura 10A). De manera interesante, las esferas de SW620^{TOP/GFP} mostraron dos subpoblaciones celulares en condiciones basales: células GFP⁺ y células GFP⁻ (Figura 10A). Esto implica que, pese a que SW620 se deriva de la metástasis del tumor primario del cual se aislaron las células SW480, las células SW620 tienen un estado de activación distinto de la vía Wnt canónica. Además, no solo el estado de activación fue diferente,

sino que, al estimular con los ligandos Wnt, tanto en presencia de Wnt3a como de Wnt5a, el porcentaje de células GFP⁺ disminuyó en SW620^{TOP/GFP} (Figura 10A). Por lo tanto, los resultados mostraron que la respuesta de la vía Wnt canónica a los ligandos Wnt, al menos para Wnt3a o Wnt5a, es distinta entre las líneas celulares usadas en el presente trabajo, lo que indica que se dicta por contextos específicos.

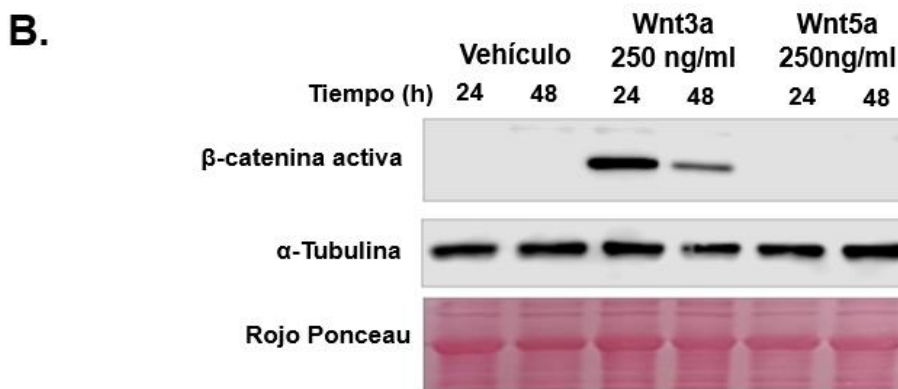
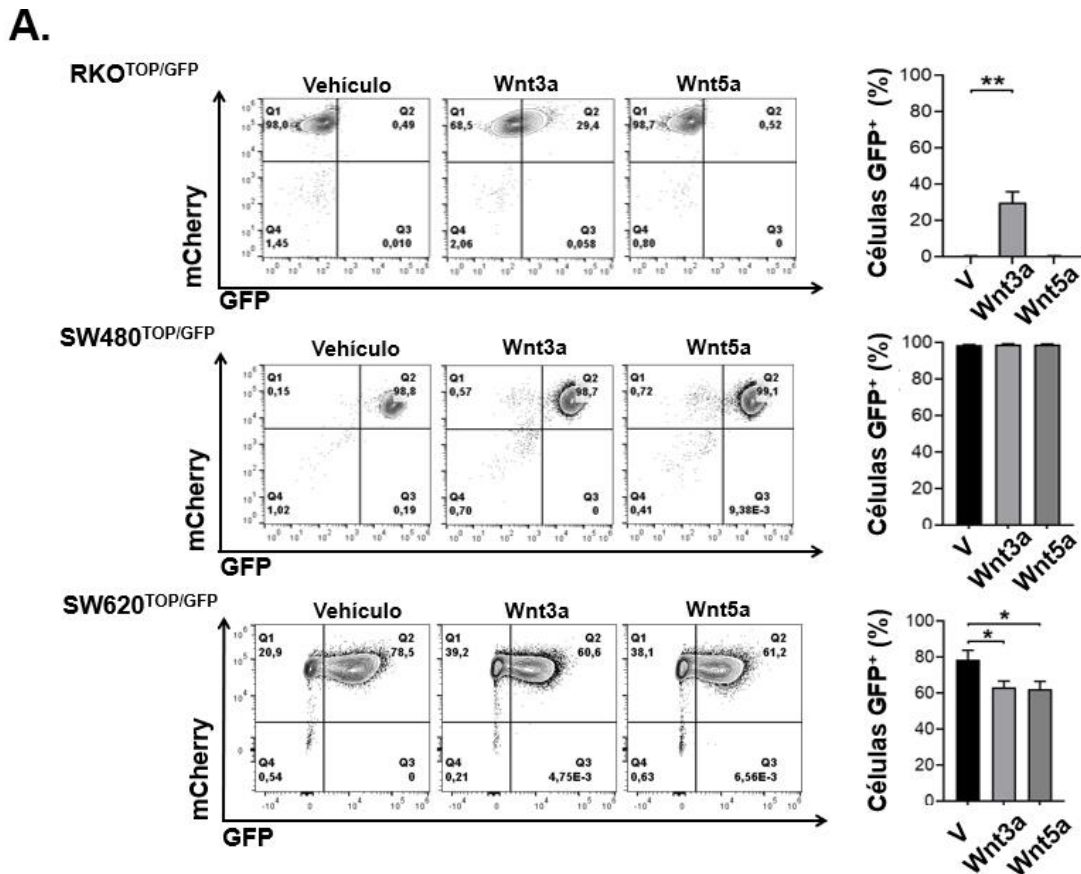


Figura 10. Actividad transcripcional dependiente de β -catenina por el estímulo Wnt3a o Wnt5a en esferas. **A)** Diagrama de densidad (panel izquierdo) y cuantificación de células GFP⁺ (panel derecho) de esferas de RKO^{TOP/GFP}, SW480^{TOP/GFP} y SW620^{TOP/GFP} tratadas con Vehículo, Wnt3a o Wnt5a. El análisis se realizó por citometría de flujo y las células transducidas se indican como mCherry⁺. **B)** Análisis de la forma activa de β -catenina por Western Blot en esferas de segunda generación de RKO en ausencia o presencia de Wnt3a o Wnt5a, a las 24 h y 48 h de tratamiento. α -tubulina y el rojo Ponceau se usaron como controles de carga. Los

datos se representan como el Promedio \pm Error Estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía, seguida de una comparación múltiple de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

7.3 WNT3A Y WNT5A INCREMENTAN LA FORMACIÓN DE ESFERAS EN RKO Y SW620, EN CONTRASTE A SW480, DONDE LA DISMINUYE

Una vez establecido que la vía Wnt canónica responde diferente ante ligandos Wnt en esferas de RKO, SW480 y SW620, fue de interés saber si esto se relacionaba con un posible cambio en las características de CSC, específicamente en la capacidad de formar esferas. Para ello, las células se estimularon con cada uno de los ligandos Wnt. Como diseño experimental inicial, los ligandos se adicionaron en condiciones de monocapa, ya que, bajo estas condiciones, previamente se reportó que los ligandos Wnt favorecieron la migración [107]. A esta etapa en la cual las células se estimularon durante 8 h en monocapa se le denominó pretratamiento. Al término del pretratamiento, las células se sembraron para formar esferas y durante esta etapa se adicionaron los ligandos Wnt cada tercer día con el propósito de mantener la estimulación, al cual se le denominó tratamiento crónico, conforme al esquema experimental mostrado en la Figura 11A. Los resultados revelaron que la EFE aumentó en las esferas de RKO y SW620 en presencia de Wnt3a o Wnt5a (Figura 11B). Pese a que no fue estadísticamente significativo en RKO con Wnt3a, el incremento observado pudiese deberse a la activación de la actividad transcripcional dependiente de β -catenina, conforme a lo descrito con el sistema reportero TOP (Figura 10A). No obstante, el incremento de la EFE por Wnt5a en RKO y SW620, en cuyo caso ambos fueron estadísticamente significativos, es independiente de la transcripción por β -catenina, ya que el sistema reportero TOP no aumentó en presencia de este ligando, e incluso disminuyó en esferas de SW620 (Figura 10A). Estos hallazgos establecen que la capacidad de formar esferas no depende necesariamente de la vía Wnt canónica, al menos en estas células, sino que, posiblemente sean vías Wnt independientes de β -catenina quienes contribuyan a este efecto. Por su parte, la EFE de SW480 se redujo en presencia de Wnt3a o Wnt5a (Figura 11B), lo que sugirió que vías alternas de señalización pudiesen participar, donde β -catenina es prescindible, ya que la actividad reportera TOP permaneció similar en presencia o ausencia de los ligandos Wnt (Figura 10A).

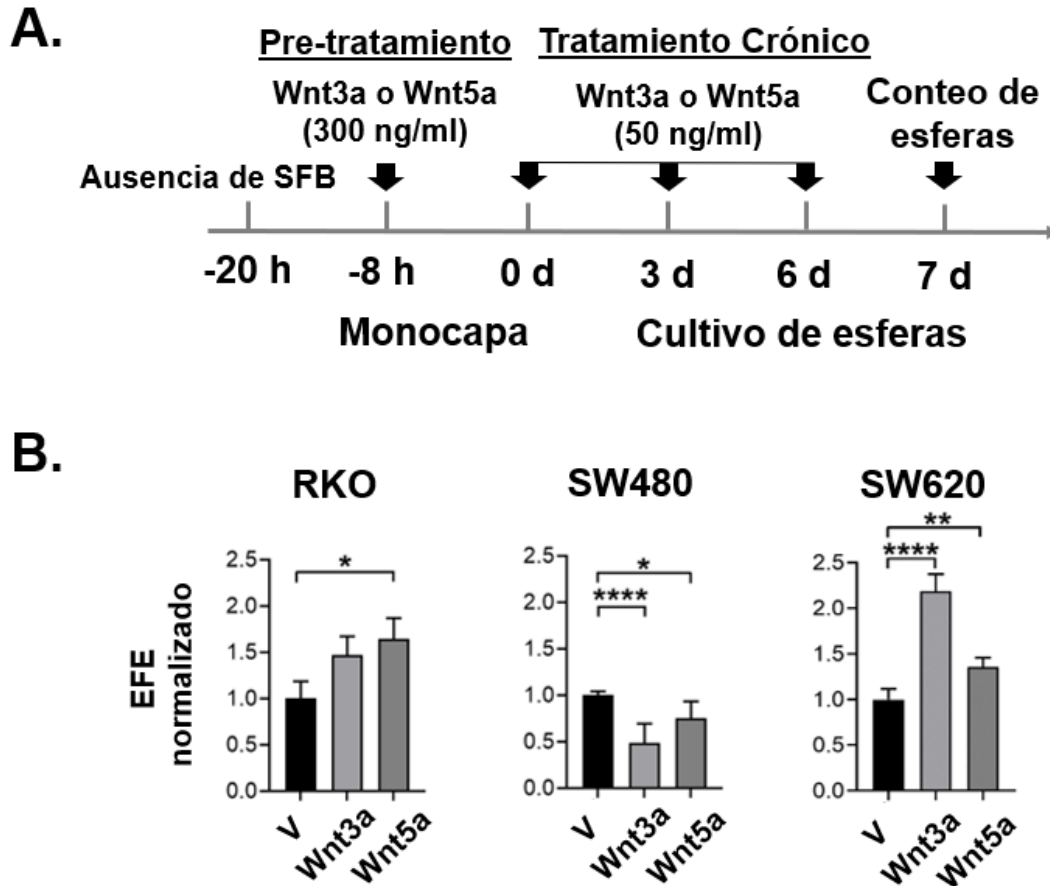


Figura 11. El pre-tratamiento y tratamiento crónico con Wnt3a o Wnt5a estimula la formación de esferas en RKO y SW620, pero disminuye en SW480. A) Esquema experimental para la estimulación de esferas con pre-tratamiento y tratamiento crónico de ligando Wnt3a o Wnt5a, en líneas celulares de cáncer de colon. **B)** Cuantificación de la EFE de RKO, SW480 y SW620 con pre-tratamiento y tratamiento crónico de Wnt3a o Wnt5a, según el esquema en el panel A. Los datos se representan como el Promedio \pm Error Estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía, seguida de una comparación múltiple de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

Para confirmar que los resultados del pretratamiento y tratamiento crónico de los ligandos Wnt sobre la capacidad de formar esferas se deben a un efecto directo sobre los cultivos enriquecidos de CSC, se omitió el pretratamiento y el estímulo solo fue durante la etapa de crecimiento de las esferas, es decir, se realizó exclusivamente el tratamiento crónico, como se describe en el esquema experimental (Figura 12A). Los resultados mostraron que la EFE incrementó en RKO y SW620 en presencia de Wnt3a o Wnt5a, similar a lo observado cuando se usó el pretratamiento y el tratamiento crónico (Figura 12B-C). En el caso de las esferas de RKO, el aumento fue dependiente de la concentración. Pese a que ambos ligandos Wnt estimularon la formación de esferas, Wnt5a mostró un cambio más evidente en comparación a Wnt3a, lo que sugirió que cada ligando Wnt no activa necesariamente las mismas vías de señalización, a pesar de tener la misma tendencia sobre este rasgo de CSC. Por su parte, la EFE disminuyó en SW480 cuando las células se estimularon con Wnt3a o Wnt5a bajo tratamiento crónico, similar a lo visto cuando se empleó el pretratamiento y el tratamiento crónico (Figura 12D). Es de considerarse que, si bien las variaciones observadas oscilan

en valores alrededor de 0.5 en rango de cambio, esto implica que del 100% de CSC presentes en el cultivo de esferas, la proporción de CSC incrementa o disminuye aproximadamente un 50%, lo que pudiera tener un impacto biológico importante, en particular cuando el desafío en el campo clínico es erradicar a este tipo de células. Por lo tanto, los resultados concordaron con lo observado en las células pre-tratadas, y, considerando la actividad del reportero dependiente de β -catenina en cada línea celular, estos cambios en la formación de esferas no se deben, al menos por lo descrito en este trabajo, a la activación de la vía Wnt canónica, sino que es la participación de vías Wnt no canónicas las que emergen como posibles mecanismos.

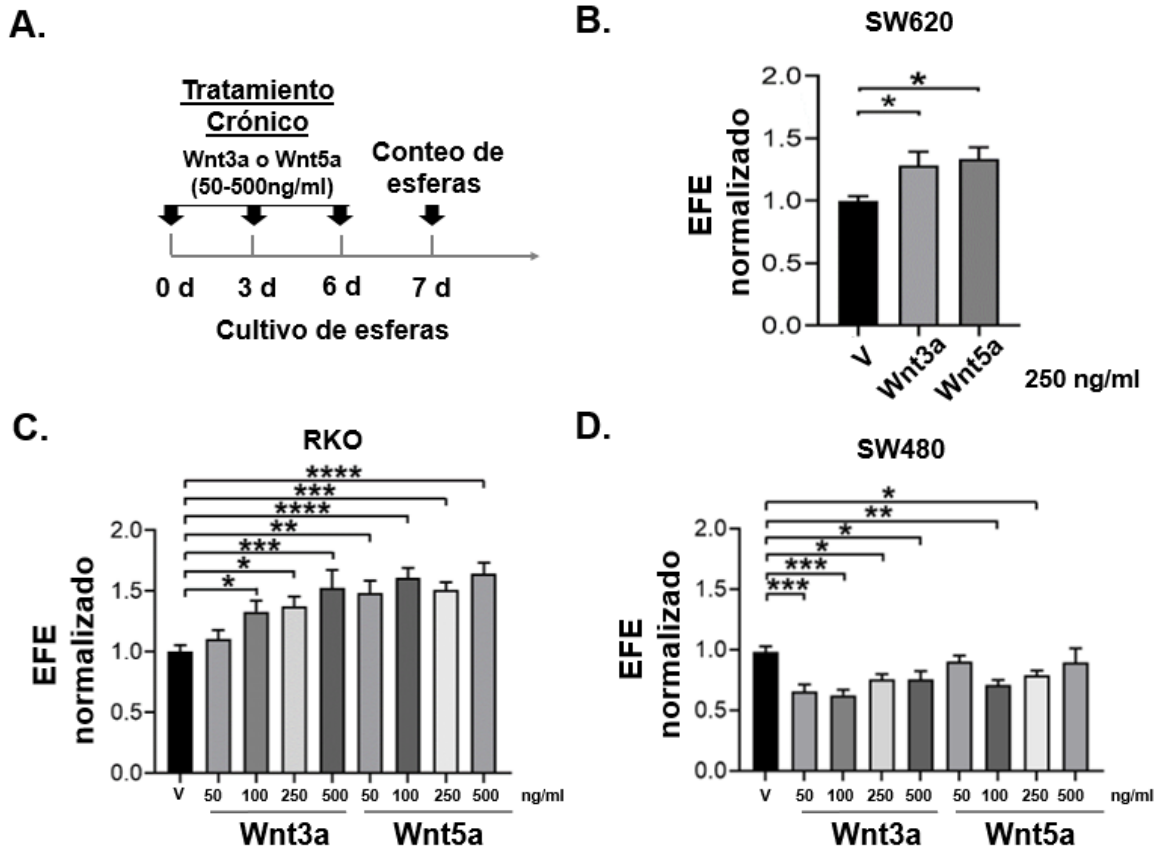


Figura 12. El tratamiento crónico con Wnt3a o Wn5a estimula la formación de esferas en RKO y SW620, pero disminuye en SW480. A) Esquema experimental para la estimulación de esferas con tratamiento crónico de ligando Wnt3a o Wnt5a. Cuantificación de la EFE de RKO (C), SW480 (D) y SW620 (B) con tratamiento de Wnt3a y Wnt5a según el esquema en el panel A. Los datos se representan como el Promedio \pm Error Estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía, seguida de una comparación múltiple de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

7.4 LOS LIGANDOS WNT AFECTAN LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA EN LAS ESFERAS A CORTO Y LARGO PLAZO, DEPENDIENDO DEL CONTEXTO CELULAR

La proliferación es un aspecto importante en el estudio de las CSC, por lo que fue de interés conocer cómo ésta se afecta durante la formación de esferas en presencia de los ligandos Wnt. Para ello, el

número de células se cuantificó al día 11 de cultivos de esferas estimuladas con el tratamiento crónico con Wnt3a o Wnt5a. En esta cuantificación, las células se tiñeron con azul de Tripano para contabilizar a las células vivas. Respecto al número de células muertas, es decir teñidas con azul de Tripano, las diferentes concentraciones de ligandos Wnt no cambiaron notoriamente este número, lo que indica que el cambio en el número de células no se debe a la muerte celular. Sin embargo, queda por corroborar que, en efecto la proliferación cambia, por medio de técnicas metodológicas complementarias.

Los resultados de la cuantificación del número de células, indicador indirecto de proliferación, mostraron que en RKO, el número de células fue menor a las concentraciones más altas de Wnt3a o Wnt5a en comparación a las células tratadas con vehículo (Figura 13A), pese al incremento de la EFE observado en las mismas condiciones (Figura 12C). Esta evidencia sugiere que la formación de esferas y la proliferación son dos procesos celulares que pudiesen regularse diferente bajo un mismo estímulo. Acorde a esto, las esferas de SW620 se estimularon con una única concentración de ligandos Wnt y se observó una tendencia similar, donde el número de células disminuyó (Figura 13C), a pesar de que la EFE aumentara bajo el mismo contexto experimental (Figura 12B). La demostración de una regulación diferencial entre la formación de esferas y la proliferación se refuerza por lo encontrado en SW480 donde, a diferencia de RKO y SW620, ambos ligandos Wnt favorecieron la proliferación celular (Figura 13B), pese a reducir la EFE en los mismos cultivos de esferas (Figura 12D). Por lo tanto, la consecuencia de la presencia de Wnt sobre la proliferación depende del contexto celular en cuestión, y su regulación parece ser independiente, o incluso opuesta, al efecto sobre la capacidad de formar esferas.

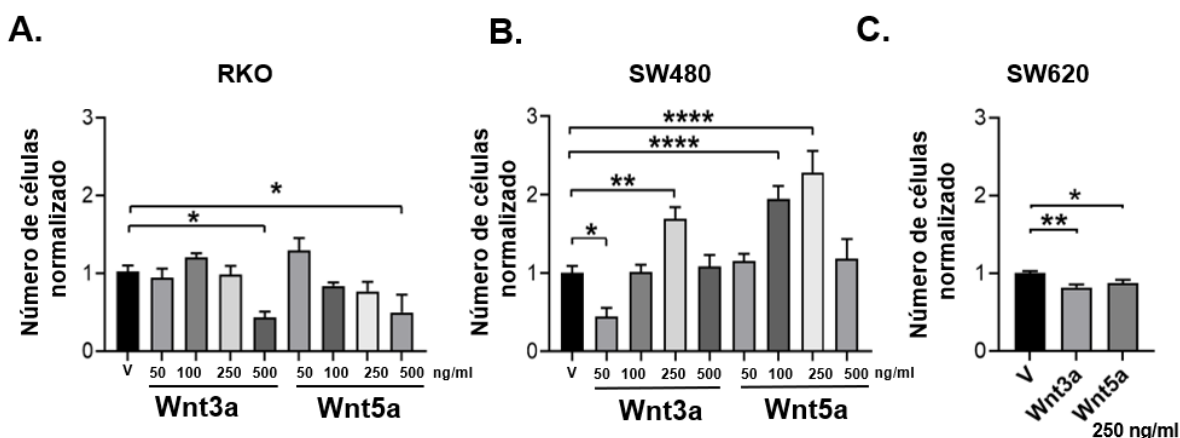


Figura 13. Efecto de los ligandos Wnt en la capacidad proliferativa de esferas a corto plazo. Número normalizado de células obtenidas de la primera generación de esferas de RKO(A), SW480(B) y SW620(C) tratadas con ligando Wnt3a o Wnt5a, a las concentraciones indicadas, según el esquema experimental en el panel 3A. Los datos se representan como el Promedio \pm Error Estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía, seguida de una comparación múltiple de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

Además de llevar a cambios de corto plazo en las células, los ligandos Wnt también pueden generar efectos que perduren durante tiempos más largos [111, 112]. Es por ello que, fue de nuestro interés conocer si la estimulación con Wnt en la primera generación de esferas pudiese tener un impacto en generaciones subsecuentes, es decir en la segunda y tercera generación, cuando las células ya no

fuesen estimuladas. Para ello, se analizó la capacidad proliferativa y se comparó el número de células, normalizando con las células tratadas con el vehículo (control negativo), entre la primera, segunda y tercera generación de formación de esferas. El estudio se enfocó en la dosis de 250 ng/ml de Wnt3a o Wnt5a, ya que a mayor concentración de ligando Wnt se observó un cambio más evidente, sin embargo, no se escogió 500 ng/ml, porque las células mostraron adherencia parcial a la placa de cultivo bajo esta dosis.

En RKO, se observó un aumento en la proliferación en la tercera generación al tratar con Wnt3a (Figura 14A). Mientras tanto, Wnt5a mantuvo el número de células en las tres generaciones, lo que sugiere que ambos ligandos Wnt regulan diferencialmente esta característica a largo plazo (Figura 14A). En el caso de SW480 y SW620, los ligandos Wnt3a y Wnt5a incrementaron el número de células en generaciones posteriores, aunque esto fue estadísticamente significativo en la segunda generación de SW620 y en la tercera generación de SW480 (Figura 14B-C). Por lo tanto, los resultados demostraron que Wnt3a actúa como regulador positivo de la proliferación durante la formación de esferas en generaciones posteriores de RKO, SW480 y SW620. Mientras tanto, SW480 y SW620 se comportaron similar en presencia de Wnt5a, en contraste a RKO, respecto a la proliferación a largo plazo, lo que sugiere un efecto dependiente del contexto celular en este caso (Figura 14A-C).

Debido a la ausencia de Wnt en la segunda y tercera generación de esferas, es posible que los ligandos Wnt desencadenen otras vías de señalización río abajo que sean responsables del efecto observado a largo plazo. Es importante mencionar que, durante la proliferación, nuevas células se generan, ya sea con identidad celular similar o diferenciada; en contraste a la expansión, la cual hace referencia solo a la capacidad de formar colonias que, para este modelo, son definidas como esferas. Esto explica en parte porqué ambos procesos no necesariamente tienen la misma tendencia e incluso, son antagónicos para la mayoría de casos. Este antagonismo pudiera deberse a que cada característica se asocie a una subpoblación celular, debido a la heterogeneidad evidenciada dentro de las esferas con el reportero SORE6 para RKO y SW480. Sin embargo, el aislamiento de células únicas careció de una relación aparentemente evidente entre el tamaño de las esferas, es decir proliferación, y el fenotipo molecular, no obstante, queda por demostrarse. Se destaca que, SW480 fue el de mayor rango de cambio en la proliferación de generaciones subsecuentes, pese a no cambiar la transcripción dependiente de β -catenina con Wnt3a o Wnt5a en la primera generación. Por lo tanto, los hallazgos sostienen la importancia de las vías Wnt no canónica en regular también la proliferación en cultivos enriquecidos de CSC.

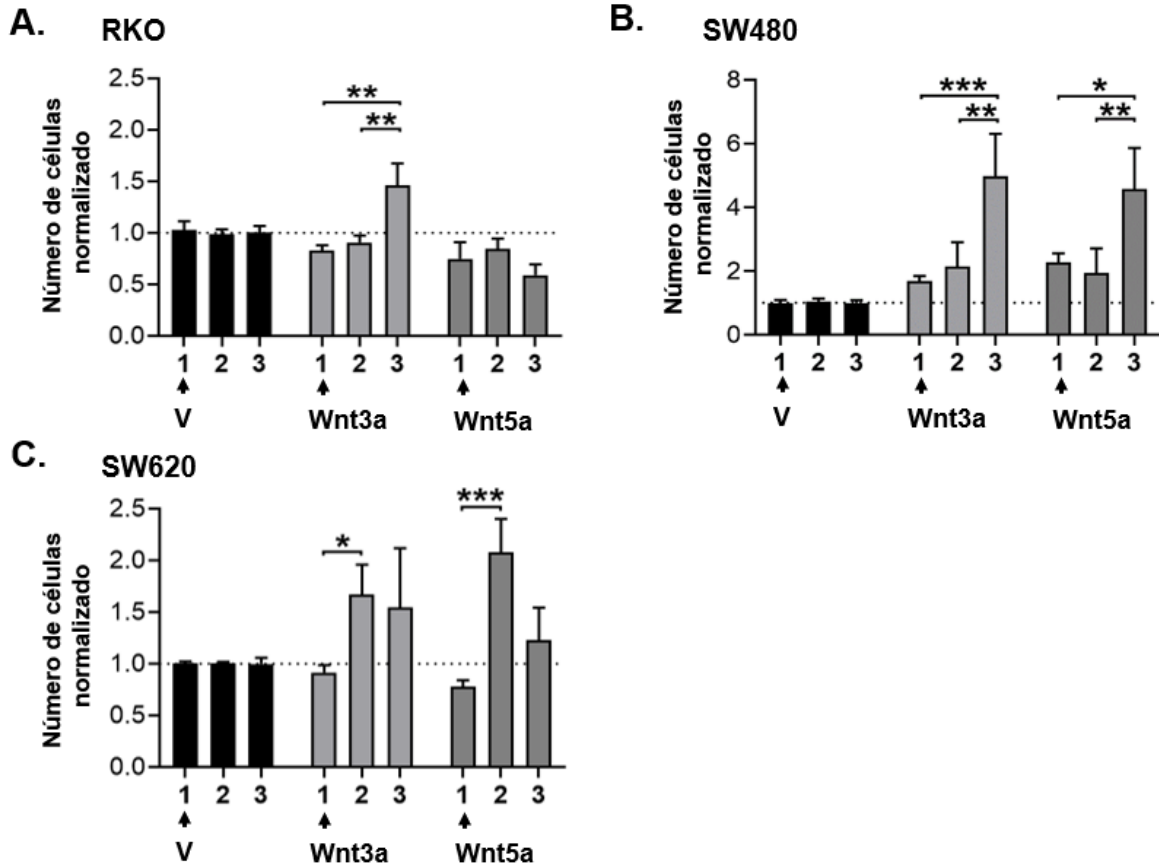


Figura 14. Efecto de los ligandos Wnt en la capacidad proliferativa de esferas a largo plazo. Número normalizado de células obtenidas de la primera, segunda y tercera generación de esferas de RKO(A), SW480(B) y SW620(C). Las esferas se trataron solo en la primera generación con el vehículo o con los ligandos Wnt3a o Wnt5a, a la concentración de 250 ng/ml, según el esquema experimental en el panel 3A. Los datos se representan como el Promedio \pm Error Estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía, seguida de una comparación múltiple de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

7.5 LA ACTIVIDAD DE PLC ES ESENCIAL PARA LA FORMACIÓN DE ESFERAS

Estudios previos en RKO y SW480 demostraron que Wnt3a y Wnt5a movilizan el calcio intracelular en condiciones de monocapa, a través de la actividad de PLC. Incluso, la actividad de PLC contribuyó a la migración en ensayos *in vitro* de cierre de herida en estas mismas células [107]. Debido a que los resultados del presente trabajo mostraron que los cambios funcionales en los cultivos enriquecidos en CSC son independientes de la vía Wnt canónica, fue de importancia conocer cual mecanismo Wnt no canónico pudiera estar participando. Es por ello que, se buscó identificar si los cambios en las esferas en respuesta a Wnt, son dependientes de la movilización del calcio intracelular. En primer lugar, el calcio se analizó en esferas de RKO, SW480 y SW620, mediante el uso de Fura-2/AM, el cual es un indicador fluorescente que se une al calcio y permite medir cambios en las concentraciones intracelulares. Las esferas de primera generación fueron disgregadas a nivel de célula única y una vez obtenidas, fueron estimuladas con Wnt para medir cambios en el calcio. Para

este caso, el estímulo se realizó usando el medio condicionado obtenido de fibroblastos que secretan Wnt3a o Wnt5a. Como control negativo, se utilizó el medio condicionado obtenido de fibroblastos que carecen del vector de expresión para Wnt3a o Wnt5a. El análisis mostró que el estímulo con Wnt3a o Wnt5a incrementa los niveles intracelulares de calcio en células derivadas de esferas de RKO, SW480 y SW620 (Figura 15A). De forma interesante, las cinéticas de movilización de calcio intracelular por Wnt5a fueron diferentes entre las líneas celulares, en contraste a aquellas en respuesta a Wnt3a, las cuales fueron similares. Para conocer si la movilización de calcio dependía de la actividad de PLC, las células derivadas de esferas fueron tratadas con el inhibidor de PLC, denominado U73122, antes de la estimulación con Wnt3a o Wnt5a, usando la concentración previamente reportada para estas mismas células [107]. Los resultados mostraron que el tratamiento con U73122 redujo notoriamente la movilización de calcio en las tres líneas celulares, lo que remarca que la actividad de PLC es crucial para que los ligandos Wnt, tanto Wnt3a como Wnt5a, movilicen calcio en las células de esferas (Figura 15A). Es importante mencionar que debido a que el medio condicionado obtenido de fibroblastos contiene una diversidad de moléculas, sería pertinente corroborar estos resultados de movilización de calcio con el uso de ligandos Wnt recombinantes, así como se realizó en los demás experimentos realizados en el presente trabajo.

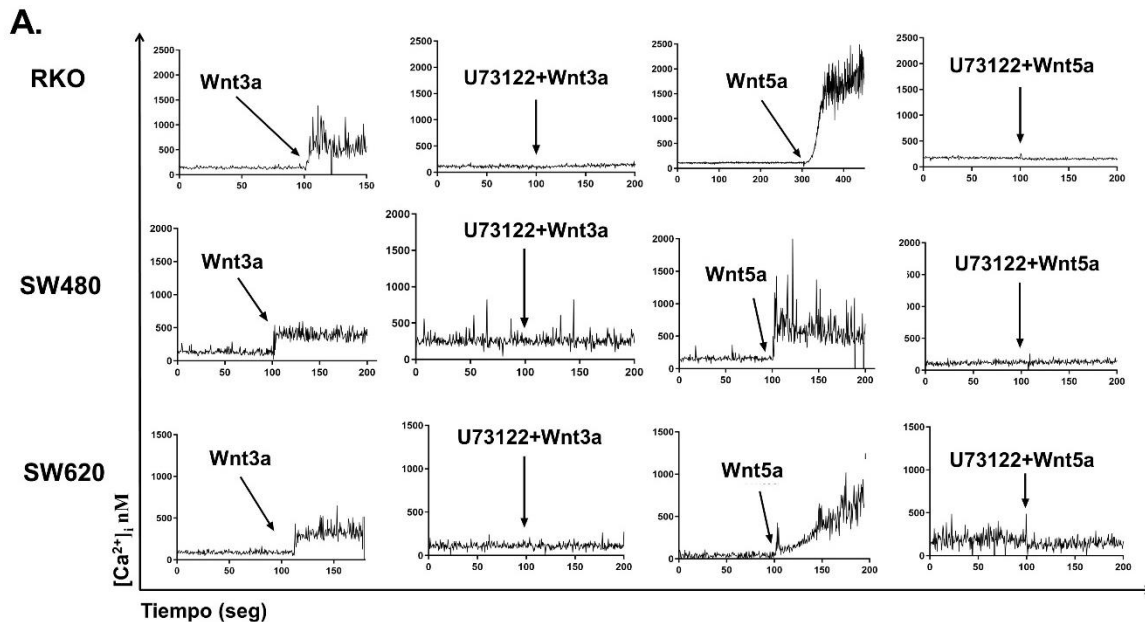


Figura 15. Wnt3a y Wnt5a movilizan calcio, a través de la actividad de PLC, en células derivadas de esferas.
A) Trazas representativas de la movilización de calcio, medido con Fura-2/AM, en células derivadas de esferas. Las flechas indican la adición del medio condicionado de fibroblastos secretores de Wnt3a o Wnt5a. El efecto de la inhibición de la actividad de PLC se midió al incubar a las células con 4 μ M de U73122 durante 10 min, previo a la adición de los medios condicionados enriquecidos con Wnt3 o Wnt5a.

Una vez establecido que las esferas movilizan calcio en presencia de Wnt, y que esta respuesta decae al inhibir a PLC, fue de interés saber si la actividad de PLC es importante para formar esferas, y, por consiguiente, para las CSC. Es por ello que, la EFE se cuantificó a diferentes concentraciones de U73122, manteniendo el mismo esquema experimental que el usado con los ligandos Wnt, es decir, cada tercer día durante la formación de esferas hasta la etapa de análisis. Los resultados mostraron que U73122 disminuyó la EFE de forma dependiente de la dosis en RKO, SW480 y SW620, siendo

estadísticamente significativo a la concentración de 500 nM (Figura 16A). Es importante recalcar la similitud de este fenómeno entre líneas celulares, pese a mostrar diferencias, como, por ejemplo, al aumentar la EFE en RKO y SW620, a la vez de disminuir en SW480 en respuesta a Wnt3a o Wnt5a (Figura 12B-D). Esto sugiere que la actividad de PLC es fundamental para la formación de esferas de CSC, siendo un componente generalizado, al menos por lo descrito en las líneas celulares evaluadas en el presente trabajo. Debido a que este fenómeno se pudiera deber a un efecto citotóxico del compuesto U73122, se midió la viabilidad celular en las distintas concentraciones para abordar esta posibilidad. Se observó que el porcentaje de células viables fue similar entre las esferas tratadas con vehículo y las esferas tratadas con las diferentes concentraciones de U73122, aún en las más altas, lo que corroboró que la inhibición de PLC perjudica la capacidad de formar esferas, sin promover la muerte celular (Figura 16B).

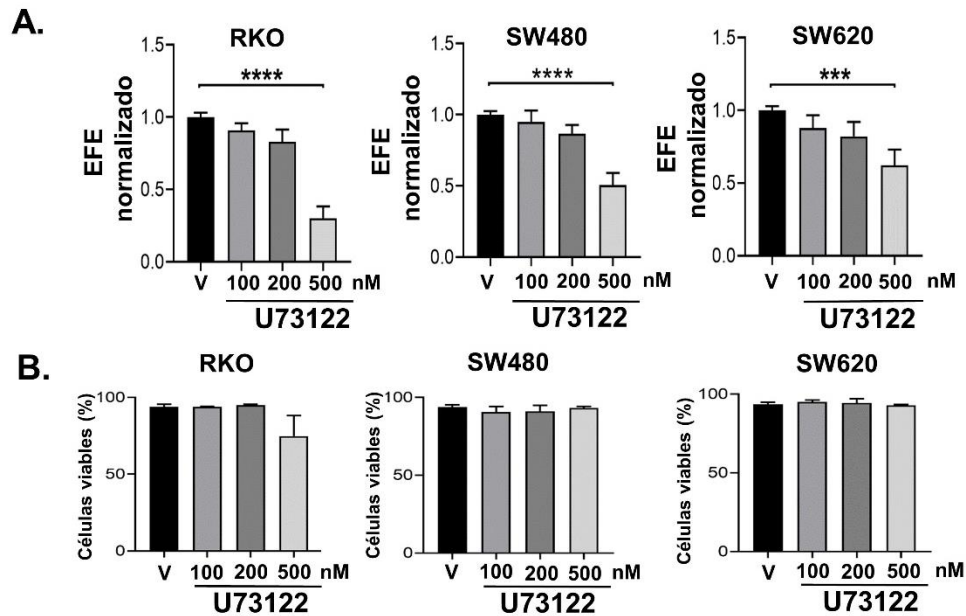


Figura 16. La inhibición de PLC disminuye la formación de esferas. A) Cuantificación de la EFE en esferas de RKO, SW480 y SW620 tratadas con el inhibidor de PLC U73122, a las concentraciones indicadas, cada tercer día durante el cultivo. **B)** Cuantificación de las células viables de esferas de RKO, SW480 y SW620, tratadas con U73122 bajo el mismo esquema que el panel A. El análisis se realizó al día 11 de formación de esferas, mediante citometría de flujo de células teñidas con Yoduro de Propidio. Las concentraciones de U73122 están indicadas. Los datos se representan como el Promedio \pm Error Estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía, seguida de una comparación múltiple de Bonferroni. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Se describe que la enzima PLC puede participar en la señalización río abajo de los ligandos Wnt, siendo la más descrita la vía Wnt/Calcio [107], por lo que se evaluó si la inhibición de PLC media los cambios en la formación de esferas inducidos por Wnt3a o Wnt5a. Para ello, las esferas fueron estimuladas con el tratamiento combinado de Wnt3a o Wnt5a y U73122 cada tercer día en el cultivo de esferas. Los resultados revelaron que la inhibición de PLC redujo la EFE en RKO y SW620, indistintamente si Wnt3a o Wnt5a estuviera o no presente, lo que indicó que, para favorecer el aumento en la formación de esferas, los ligandos Wnt requieren de la actividad de PLC (Figura 17A, C). Por su parte, en las esferas de SW480, la EFE que disminuyó por el estímulo único con Wnt3a o Wnt5a, permaneció bajo en presencia de U73122 y en la co-estimulación (Figura 17B). Es de

mencionarse para las esferas de SW480 que se encontró una diferencia significativa entre la disminución de la EFE por Wnt3a y aquella por U73122, lo que sugiere que Wnt3a reduce la formación de esferas en estas células por un mecanismo alternativo a la actividad de PLC. En general, debido a que los ligandos Wnt fueron incapaces de contrarrestar el efecto negativo sobre la formación de esferas por la inhibición de PLC, indica que esta enzima, en parte al regular el calcio intracelular, actúa río abajo de Wnt3a o Wnt5a, que en el caso de RKO y SW620, sirve para promover la formación de esferas.

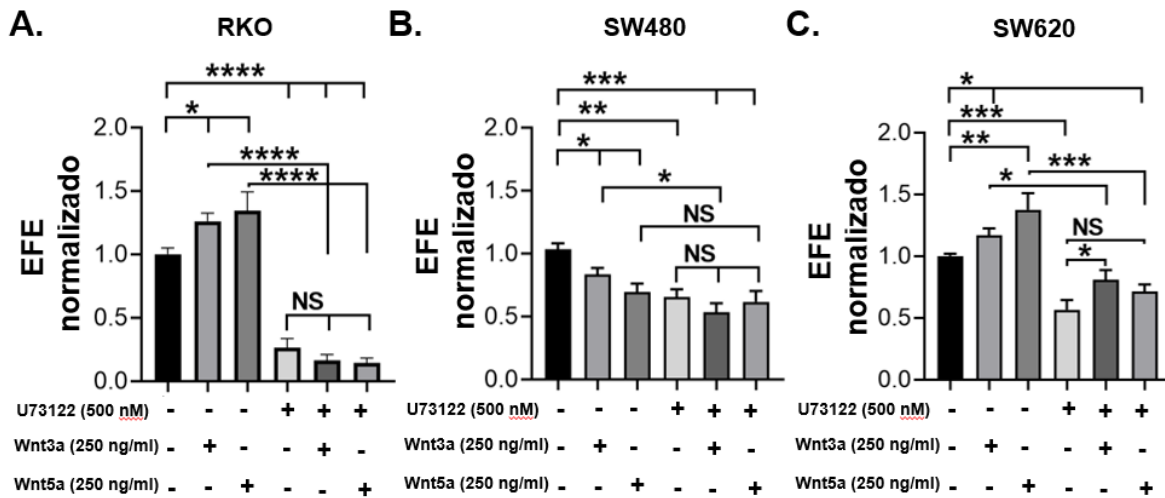


Figura 17. La inhibición de PLC revierte el aumento de la EFE por ligandos Wnt3a y Wnt5a. A) Cuantificación de la EFE de esferas de RKO(A), SW480(B) y SW620(C) tratadas con U73122, Wnt3a, Wnt5a, U73122+Wnt3a, o U73122+Wnt5a, según se indique. La concentración para cada estímulo se muestra en cada caso. Los datos se representan como el Promedio \pm Error Estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía, seguida de una comparación múltiple de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; NS: No Significativo.

7.6 LA FORMACIÓN DE ESFERAS REQUIERE DE LA FUNCIÓN DE NFAT

Una vez establecido que Wnt3a y Wnt5a movilizan calcio a través de la actividad de PLC en células derivadas de esferas, y que esta actividad de PLC es necesaria en las CSC para generar las esferas, lo siguiente fue conocer el posible componente río abajo. En otros estudios, se sabe que la vía Wnt/calcio regula la transcripción a través de los miembros de la familia NFAT [113]. En específico, NFAT1 (NFATc2), NFAT2 (NFATc1), NFAT3 (NFATc4) y NFAT4 (NFATc3) son dependientes de calcio, por lo que la expresión de cada uno se analizó en las líneas celulares de cáncer de colon. Además, se realizó el fraccionamiento subcelular, ya que su estado de activación podía ser inferido por la localización nuclear. Debido a que la fracción nuclear de esferas no permitió detectar a los miembros NFAT, posiblemente por la baja cantidad de proteína obtenida, se evaluó en fracciones nucleares de cultivos de monocapa. Los resultados revelaron que NFAT1, 2, 3 y 4 se detecta en el núcleo de RKO, SW480 y SW620, sugiriendo que tienen un estado activo constitutivo en condiciones basales (Figura 18A).

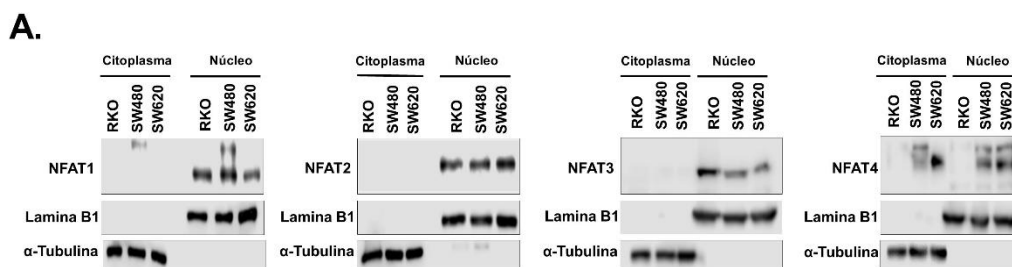


Figura 18. Activación constitutiva de los miembros de la familia NFAT en RKO, SW480 y SW620. A) Análisis de la expresión de NFAT1, NFAT2, NFAT3 y NFAT4 por Western Blot en fracciones subcelulares de cultivos de monocapa. Lamina B1 y α -tubulina se usaron como control de carga y para corroborar la pureza del fraccionamiento de las fracciones citoplasmática y nuclear.

Debido a esto, la actividad de los NFATs se bloqueó con 11R-VIVIT, un péptido que interfiere con la unión de NFAT con Calcineurina, fosfatasa que activa a NFAT. Para ello, los cultivos de esferas se estimularon con 11R-VIVIT cada tercer día hasta el análisis. Los resultados mostraron que 11R-VIVIT disminuyó las esferas formadas en RKO, SW480 y SW620 en una forma dependiente de la dosis. Similar a lo observado con el inhibidor de PLC U73122, la presencia de 11R-VIVIT desencadenó la misma tendencia en cada línea celular, pese a las diferencias descritas en la formación de esferas y la proliferación, lo que denota que la actividad de los NFATs es importante para las CSC en este rasgo distintivo. Notablemente, el rango de concentración de 11R-VIVIT requerido para reducir la EFE fue distinto entre las líneas celulares, donde las células de SW620 requirieron la mayor concentración de 11R-VIVIT y las células RKO la menor concentración, sugiriendo que la sensibilidad a 11R-VIVIT es específico del contexto celular (Figura 19A). La disminución de la formación de esferas por 11R-VIVIT no se debió a un efecto citotóxico, ya que, al evaluar la viabilidad celular con yoduro de propidio por citometría de flujo, se observó que el porcentaje de células viables fue similar entre las esferas tratadas con el vehículo y las esferas tratadas con 11R-VIVIT (Figura 19B). No obstante, quedó por establecer el efecto de 11R-VIVIT en la localización nuclear de NFAT1-4, para discernir si, en efecto, 11R-VIVIT restringe la presencia en el núcleo de los miembros NFAT, y por tanto, su actividad transcripcional.

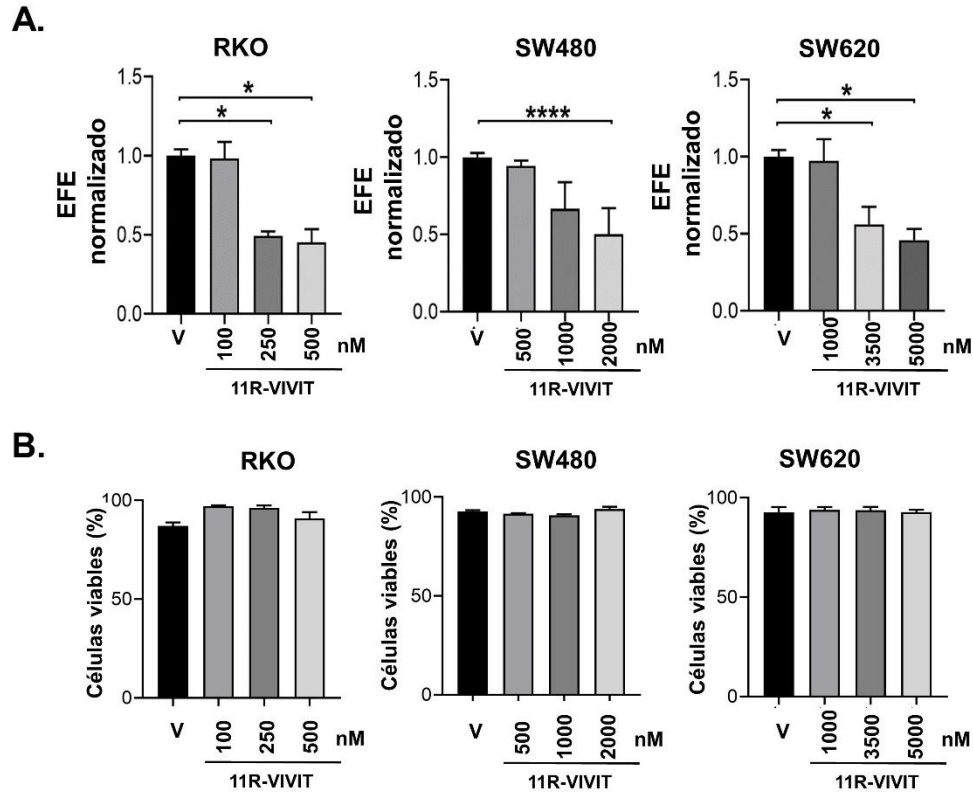


Figura 19. La actividad de NFAT se requiere para la formación de esferas. A) Cuantificación de la EFE en células de RKO, SW480 y SW620 tratadas con el inhibidor de NFAT 11R-VIVIT cada tercer día en el cultivo de esferas. Las concentraciones de 11R-VIVIT se indican en cada caso. **B)** Cuantificación de las células viables de esferas de RKO, SW480 y SW620 tratadas bajo el mismo esquema de estimulación que en el panel B. El análisis se realizó al día 11 de formación de esferas, mediante citometría de flujo de células teñidas con Yoduro de propidio. Los datos se representan como el Promedio \pm Error Estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía, seguida de una comparación múltiple de Bonferroni. * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$.

Posteriormente, para dilucidar si la inhibición de NFAT afectaba la respuesta de CSC ante Wnt3a o Wnt5a, el cultivo de esferas fue tratado simultáneamente con los ligandos Wnt y con 11R-VIVIT. La inhibición de NFAT se realizó con la concentración de 11R-VIVIT necesario para reducir el 50% de la EFE correspondiente a cada línea celular. Los resultados mostraron que 11R-VIVIT disminuyó la EFE, en presencia o ausencia de Wnt3a o Wnt5a, tanto en RKO como en SW620, pese a que los ligandos Wnt por sí solos aumentarían la EFE (Figura 20A, C). Por su parte, la EFE de esferas SW480 permaneció disminuido en los cultivos donde 11R-VIVIT y los ligandos Wnt estuvieron presentes. Por lo tanto, se demostró que NFAT es componente río abajo en la señalización de Wnt durante la estimulación de esferas con Wnt3a o Wnt5a, de acuerdo a lo observado en RKO y SW620 (Figura 20B).

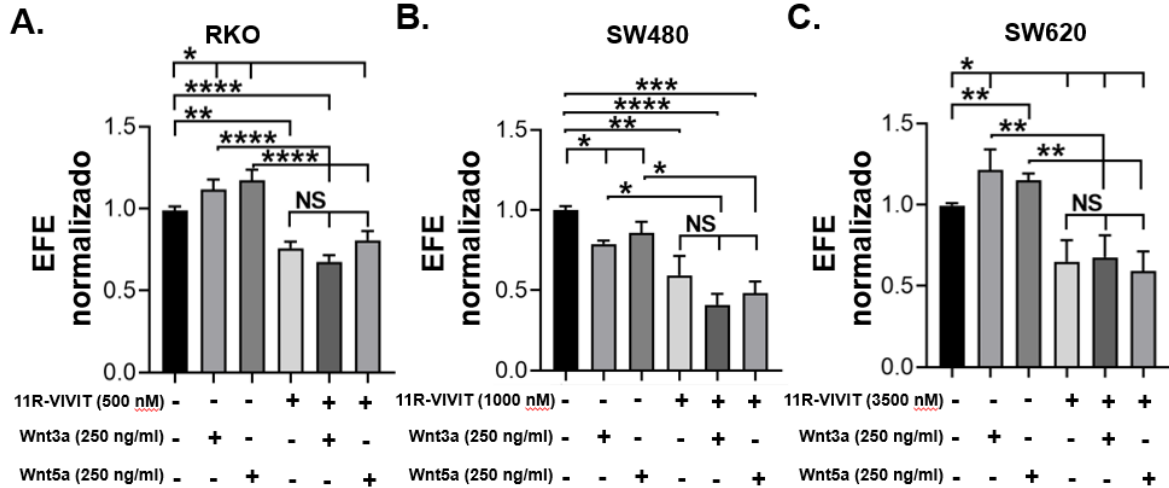


Figura 20. La inhibición de NFAT revierte el aumento de la EFE por ligandos Wnt3a y Wnt5a. Cuantificación de la EFE de esferas de RKO(A), SW480(B) y SW620(C) tratadas con 11R-VIVIT, Wnt3a, Wnt5a, 11R-VIVIT+Wnt3a, 11R-VIVIT+Wnt5a, según se indica. La concentración para cada estímulo se muestra en cada caso. Los datos se representan como el Promedio \pm Error Estándar de al menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía, seguida de una comparación múltiple de Bonferroni. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; NS: No Significativo.

7.7 LA VÍA WNT/CALCIO SE ASOCIA CON UNA MENOR SUPERVIVENCIA DE PACIENTES CON CÁNCER COLO-RECTAL

El papel de NFAT en los pacientes con CRC se ha descrito muy poco, sin embargo, existe evidencia que demuestra que, en efecto, miembros de esta familia pudieran ser importantes [114, 115]. Para conocer si la expresión de NFAT se asocia a un peor pronóstico, se utilizaron los datos públicos TCGA (por las siglas en inglés The Cancer Genome Atlas) de Pan-Cancer y la plataforma GEPIA2. Las curvas de supervivencia Kaplan-Meier mostraron que la sobre-expresión del perfil NFAT1, NFAT2, NFAT3 y NFAT4 en conjunto se asocia a un menor porcentaje de supervivencia (Figura 21A). Además, el estudio *in silico* de componentes de la vía Wnt/calcio mostró que la sobre-expresión de CAMK2B se relaciona a un bajo porcentaje de supervivencia (Figura 21B). Para este último, se analizaron los niveles de mRNA de CAMK2B en los distintos estadios de la progresión del cáncer establecidos por el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC). Se observó que CAMK2B incrementó en muestras de pacientes con CRC en estadios avanzados (Figura 21B-C). CAMK2B es la subunidad de CAMK2, cinasa con múltiples blancos y que actúa río abajo del calcio, por lo que la posible activación de CAMK2 por el incremento de calcio en respuesta a ligandos Wnt pudiera tener distintos efectores, incluso aquellos involucrados en propiedades de CSC.

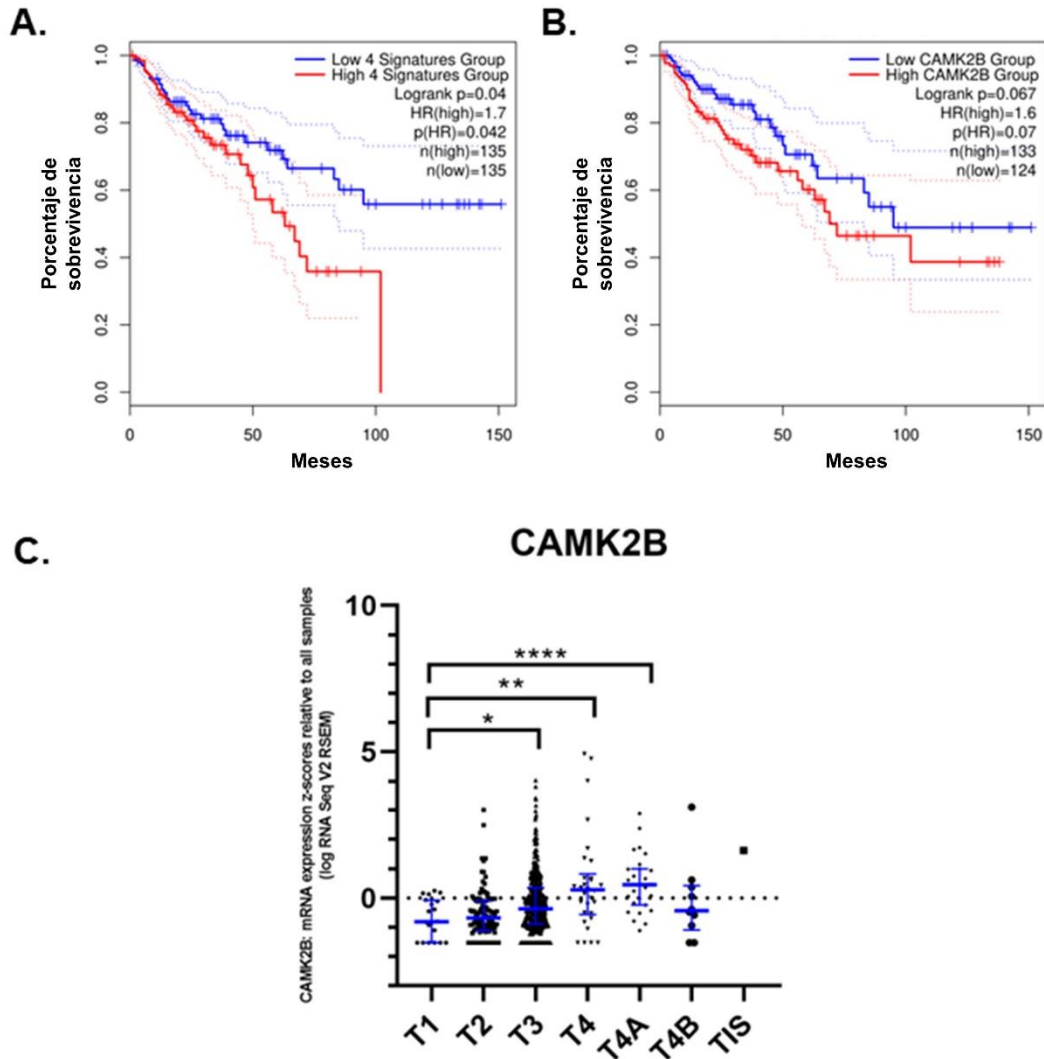


Figura 21. Componentes de la vía Wnt/calcio se asocian a los parámetros clínicos de pacientes con cáncer colo-rectal. Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia para el perfil: NFAT1, NFAT2, NFAT3 y NFAT4 **(A)** y CAMK2B **(B)** en pacientes con CRC. **C)** Análisis de los niveles de mRNA de CAMK2B en distintos estadios del CRC acorde al AJCC, de menor a mayor progresión maligna (T1, T2, T3, T4, T4A, T4B, TIS: Tumor *in situ*). Los datos se representan como score-Z en relación a todas las muestras. El análisis estadístico fue la prueba no paramétrica Mann-Whitney U. *p<0.05; **p=0.0015; ****p<0.0001.

8 DISCUSIÓN

El CRC es uno de los tipos de cáncer más comunes y con mayor mortalidad a nivel mundial, pese a un continuo avance en las estrategias de diagnóstico y terapéuticas. La vía Wnt/ β -catenina es una señalización involucrada en la progresión del CRC, desde el origen hasta la metástasis. Junto con estos procesos fisiológicos, se sostiene la participación de las CSC, incluso dentro de la resistencia a la quimiorradioterapia y la reincidencia de la enfermedad [116–118]. Asimismo, la vía Wnt/ β -catenina también es regulador clave en las CSC, sin embargo, uno de los desafíos es que los inhibidores de esta vía pueden afectar a las células troncales normales, como las del folículo pilar y el tracto intestinal, órganos con alto recambio celular [119]. Es por ello que, la identificación de nuevos componentes dentro de la señalización Wnt, pudieran representar una base en la búsqueda de tratamientos novedosos [120]. Nuestros resultados demuestran que la vía Wnt/calció es esencial para la auto-renovación de las CSC de cáncer de colon, actuando de forma independiente al estado de activación de la vía Wnt/ β -catenina. Incluso, la proliferación en los cultivos de esferas se estimuló por ligandos Wnt sin activar necesariamente la transcripción dependiente de β -catenina, lo que indica que, en efecto, esta vía Wnt no canónica regula características de las CSC.

El CRC se considera una enfermedad de la vía Wnt aberrante, debido a que las mutaciones en APC son las más tempranamente detectadas en la mayoría de los pacientes [117, 118]. Tomando en cuenta esto, en el presente trabajo se estudiaron las células SW480 y SW620, que expresan la versión trunca de APC y representan un estadio temprano y tardío de CRC en un mismo paciente, respectivamente. Como contraparte, se usaron las células RKO que expresan la versión completa de APC y que por tanto activan la vía Wnt/ β -catenina en presencia de ligandos Wnt. Esto permitió conocer las implicaciones de la vía Wnt/calció, se active o no de manera simultánea a la vía Wnt/ β -catenina, en CSC, ya que componentes de la vía Wnt/calció como Calcineurina pueden fosforilar a factores transcripcionales TCF para inhibir la vía Wnt/ β -catenina [121], pero también la activación coordinada de Wnt/ β -catenina y Wnt/calció se describe en algunos antecedentes, incluyendo de nuestro laboratorio [107, 122, 123].

El cultivo de esferas empleado en el presente trabajo como método de enriquecimiento de CSC es respaldado por datos complementarios de nuestro laboratorio donde, las células derivadas de esferas mostraron un cambio en el perfil de expresión de marcadores asociados a las CSC. En específico, en esferas en comparación a monocapa, la expresión de Lgr5 aumentó en las células RKO y SW480, mientras que también incrementó en las células SW620, pero en el inmunofenotipo CD44⁺Lgr5⁺. Asimismo, la expresión de CD133 incrementó en las tres líneas celulares, corroborando la presencia de una mayor proporción de CSC en los cultivos de esferas [124]. Si bien con base a nuestros resultados, RKO y SW620 mostraron una capacidad similar en formar esferas, mientras que SW480 tuvo la menor eficiencia de formación de esferas, existe discrepancia en los reportes respecto a cuál línea celular genera esferas con mayor eficiencia, posiblemente debido a la composición del medio de cultivo [125, 126].

Las esferas de SW480 mantuvieron la activación constitutiva de la transcripción mediada por β -catenina, aún en presencia de Wnt3a y Wnt5a. No obstante, el aumento en el número de células vivas, lo que sugiere una mayor proliferación debido a que la proporción de células muertas no

cambió, fue más notable en generaciones posteriores de esferas, lo que demostró la participación de vías Wnt no canónicas sobre efectos a largo plazo, y que concuerda con cambios funcionales que perduran en células troncales [111, 112]. Las esferas de SW620 mostraron dos subpoblaciones celulares en condiciones basales, una activa y una inactiva, en relación a la transcripción dependiente de β -catenina. Es importante tomar en cuenta que las esferas se componen de una heterogeneidad celular, lo cual conlleva a que no necesariamente las células compartan las mismas características. Incluso, se describen subpoblaciones dentro de las CSC, con base a lo determinado en cultivos primarios de esferas obtenidos de pacientes con CRC. En específico, se identificó una subpoblación de CSC que mantiene el desarrollo tumoral en los trasplantes seriales en ratón, una subpoblación potencialmente CSC que solo formó tumor en el ratón primario y una subpoblación de CSC latente que mostró tumorigenicidad en los trasplantes secundarios y terciarios [127]. De nuestros resultados en SW620, resultó interesante encontrar que ambos ligandos Wnt disminuyeran la actividad transcripcional de β -catenina. Al menos para Wnt5a, esto concuerda con lo descrito previamente, donde Wnt5a incrementa la expresión de Siah2, ligasa de ubiquitina encargada de degradar a β -catenina. Si bien en el reporte, este efecto se abatió cuando las células de CRC expresaron exógenamente la versión completa de APC [104], en nuestro estudio la activación de β -catenina se observó basalmente en casi todas las células SW480, mientras que en SW620 hubo notoriamente dos subpoblaciones celulares, pese a que ambas líneas celulares expresan la versión trunca de APC, lo que sugiere que la inhibición de la transcripción mediada por β -catenina puede suceder de manera independiente al estatus de APC.

Las CSC poseen auto-renovación, similar a las células troncales normales, y nuestra evidencia de que Wnt3a o Wnt5a la regulen a través de la vía Wnt/calció resulta sumamente importante, ya que han sido pocos los estudios en abordar las vías Wnt no canónicas en esta propiedad. Por una parte, respecto a la auto-renovación, desde el enfoque de formación de esferas, solo se ha relacionado con componentes de las vías Wnt no canónicas, pero pertenecientes a la vía Wnt/PCP como RAC, RhoA y JNK [128–130]. No obstante, es cada vez más evidente que la sola presencia de Wnt5a contribuye a las funciones de las CSC. Por ejemplo, el grupo de Qin halló que Wnt5a incrementa la proporción de células CD24⁺CD44⁺ y la población lateral en células de carcinoma nasofaríngeo. Respecto al fenotipo de población lateral, se basa en la capacidad de las CSC para expulsar moléculas exógenas como el agente fluorescente Hoechst 33342 [131].

En células de cáncer de pulmón, Wnt5a aumentó el porcentaje de células con actividad de ALDH, otro fenotipo asociado a las CSC [132]. Asimismo, se describió que Wnt5a favorece la supervivencia de células endoteliales bajo la ausencia de suero, similar a la carencia de suero que caracteriza al medio de cultivo de esferas [133]. En nuestros datos, si bien Wnt5a tuvo un efecto más evidente en cambiar la formación de esferas que Wnt3a, ambos ligandos Wnt afectaron tanto la auto-renovación como la proliferación de las CSC.

Por otra parte, se ha abordado la vía Wnt/calció sobre las CSC, pero desde el enfoque de la invasividad celular y la quimioresistencia [134, 135]. Respecto a este último, se observó que la inducción de la resistencia a gemcitabina por Wnt5a involucra la actividad de NFAT1 en células de cáncer pancreático [136]. En células de CRC, la sobreexpresión de Wnt5a disminuye la citotoxicidad ante 5-FU en células SW620 y en contraste, al disminuir los niveles de Wnt5a aumenta la sensibilidad a este compuesto en células SW480, lo que demuestra la relación directa entre este ligando Wnt y la quimioresistencia [135]. Asimismo, la movilización de calcio se estimula con Wnt3a o Wnt5a, lo

que concuerda con lo descrito por el grupo de Thrasivoulou donde Wnt3a y Wnt5a incrementaron la concentración del calcio intracelular e intranuclear en células de distintos tipos de cáncer [122]. Además, oscilaciones de calcio se observaron en presencia de estos ligandos en células RKO y SW480, aunque en condiciones estándar de monocapa [107]. En este último se describió que la movilización de calcio requiere parcialmente de la actividad de la proteína $G_{i/o}$ en presencia de Wnt5a, en contraste a su papel dispensable cuando el ligando es Wnt3a [107]. Por otra parte, TrpC5 es un canal de calcio, que tiene una alta expresión en líneas celulares con un bajo estado de diferenciación, donde se describieron RKO, SW480 y SW620. En estas, se observaron niveles mayores del mRNA de Wnt5a respecto a líneas celulares más diferenciadas. Además, SW480 mostró discretamente niveles altos de TrpC5 en comparación a SW620 y RKO. Los miembros de la familia de los canales Trp, los cuales poseen una baja conductancia, pueden operar por escalas de tiempo prolongadas sin sobrecargar a las células con calcio. Debido a que TrpC5 se enriqueció en RKO, SW480 y SW620, y se asoció a un inmunofenotipo desdiferenciado CD133⁺CD44⁺ en muestras de pacientes [137], esto explicaría el cambio en la movilización de calcio en respuesta al medio condicionado que contiene Wnt3a o Wnt5a, observado en el presente trabajo.

En células troncales normales de *Drosophila*, la señalización del calcio es relevante en las ESC (por las siglas en inglés Embryonic Stem Cells), aún con los estímulos escasamente definidos, para la auto-renovación y la pluripotencia. Los receptores de membrana mGlu (glutamato metabotrópico) incrementan los niveles intracelulares de calcio y favorecen el estado desdiferenciado, al aumentar la expresión de Oct3/4, mientras que, en las ISC (por las siglas en inglés Intestinal Stem Cells), mGlu desencadena oscilaciones de calcio para regular Calcineurina, activador de NFAT, para favorecer proliferación [138]. Asimismo, se propone que los GPCR se activan en las ESC por componentes del medio de cultivo, aún por definirse, lo que produce fluctuaciones en los niveles intracelulares de calcio [139]. Incluso, los GPCR acoplados a $G(\alpha-q/11)$ pueden compensar la ausencia de bFGF para mantener la auto-renovación de las ESC, dentro del cual PLC β y CAMKII actúan como efectores río abajo [140]. En nuestros resultados, el aumento de calcio en las células de CRC se sostiene, al menos durante el tiempo evaluado, cuando son estimuladas con el medio condicionado que contiene Wnt3a o Wnt5a. Esto pudiera ocasionar la regulación de la transcripción de genes, ya que requiere de señales de calcio duraderas, mientras que la señal corta de calcio pudiera ser insuficiente para una respuesta transcripcional, similar a lo que se observa en los linfocitos [141]. LPA también eleva los niveles de calcio en ESC para aumentar la proliferación. En este reporte, el inhibidor de PLC U73122, el mismo utilizado en nuestro trabajo, bloqueó el efecto de LPA, lo que demostró la participación de PLC. Además, el efecto de U73122 en la proliferación de ESC no fue por la toxicidad del compuesto, similar a lo que nosotros observamos, ya que el decremento en la formación de esferas por U73122 no se debió a un deterioro en la viabilidad celular [139, 142]. Acorde a esto, en otro estudio se observó que la activación de PLC promovió la proliferación en ESC y al tratar con U73122, el número de ESC fue menor, sin afectar el rango de viabilidad celular o la apoptosis [143]. En cáncer, si bien son pocos los reportes, la actividad de PLC se reconoce importante para las CSC. Por ejemplo, la supervivencia y la proliferación de células escamosas de carcinoma con alta tumorigenicidad, rasgo de las CSC, decae al inhibir a PLC específica de Fosfatidilcolina [144]. Sin embargo, PLC específica de PI(4,5)P₂ es la que pudiera participar en la señalización Wnt, ya que el reclutamiento de Dvl a la membrana plasmática incrementa las concentraciones locales de PI(4,5)P₂, el cual a su vez aumenta la unión entre Fzd y Dvl, estableciendo así una retroalimentación positiva [145]. No obstante, esto se describió en células humanas inmortalizadas de riñón embrionario

HEK293T, quedando por saber si también ocurre en CSC [145]. Finalmente, se demostró que la inhibición de Calmodulina, un componente río abajo de PLC y calcio, redujo el perfil de troncalidad determinado por Nanog, Sox2 y Oct3/4 en células de glioblastoma [146].

Por su lado, los miembros de la familia NFAT se sobre-expresan en células de CRC y se relacionan con un aumento de COX-2, la cual promueve la inflamación y la tumorigénesis [147]. Acorde a los hallazgos del presente estudio, los miembros de NFAT están activos en las tres líneas celulares, esto con base a su localización nuclear. Previamente, se describe en SW620 la presencia de NFAT2 en el núcleo bajo condiciones basales, así como la expresión de NFAT1-4 en RKO, SW480 y SW620 [148]. Además, en HCT116, otra línea celular de CRC, se identificaron altos niveles de NFAT1-4 en condiciones basales [149]. Pese a pertenecer a la misma familia, los miembros NFAT no necesariamente contribuyen a los mismos procesos celulares. Por ejemplo, NFAT1 favorece la expresión de IL-6 y MMP para contribuir al inicio de la tumorigénesis y la invasividad, respectivamente [150, 151], mientras que NFAT5 solo regula la migración [151] y NFAT2 se relaciona con migración e invasión [147]. Aunado a esto, también es importante considerar el tipo de regulación que pudieran mediar las isoformas de los NFAT. Por ejemplo, NFAT1 arresta el ciclo celular y origina la entrada a la apoptosis en fibroblastos, en contraste a la isoforma corta de NFAT2, la cual desencadena el efecto opuesto, lo que puede deberse a diferencias en los dominios de interacción con otras proteínas [152]. Por ejemplo, NFAT2 y NFAT4, poseen una segunda secuencia de interacción con Calcineurina [153]. Debido a que el inhibidor de NFAT 11R-VIVIT, usado en el presente trabajo, se basa en la secuencia peptídica del sitio de atraque (por su término en inglés docking site) de Calcineurina en NFAT [154], y al perfil de los NFAT específico del contexto celular, explicaría por qué distintas concentraciones de 11R-VIVIT se requirieron para disminuir la formación de esferas entre las líneas celulares.

Asimismo, la traslocación al núcleo de los NFAT es específica de cada miembro, donde, por ejemplo, NFAT1 es cinco veces más responsivo que NFAT4 ante la activación de GPCR acoplado a $G\alpha_q$ [155]. Una vez en el núcleo, los NFAT funcionan cooperativamente con AP-1, lo que sugiere la integración, al menos, de dos distintas vías de señalización, por un lado, la vía Calcio/Calcineurina río arriba de NFAT y por el otro, la vía de MAPK que lleva a la síntesis y activación de c-Fos y c-Jun, componentes de AP-1 [153]. La participación de otras vías de señalización también es posible ya que, por ejemplo, el eje Calcio/CaMKII regula la proliferación y la migración de células de CRC al modular ERK1/2 y p38 [156]. Sin embargo, en nuestros resultados, la sola inhibición de PLC o NFAT abatió los efectos de los ligandos Wnt sobre la formación de esferas, lo que demuestra su papel clave en este fenómeno.

La permanencia dentro del núcleo depende del tipo de miembro de NFAT, donde, por ejemplo, NFAT1 permanece en el núcleo por mayor tiempo que NFAT4. Se argumenta que esto se debe a la presencia de receptores IP_3 en la membrana nuclear interna, lo que permite la liberación del calcio dentro del nucleoplasma. Debido a que altos niveles de calcio activan a NFAT4, este depende estrechamente de los receptores nucleares IP_3 , en contraste a NFAT1 que, al ser independiente a estos receptores, se localiza en el núcleo por más tiempo. Por lo tanto, la intensidad de la señal dictamina el perfil de activación de los miembros NFAT [113]. En nuestros resultados encontramos que NFAT1-4 se localizan en el núcleo en condiciones basales, pero quedó por determinarse si existe un cambio en su localización nuclear en respuesta a Wnt. No obstante, se demostró que la inhibir la actividad de los NFAT, el efecto de Wnt sobre la formación de esferas se abatió.

El estudio de los miembros NFAT en pacientes con CRC mostró a NFAT2 nuclear en estadios II y III, así como una asociación con una baja sobrevivencia. En células derivadas de pacientes con CRC se observó que NFAT2 favorece la migración celular al regular la transcripción de Runx2 y gelsolina [115]. En el mismo reporte, NFAT2 se localizó en el núcleo, similar a nuestros hallazgos en describir a NFAT1-4 en el núcleo de RKO, SW480 y SW620. Esto concuerda con la activación de NFAT durante el desarrollo tumoral, ya que, por ejemplo, NFAT4 se expresa en células epiteliales intestinales normales, pero transloca al núcleo en la transición a la formación de un tumor [114]. La evidencia de que componentes relacionados al calcio se asocian a un peor pronóstico en los pacientes con CRC, según nuestro análisis *in silico*, concuerda con una alta actividad de Calcineurina detectada en adenocarcinomas de colon en comparación a la mucosa normal. Además, altos niveles de CaN A, subunidad catalítica de Calcineurina, se identifica en muestras de tumor de colon, tanto la isoforma α como β [157]. Sin embargo, queda por abordar los estados de activación de estas proteínas en las muestras de pacientes, ya que la mayoría de bases de datos abordan solo los niveles de expresión.

El incremento de la proliferación por Wnt5a en SW480 y SW620, en particular a largo plazo, contrasta con lo observado por el grupo de Qiang Gu, donde la sobre-expresión de Wnt5a restringe la proliferación debido a la reducción en la expresión de c-Myc [158]. No obstante, hay diferencias evidentes entre ambos estudios, remarcando que en el antecedente usaron células HCT116, las cuales expresan la versión completa de APC, a diferencia de la versión trunca que expresan las células SW480 y SW620. De forma interesante, en nuestros resultados el incremento de la proliferación por Wnt5a no se observó en las células RKO, las cuales como HCT116, expresan la versión completa de APC. Otra consideración es la discrepancia en las condiciones de cultivo, en el cual previamente se evaluó en monocapa [158] a diferencia del cultivo de esferas en nuestro estudio, ya que nuestro interés fue analizar a las CSC. Si bien, la transcripción mediada por β -catenina no explica todos los efectos de los ligandos Wnt en la proliferación, y dado que Wnt/calcio resultó importante en los cultivos de esferas, NFAT pudiera ser mediador en este rasgo según nuestros datos. De hecho, se ha observado que NFAT2 eleva la expresión de c-Myc al unirse directamente a su promotor [159] o al aumentar la unión de ELK1 sobre el promotor de c-Myc en células de cáncer de páncreas [160]. También NFAT2 regula positivamente la expresión de c-Myc al activar a ERK1/2 y p38 en células cancerosas de ovario [161]. Incluso el gen de Ciclina D1 es blanco de NFATc1 en células de músculo liso [162].

Si bien la actividad de PLC y NFAT fue crucial para mantener la auto-renovación, uno de los hallazgos importantes en nuestros resultados fue la divergencia de la respuesta ante los ligandos Wnt sobre la capacidad de formar esferas y la proliferación entre las líneas celulares. Aunque, por ejemplo, SW480 y SW620 expresan la forma trunca de APC, mostraron un comportamiento diferente en presencia de los ligandos Wnt3a y Wnt5a, sugiriendo que otras características aportan a esta disimilitud. De hecho, existen reportes que comparan las líneas celulares SW480 y SW620, debido a que provienen del mismo paciente, pero aisladas en diferentes estadios de progresión del cáncer. En términos de morfología, SW480 exhibe un fenotipo epitelial, mientras que SW620 tiene la apariencia tipo fibroblasto en condiciones *in vitro*. Respecto a la tumorigenicidad, los tumores formados por SW480 son estructuras tipo glandular, mientras que las células SW620 forman láminas sólidas de células tumorales *in vivo*. Además, las células SW480 tienen menor capacidad tumorigénica y metastásica en comparación a las células SW620. Esto último correlaciona con una mayor motilidad celular de SW480 *in vitro*, en comparación a las células SW620, donde incluso, la

fibronectina estimuló la migración en SW480, pero no en SW620 [125]. En otros procesos celulares, SW480 tiene una menor tasa de proliferación que SW620 y en la apoptosis inducida por TNF α o por anticuerpo anti-Fas, las células SW480 son más sensibles que las células SW620 [163].

Las diferencias funcionales entre SW480 y SW620 se atribuyen principalmente a la etapa de la progresión del cáncer del cual fueron aisladas, pero la evidencia que explica estas diferencias es escasa [102, 164, 165]. Una de las posibles explicaciones a la variación de las características, y que es relevante para el presente trabajo, es la proporción de CSC entre las líneas celulares. En cultivos de esferas de nuestro laboratorio, se describió que SW480 tuvo una mayor subpoblación de células LGR5⁺, en comparación a SW620 y RKO [124]. Sin embargo, según los hallazgos del presente trabajo, las células SW480 tuvieron una menor capacidad de formar esferas respecto a SW620 y RKO. Esto puede deberse a que SW480 posee una menor proporción del inmunofenotipo CD133⁺ que SW620. Sin embargo, RKO tuvo la menor subpoblación CD133⁺, lo que demuestra que el enriquecimiento de estos marcadores no explica completamente la diferencia sobre la capacidad de formar esferas o los cambios que se observaron en presencia de ligandos Wnt [124]. Es posible que deban considerarse otros marcadores moleculares. Por ejemplo, Slater y colaboradores demostraron que el número de células CD44⁺/CD133⁺ es mayor en SW620 que en SW480, que acorde a nuestros resultados, explicaría porque SW620 tuvo una mayor eficiencia de formación de esferas que SW480 [125]. En el presente trabajo, debido a que el sistema reportero SORE6 no se evaluó en las células SW620, queda por saber si la actividad transcripcional del complejo Sox2-Oct3/4 pudiera relacionarse con la eficiencia de formación de esferas de cada línea celular de CRC, aunque con base a lo evaluado en RKO y SW480, pudiera parecer que es el caso.

Las disimilitudes funcionales también se observan en las células que conforman a las esferas, donde SW480 incrementa la proporción de células en la fase G1/GO y disminuye en la fase S, al comparar con aquellas en condiciones adherentes. Por su parte, SW620 no mostró cambios entre las células derivadas de esferas y las obtenidas de condiciones adherentes. Al analizar la quimioresistencia en condiciones adherentes, SW620 fue más sensible a 5-FU que SW480. Por el contrario, SW480 fue más sensible a oxaliplatina que SW620. De forma interesante, SW620 adquirió sensibilidad a oxaliplatina, incluso más que SW480, en los cultivos de esferas [125].

El perfil de expresión de los componentes de la señalización Wnt también es específico en cada línea celular. SW480 posee mayores niveles de β -catenina que SW620 [162]. De forma interesante, al tratar a las células SW620 con NaBt, inhibidor de desacetilasas de histonas HDAC, los niveles de β -catenina incrementan, incluso más que en SW480 [166]. En los reportes que han abordado RKO, SW480 y SW620, se demostró similitud entre RKO y SW620, y no así con SW480, para ciertas proteínas relacionadas a la señalización Wnt. Por ejemplo, la expresión de Wnt9a es baja en RKO y SW620, pero alta en SW480. Asimismo, se observó la mayor expresión de Wnt2b y Fzd2 en RKO y SW620, mientras que en SW480 los niveles fueron bajos [137]. En cuanto a la vía Wnt no canónica, Wnt5a está silenciado en SW620, pero se expresa en SW480 y RKO [135, 166]. En específico, el gen de Wnt5a está metilado y silenciado en SW620, mientras que se expresa en SW480 por la ausencia de metilación, lo que indica que la señalización autónoma mediada por este ligando es diferente en condiciones basales [103]. Además, los antecedentes de nuestro laboratorio mostraron que el perfil de fosforilación de Dvl es específico de cada línea celular y del ligando Wnt utilizado [107]. Por ejemplo, Dvl1 se fosforila con Wnt3a, pero no con Wnt5a en células RKO, mientras que lo opuesto se observa en células SW480. Respecto a Dvl2, el estado fosforilado aumenta con ambos ligandos

Wnt en RKO, a la vez que no cambia en SW480. Para el caso de Dvl3, la fosforilación incrementa en ambas líneas celulares, RKO y SW480, siendo más evidente con Wnt5a que Wnt3a [107]. Finalmente, también es de considerarse la participación de otras vías de señalización que favorezcan o restrinjan la respuesta a ligandos Wnt, como la dependiente a mTOR. Esto a partir de lo observado tras el tratamiento con rapamicina, inhibidor de mTOR en esferas. El estímulo con rapamicina disminuyó el número de esferas primarias y secundarias en SW620, pero no tuvo efecto sobre las esferas de SW480. En este reporte, el efecto de rapamicina se asoció a los niveles de SOX9, donde a mayor nivel de SOX9, mayor inhibición de rapamicina sobre la formación de esferas [126]. Si la vía de señalización mTOR participa en la respuesta a ligandos Wnt, queda por definirse.

El hecho de que el efecto de Wnt5a fuese más evidente que Wnt3a en la formación de esferas sugiere que no necesariamente activan los mismos mecanismos moleculares para alcanzar una respuesta. Esto en parte puede determinarse desde la transducción a nivel transmembranal, donde Wnt3a se une a Fzd y LRP6, mientras que Wnt5a forma un complejo con Fzd y Ror2 [69], a pesar de que ambos, por ejemplo, pueden redistribuir a GSK-3 β del citoplasma al núcleo en células de CRC [167]. Sin duda, esto refuerza la idea de la complejidad de la señalización Wnt debido a la integración de múltiples mecanismos [168], lo cual, con el avance de los estudios, nos puede acercar a comprender a detalle sus implicaciones en la enfermedad. Derivado de esto, por ejemplo, se identifica la intercomunicación entre la vía Wnt/calcio y la vía Wnt/PCP, ya que la movilización de calcio puede estimularse por Pk1 [169, 170] e incluso la activación de Wnt/calcio independiente de Dvl activa PKC a través de la GTPasa Cdc42 [171]. Finalmente, si bien en el presente estudio se utilizaron Wnt5a y Wnt3a como ligandos prototipos, es posible que otros ligandos Wnt también participen en favorecer características de CSC a través de mecanismos no canónicos. Por ejemplo, en células de cáncer de páncreas se observó que Wnt2 aumenta la formación de esferas a través de la actividad de la cinasa TAK1, además de identificar altos niveles de Wnt2 en células tumorales circulantes en sangre [172].

El papel de la vía Wnt/ β -catenina en la homeostasis del intestino dificulta el desarrollo de terapias efectivas enfocadas a esta señalización, lo que explica por qué no hay inhibidores de la vía Wnt canónica aprobados por el FDA (por las siglas en inglés Food and Drug Administration) para el uso clínico. El descubrimiento de componentes emergentes de la señalización Wnt, por lo tanto, establece un camino hacia el desarrollo de nuevos tratamientos [54]. En CSC, las vías Wnt no canónicas se han asociado a características como la invasión y la metástasis [119], sin embargo, nuestros resultados muestran que también pueden regular la auto-renovación y la proliferación, procesos claves en este tipo de células.

9 CONCLUSIONES

9.1 CONCLUSIONES ESPECÍFICAS

Con base en los resultados que se muestran en el presente trabajo, se enlistan las siguientes conclusiones:

- El cultivo de esferas tiene una subpoblación celular de CSC que se identifica por la alta actividad transcripcional del complejo Sox2-Oct3/4 y por la auto-renovación en cultivos de esferas seriados.
- La capacidad de respuesta de la vía Wnt/ β -catenina a ligandos Wnt depende del contexto celular, y no solamente de la versión expresada de APC, ya que las células SW480 mantienen una actividad transcripcional constitutiva dependiente de β -catenina, mientras que las SW620 la disminuyen. Por su parte, las células RKO incrementan esta actividad transcripcional solo con Wnt3a.
- Wnt3 y Wnt5a incrementan la capacidad de formar esferas en células SW620 y RKO, pese a su respuesta diferencial a la vía Wnt/ β -catenina.
- Wnt3a y Wnt5a disminuyen la capacidad de formar esferas en células SW480, a pesar de la ausencia de cambios de la vía Wnt/ β -catenina en presencia de estos ligandos.
- La proliferación en los cultivos de esferas primarias de células RKO y SW620 disminuye a altas concentraciones de Wnt3a y Wnt5a.
- Una estimulación única de las esferas primarias con ligandos Wnt determina la capacidad proliferativa en cultivos secuenciales de esferas de RKO, SW480 y SW620, por lo que los ligandos Wnt afectan la capacidad proliferativa de las esferas a corto y largo plazo.
- Wnt3a y Wnt5a movilizan calcio en células derivadas de esferas de células RKO, SW480 y SW620, lo cual depende de la actividad de PLC.
- La actividad de PLC es esencial para mantener la capacidad de autorrenovación de las CSC de RKO, SW480 y SW620, tanto en condiciones basales como en presencia de los ligandos Wnt3a y Wnt5a.
- La actividad de NFAT también es esencial para mantener la capacidad de autorrenovación de las CSC de RKO, SW480 y SW620, tanto en condiciones basales como en presencia de los ligandos Wnt3a y Wnt5a.

9.2 CONCLUSIÓN GENERAL

El conocimiento acerca de las CSC continúa siendo de interés, debido a la diversidad de procesos que se les atribuye a estas células en los pacientes con cáncer. Nuestros resultados demuestran que la capacidad de formar esferas, la cual se relaciona con el potencial de auto-renovación de las CSC, depende de la vía Wnt/PLC/Calcio/NFAT en células de CRC. Este mecanismo molecular puede actuar simultáneamente o independiente de la vía Wnt/ β -catenina, Si bien, la vía Wnt/ β -catenina continúa siendo la más descrita, estos hallazgos abren el panorama de la señalización Wnt, donde las vías Wnt independientes a β -catenina también son esenciales para las CSC.

De manera interesante, al inhibir PLC o NFAT, componentes de la vía Wnt/calcio, se abate la capacidad de formar esferas, lo que sostiene que esta vía es crucial para que las CSC mantengan esta capacidad, sello característico de las células troncales.

El hallazgo de que la capacidad de formar esferas y la proliferación sean características que se regulan diferencialmente ante la presencia de un mismo ligando Wnt, remarca que el tipo de efecto de Wnt sobre las CSC, ya sea favoreciendo o restringiendo, dependerá de la función en cuestión, así como del tiempo en que se evalúa, a corto o largo plazo. Por lo tanto, nuevos componentes identificados en la red de señalización Wnt revela oportunidades emergentes para erradicar a las CSC, sin embargo, esto queda por demostrarse.

10 PERSPECTIVAS

Con base en los resultados del presente trabajo, nuevas preguntas y estrategias para responderlas se plantean, las cuales se enlistan a continuación:

- El uso de U73133 como inhibidor de PLC reveló la participación de esta enzima en la señalización río abajo de Wnt. No obstante, se describen isoformas de PLC, por lo que la inhibición específica por medio de siRNAs, permitirá discernir las isoformas de PLC involucradas en la transducción de Wnt.
- El uso de 11R-VIVIT permitió la inhibición de los miembros de la familia NFAT, en específico de los que dependen de la movilización del calcio. Sin embargo, cada miembro NFAT tiene una contribución diferente en la señalización celular, por lo que la inhibición específica por medio de siRNAs, identificará cuáles participan en la respuesta ante ligandos Wnt.
- Si bien, los genes blanco de la vía Wnt/ β -catenina están ampliamente descritos, aquellos de la vía Wnt/calcio son escasos. Por lo tanto, la identificación del perfil de expresión por medio de secuenciación de CSC, identificadas por marcadores de superficie (CD44v6, CD133, LGR5) o actividad transcripcional dependiente de Sox2-Oct3/4, determinará aquellas proteínas que son independientes de β -catenina, pero importantes para la auto-renovación. En específico, comparando CSC de SW480 y SW620 con el estímulo Wnt, ya que estas líneas celulares mostraron una respuesta funcional opuesta en la modulación de Wnt/ β -catenina y en la formación de esferas, además de que provienen del mismo paciente.
- En el presente trabajo se emplearon Wnt3 y Wnt5a, por ser prototipos de activación para la vía Wnt canónica y vías Wnt no canónicas, respectivamente. Sin embargo, el uso de otros ligandos Wnt establecerá si el mecanismo Wnt/PLC/Calcio/NFAT es común para los ligandos Wnt en regular a las CSC.
- La respuesta funcional por ligandos Wnt fue opuesta entre SW480, línea celular de tumor primario, y SW620, línea celular de tumor metastásico. Esto sugiere que la metástasis lleva a un cambio en la señalización Wnt, y dada la modulación de la vía Wnt/ β -catenina en estas líneas celulares, las vías Wnt no canónicas parecen también estar involucradas. Para discernir esto, queda evaluar otras líneas celulares, de tumor primario y metastásicas, e identificar el cambio en la transducción celular relacionada a Wnt.
- Se ha demostrado en nuestro laboratorio que la activación de la vía Wnt canónica está involucrada en la generación de resistencia a quimio-fármacos en cáncer de colon. Sería muy interesante estudiar el papel que juega la vía Wnt/Calcio en este proceso.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Onfroy-Roy, L., Hamel, D., Foncy, J., Malaquin, L., & Ferrand, A. (2020). Extracellular Matrix Mechanical Properties and Regulation of the Intestinal Stem Cells: When Mechanics Control Fate. *Cells*, 9(12), 2629. <https://doi.org/10.3390/cells9122629>
2. Flanagan, D., Austin, C., Vincan, E., & Pesse, T. (2018). Wnt Signalling in Gastrointestinal Epithelial Stem Cells. *Genes*, 9(4), 178. <https://doi.org/10.3390/genes9040178>
3. Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destrée, O., Kielman, M., & Clevers, H. (2005). Expression Pattern of Wnt Signaling Components in the Adult Intestine. *Gastroenterology*, 129(2), 626–638. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.06.007>
4. Flanagan, D. J., Pesse, T. J., Barker, N., Schwab, R. H. M., Amin, N., Malaterre, J., ... Vincan, E. (2015). Frizzled7 Functions as a Wnt Receptor in Intestinal Epithelial Lgr5+ Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 4(5), 759–767. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.03.003>
5. Aoki, R., Shoshkes-Carmel, M., Gao, N., Shin, S., May, C. L., Golson, M. L., ... Kaestner, K. H. (2016). Foxl1-Expressing Mesenchymal Cells Constitute the Intestinal Stem Cell Niche. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2(2), 175–188. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.12.004>
6. Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 19–33. <https://doi.org/10.1038/nrm3721>
7. Beumer, J., & Clevers, H. (2016). Regulation and plasticity of intestinal stem cells during homeostasis and regeneration. *Development*, 143(20), 3639–3649. <https://doi.org/10.1242/dev.133132>

8. Sato, T., Van Es, J. H., Snippert, H. J., Stange, D. E., Vries, R. G., Van Den Born, M., ... Clevers, H. (2011). Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature*, 469(7330), 415–418. <https://doi.org/10.1038/nature09637>
9. Yan, K. S., Chia, L. A., Li, X., Ootani, A., Su, J., Lee, J. Y., ... Kuo, C. J. (2012). The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(2), 466–471. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118857109>
10. Ouko, L., Ziegler, T. R., Gu, L. H., Eisenberg, L. M., & Yang, V. W. (2004). Wnt11 Signaling Promotes Proliferation, Transformation, and Migration of IEC6 Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26707–26715. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402877200>
11. Pacheco, I. I., & MacLeod, R. J. (2008). CaSR stimulates secretion of Wnt5a from colonic myofibroblasts to stimulate CDX2 and sucrase-isomaltase using Ror2 on intestinal epithelia. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295(4), G748–G759. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00560.2007>
12. Li, F., & Lai, M. (2009). Colorectal cancer, one entity or three. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 10(3), 219–229. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820273>
13. Dalerba, P., Cho, R. W., & Clarke, M. F. (2007). Cancer Stem Cells: Models and Concepts. *Annual Review of Medicine*, 58(1), 267–284. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.58.062105.204854>
14. Ramadan, R., Van Driel, M. S., Vermeulen, L., & Van Neerven, S. M. (2022). Intestinal stem cell dynamics in homeostasis and cancer. *Trends in Cancer*, 8(5), 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.01.011>

15. De Sousa E Melo, F., Kurtova, A. V., Harnoss, J. M., Kljavin, N., Hoeck, J. D., Hung, J., ... De Sauvage, F. J. (2017). A distinct role for Lgr5+ stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature*, *543*(7647), 676–680. <https://doi.org/10.1038/nature21713>
16. Rycaj, K., & Tang, D. G. (2015). Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations. *Cancer Research*, *75*(19), 4003–4011. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0798>
17. Batlle, E., & Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nature Medicine*, *23*(10), 1124–1134. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>
18. Izumi, D., Ishimoto, T., Miyake, K., Eto, T., Arima, K., Kiyozumi, Y., ... Baba, H. (2017). Colorectal Cancer Stem Cells Acquire Chemoresistance Through the Upregulation of F-Box/WD Repeat-Containing Protein 7 and the Consequent Degradation of c-Myc. *Stem Cells*, *35*(9), 2027–2036. <https://doi.org/10.1002/stem.2668>
19. Francescangeli, F., De Angelis, M. L., Rossi, R., Cuccu, A., Giuliani, A., De Maria, R., & Zeuner, A. (2023). Dormancy, stemness, and therapy resistance: interconnected players in cancer evolution. *Cancer and Metastasis Reviews*, *42*(1), 197–215. <https://doi.org/10.1007/s10555-023-10092-4>
20. Malanchi, I., Peinado, H., Kassen, D., Hussenet, T., Metzger, D., Chambon, P., ... Huelsken, J. (2008). Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on β -catenin signalling. *Nature*, *452*(7187), 650–653. <https://doi.org/10.1038/nature06835>
21. Shiras, A., Chettiar, S. T., Shepal, V., Rajendran, G., Prasad, G. R., & Shastry, P. (2007). Spontaneous Transformation of Human Adult Nontumorigenic Stem Cells to Cancer Stem Cells Is Driven by Genomic Instability in a Human Model of Glioblastoma. *Stem Cells*, *25*(6), 1478–1489. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0585>

22. Krivtsov, A. V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M. C., Wang, Y., Faber, J., ... Armstrong, S. A. (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL–AF9. *Nature*, *442*(7104), 818–822. <https://doi.org/10.1038/nature04980>
23. Sell, S. (2004). Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *51*(1), 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2004.04.007>
24. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, *414*(6859), 105–111. <https://doi.org/10.1038/35102167>
25. Prasetyanti, P. R., & Medema, J. P. (2017). Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. *Molecular Cancer*, *16*(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0600-4>
26. Clarke, M. F., Dick, J. E., Dirks, P. B., Eaves, C. J., Jamieson, C. H. M., Jones, D. L., ... Wahl, G. M. (2006). Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Research*, *66*(19), 9339–9344. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3126>
27. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(7), 3983–3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
28. Huang, Z., Wu, T., Liu, A. Y., & Ouyang, G. (2015). Differentiation and transdifferentiation potentials of cancer stem cells. *Oncotarget*, *6*(37), 39550–39563. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6098>
29. Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, *12*(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
30. Höfer, T., & Rodewald, H.-R. (2018). Differentiation-based model of hematopoietic stem cell functions and lineage pathways. *Blood*, *132*(11), 1106–1113. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-791517>

31. Alvarado-Ortiz, E., Sarabia-Sánchez, M. Á., & García-Carrancá, A. (2019). Molecular Mechanisms Underlying the Functions of Cellular Markers Associated with the Phenotype of Cancer Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 14(5), 405–420.
<https://doi.org/10.2174/1574888X13666180821154752>
32. Yang, L., Shi, P., Zhao, G., Xu, J., Peng, W., Zhang, J., ... Cui, H. (2020). Targeting cancer stem cell pathways for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 8.
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-0110-5>
33. Munro, M. J., Wickremesekera, S. K., Peng, L., Tan, S. T., & Itinteang, T. (2018). Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *Journal of Clinical Pathology*, 71(2), 110–116.
<https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204739>
34. Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I.-K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., ... Clarke, M. F. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(24), 10158–10163.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0703478104>
35. Zhou, Y., Xia, L., Wang, H., Oyang, L., Su, M., Liu, Q., ... Cao, D. (2018). Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(70), 33403–33415.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.23607>
36. Du, L., Wang, H., He, L., Zhang, J., Ni, B., Wang, X., ... Chen, Q. (2008). CD44 is of Functional Importance for Colorectal Cancer Stem Cells. *Clinical Cancer Research*, 14(21), 6751–6760.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1034>
37. Todaro, M., Gaggianesi, M., Catalano, V., Benfante, A., Iovino, F., Biffoni, M., ... Stassi, G. (2014). CD44v6 Is a Marker of Constitutive and Reprogrammed Cancer Stem Cells Driving Colon Cancer Metastasis. *Cell Stem Cell*, 14(3), 342–356.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.01.009>

38. Mehra, N., Penning, M., Maas, J., Beerepoot, L. V., Van Daal, N., Van Gils, C. H., ... Voest, E. E. (2006). Progenitor Marker CD133 mRNA Is Elevated in Peripheral Blood of Cancer Patients with Bone Metastases. *Clinical Cancer Research*, *12*(16), 4859–4866.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0422>
39. Wu, Y., & Wu, P. Y. (2009). CD133 as a Marker for Cancer Stem Cells: Progresses and Concerns. *Stem Cells and Development*, *18*(8), 1127–1134.
<https://doi.org/10.1089/scd.2008.0338>
40. Huang, J., Li, C., Wang, Y., Lv, H., Guo, Y., Dai, H., ... Li, Q. (2013). Cytokine-induced killer (CIK) cells bound with anti-CD3/anti-CD133 bispecific antibodies target CD133^{high} cancer stem cells in vitro and in vivo. *Clinical Immunology*, *149*(1), 156–168.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2013.07.006>
41. Zhao, L., Yang, Y., Zhou, P., Ma, H., Zhao, X., He, X., ... Zhang, T. (2015). Targeting CD133^{high} Colorectal Cancer Cells In Vitro and In Vivo With an Asymmetric Bispecific Antibody. *Journal of Immunotherapy*, *38*(6), 217–228. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000086>
42. Kazama, S., Kishikawa, J., Kiyomatsu, T., Kawai, K., Nozawa, H., Ishihara, S., & Watanabe, T. (2018). Expression of the stem cell marker CD133 is related to tumor development in colorectal carcinogenesis. *Asian Journal of Surgery*, *41*(3), 274–278.
<https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2016.12.002>
43. Chhabra, S. N., & Booth, B. W. (2021). Asymmetric cell division of mammary stem cells. *Cell Division*, *16*(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13008-021-00073-w>
44. Najafi, M., Mortezaee, K., & Ahadi, R. (2019). Cancer stem cell (a)symmetry & plasticity: Tumorigenesis and therapy relevance. *Life Sciences*, *231*, 116520.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.076>

45. Ishiguro, T., Ohata, H., Sato, A., Yamawaki, K., Enomoto, T., & Okamoto, K. (2017). Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Science*, *108*(3), 283–289. <https://doi.org/10.1111/cas.13155>
46. Johnston, M. D., Maini, P. K., Jonathan Chapman, S., Edwards, C. M., & Bodmer, W. F. (2010). On the proportion of cancer stem cells in a tumour. *Journal of Theoretical Biology*, *266*(4), 708–711. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.07.031>
47. Driessens, G., Beck, B., Caauwe, A., Simons, B. D., & Blanpain, C. (2012). Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature*, *488*(7412), 527–530. <https://doi.org/10.1038/nature11344>
48. Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M. S., Fullen, D. R., & Morrison, S. J. (2009). Efficient tumor formation by single human melanoma cells.
49. Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer*, *8*(10), 755–768. <https://doi.org/10.1038/nrc2499>
50. Fulawka, L., Donizy, P., & Halon, A. (2014). Cancer stem cells – the current status of an old concept: literature review and clinical approaches. *Biological Research*, *47*(1), 66. <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-66>
51. Weiswald, L.-B., Bellet, D., & Dangles-Marie, V. (2015). Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia*, *17*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>
52. Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*, *63*(18), 5821–5828.
53. Smart, C. E., Morrison, B. J., Saunus, J. M., Vargas, A. C., Keith, P., Reid, L., ... Lopez, J. A. (2013). In Vitro Analysis of Breast Cancer Cell Line Tumourspheres and Primary Human

- Breast Epithelia Mammospheres Demonstrates Inter- and Intrasphere Heterogeneity. *PLoS ONE*, 8(6), e64388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064388>
54. Caspi, M., Wittenstein, A., Kazelnik, M., Shor-Nareznoy, Y., & Rosin-Arbesfeld, R. (2021). Therapeutic targeting of the oncogenic Wnt signaling pathway for treating colorectal cancer and other colonic disorders. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 169, 118–136. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.010>
55. Vermeulen, L., Todaro, M., De Sousa Mello, F., Sprick, M. R., Kemper, K., Perez Alea, M., ... Medema, J. P. (2008). Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13427–13432. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805706105>
56. Oskarsson, T., Acharyya, S., Zhang, X. H.-F., Vanharanta, S., Tavazoie, S. F., Morris, P. G., ... Massagué, J. (2011). Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nature Medicine*, 17(7), 867–874. <https://doi.org/10.1038/nm.2379>
57. Ma, Y., Liang, D., Liu, J., Axcrona, K., Kvalheim, G., Giercksky, K.-E., ... Suo, Z. (2012). Synergistic effect of SCF and G-CSF on stem-like properties in prostate cancer cell lines. *Tumor Biology*, 33(4), 967–978. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0325-3>
58. Morgan, E., Arnold, M., Gini, A., Lorenzoni, V., Cabasag, C. J., Laversanne, M., ... Bray, F. (2023). Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*, 72(2), 338–344. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327736>
59. Xi, Y., & Xu, P. (2021). Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational Oncology*, 14(10), 101174. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101174>

60. Song, M., Chan, A. T., & Sun, J. (2020). Influence of the Gut Microbiome, Diet, and Environment on Risk of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, *158*(2), 322–340.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.06.048>
61. Parsons, S., Maldonado, E. B., & Prasad, V. (2020). Comparison of Drugs Used for Adjuvant and Metastatic Therapy of Colon, Breast, and Non–Small Cell Lung Cancers. *JAMA Network Open*, *3*(4), e202488. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.2488>
62. The Cancer Genome Atlas Network. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, *487*(7407), 330–337.
<https://doi.org/10.1038/nature11252>
63. Su, L. K., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Preisinger, A. C., Moser, A. R., Luongo, C., ... Dove, W. F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science (New York, N.Y.)*, *256*(5057), 668–670.
<https://doi.org/10.1126/science.1350108>
64. Giles, R. H., Van Es, J. H., & Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1653*(1), 1–24.
[https://doi.org/10.1016/S0304-419X\(03\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0304-419X(03)00005-2)
65. Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, *36*(11), 1461–1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>
66. Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *13*(12), 767–779. <https://doi.org/10.1038/nrm3470>
67. Zhu, Y., & Li, X. (2023). Advances of Wnt Signalling Pathway in Colorectal Cancer. *Cells*, *12*(3), 447. <https://doi.org/10.3390/cells12030447>
68. Kaykas, A., Yang-Snyder, J., Héroux, M., Shah, K. V., Bouvier, M., & Moon, R. T. (2004). Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the

endoplasmic reticulum by oligomerization. *Nature Cell Biology*, 6(1), 52–58.

<https://doi.org/10.1038/ncb1081>

69. Grumolato, L., Liu, G., Mong, P., Mudbhary, R., Biswas, R., Arroyave, R., ... Aaronson, S. A. (2010). Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes & Development*, 24(22), 2517–2530.
<https://doi.org/10.1101/gad.1957710>
70. Sarabia-Sánchez, M. A., & Robles-Flores, M. (2023). WNT Signaling in Stem Cells: A Look into the Non-Canonical Pathway. *Stem Cell Reviews and Reports*.
<https://doi.org/10.1007/s12015-023-10610-5>
71. Acebron, S. P., & Niehrs, C. (2016). β -Catenin-Independent Roles of Wnt/LRP6 Signaling. *Trends in Cell Biology*, 26(12), 956–967. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.07.009>
72. Kahn, M. (2011). Symmetric division versus asymmetric division: a tale of two coactivators. *Future Medicinal Chemistry*, 3(14), 1745–1763. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.126>
73. Sebio, A., Kahn, M., & Lenz, H.-J. (2014). The potential of targeting Wnt/ β -catenin in colon cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 18(6), 611–615.
<https://doi.org/10.1517/14728222.2014.906580>
74. Matly, A., Quinn, J. A., McMillan, D. C., Park, J. H., & Edwards, J. (2021). The relationship between β -catenin and patient survival in colorectal cancer systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 163, 103337.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103337>
75. Bahrami, A., Amerizadeh, F., ShahidSales, S., Khazaei, M., Ghayour-Mobarhan, M., Sadeghnia, H. R., ... Avan, A. (2017). Therapeutic Potential of Targeting Wnt/ β -Catenin Pathway in Treatment of Colorectal Cancer: Rational and Progress. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(8), 1979–1983. <https://doi.org/10.1002/jcb.25903>

76. Li, Q., Lai, Q., He, C., Fang, Y., Yan, Q., Zhang, Y., ... Liu, S. (2019). RUNX1 promotes tumour metastasis by activating the Wnt/ β -catenin signalling pathway and EMT in colorectal cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, *38*(1), 334.
<https://doi.org/10.1186/s13046-019-1330-9>
77. Hu, Y.-B., Yan, C., Mu, L., Mi, Y. –L., Zhao, H., Hu, H., ... Qin, J.-C. (2019). Exosomal Wnt-induced dedifferentiation of colorectal cancer cells contributes to chemotherapy resistance. *Oncogene*, *38*(11), 1951–1965. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0557-9>
78. Metcalfe, C., Kljavin, N. M., Ybarra, R., & de Sauvage, F. J. (2014). Lgr5+ Stem Cells Are Indispensable for Radiation-Induced Intestinal Regeneration. *Cell Stem Cell*, *14*(2), 149–159.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.11.008>
79. Powell, A. E., Wang, Y., Li, Y., Poulin, E. J., Means, A. L., Washington, M. K., ... Coffey, R. J. (2012). The Pan-ErbB Negative Regulator Lrig1 Is an Intestinal Stem Cell Marker that Functions as a Tumor Suppressor. *Cell*, *149*(1), 146–158.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.042>
80. McDonald, S. L., & Silver, A. (2009). The opposing roles of Wnt-5a in cancer. *British Journal of Cancer*, *101*(2), 209–214. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605174>
81. Pashirzad, M., Sathyapalan, T., & Sahebkar, A. (2021). Clinical Importance of Wnt5a in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Journal of Oncology*, *2021*, 1–8.
<https://doi.org/10.1155/2021/3136508>
82. Katoh, M., & Katoh, M. (2017). Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases (Review). *International Journal of Molecular Medicine*.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3071>
83. De, A. (2011). Wnt/Calcium signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *43*(10), 745–756. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr079>

84. Holcombe, R. F. (2002). Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma. *Molecular Pathology*, 55(4), 220–226.
<https://doi.org/10.1136/mp.55.4.220>
85. Liu, Q., Yang, C., Wang, S., Shi, D., Wei, C., Song, J., ... Xiong, B. (2020). Wnt5a-induced M2 polarization of tumor-associated macrophages via IL-10 promotes colorectal cancer progression. *Cell Communication and Signaling*, 18(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00557-2>
86. Bakker, E. R. M., Das, A. M., Helvensteijn, W., Franken, P. F., Swagemakers, S., Van Der Valk, M. A., ... Smits, R. (2013). Wnt5a promotes human colon cancer cell migration and invasion but does not augment intestinal tumorigenesis in Apc 1638N mice. *Carcinogenesis*, 34(11), 2629–2638. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt215>
87. Ying, J., Li, H., Yu, J., Ng, K. M., Poon, F. F., Wong, S. C. C., ... Tao, Q. (2008). WNT5A Exhibits Tumor-Suppressive Activity through Antagonizing the Wnt/ β -Catenin Signaling, and Is Frequently Methylated in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(1), 55–61.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1644>
88. Pukrop, T., Klemm, F., Hagemann, Th., Gradl, D., Schulz, M., Siemes, S., ... Binder, C. (2006). Wnt 5a signaling is critical for macrophage-induced invasion of breast cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(14), 5454–5459.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0509703103>
89. Kaddour-Djebbar, I., Choudhary, V., Lakshmikanthan, V., Shirley, R., El Gaish, M., Al-Shabrawey, M., ... Kumar, M. V. (2012). Diltiazem Enhances the Apoptotic Effects of Proteasome Inhibitors to Induce Prostate Cancer Cell Death. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(3), 646–655. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.188151>

90. Wu, L., Liu, Y.-Y., Li, Z.-X., Zhao, Q., Wang, X., Yu, Y., ... Luo, F. (2014). Anti-tumor Effects of Penfluridol through Dysregulation of Cholesterol Homeostasis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(1), 489–494. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.1.489>
91. Devenport, D. (2014). The cell biology of planar cell polarity. *Journal of Cell Biology*, 207(2), 171–179. <https://doi.org/10.1083/jcb.201408039>
92. Vuong, L. T., & Mlodzik, M. (2022). Different strategies by distinct Wnt-signaling pathways in activating a nuclear transcriptional response. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 149, pp. 59–89). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2022.02.008>
93. Gao, B., Song, H., Bishop, K., Elliot, G., Garrett, L., English, M. A., ... Yang, Y. (2011). Wnt Signaling Gradients Establish Planar Cell Polarity by Inducing Vangl2 Phosphorylation through Ror2. *Developmental Cell*, 20(2), 163–176. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.001>
94. Yang, W., Garrett, L., Feng, D., Elliott, G., Liu, X., Wang, N., ... Gao, B. (2017). Wnt-induced Vangl2 phosphorylation is dose-dependently required for planar cell polarity in mammalian development. *Cell Research*, 27(12), 1466–1484. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.127>
95. VanderVorst, K., Dreyer, C. A., Konopelski, S. E., Lee, H., Ho, H.-Y. H., & Carraway, K. L. (2019). Wnt/PCP Signaling Contribution to Carcinoma Collective Cell Migration and Metastasis. *Cancer Research*, 79(8), 1719–1729. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2757>
96. Taciak, B., Pruszyńska I, Kiraga L, Bialasek M, & Krol M. (2018). Wnt signaling pathway in development and cancer. *Journal of Physiology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.2.07>
97. Lee, J. H., Cho, E. S., Kim, M.-Y., Seo, Y.-W., Kho, D. H., Chung, I. J., ... Kim, K. K. (2005). Suppression of Progression and Metastasis of Established Colon Tumors in Mice by Intravenous Delivery of Short Interfering RNA Targeting KITENIN, a Metastasis-Enhancing

- Protein. *Cancer Research*, 65(19), 8993–9003. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0590>
98. Corda, G., & Sala, A. (2017). Non-canonical WNT/PCP signalling in cancer: Fzd6 takes centre stage. *Oncogenesis*, 6(7), e364–e364. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2017.69>
99. Wang, F.-W., Cao, C.-H., Han, K., Zhao, Y.-X., Cai, M.-Y., Xiang, Z.-C., ... Xie, D. (2019). APC-activated long noncoding RNA inhibits colorectal carcinoma pathogenesis through reduction of exosome production. *Journal of Clinical Investigation*, 129(2), 727–743. <https://doi.org/10.1172/JCI122478>
100. Le Floch, N., Rivat, C., De Wever, O., Bruyneel, E., Mareel, M., Dale, T., & Gespach, C. (2005). The proinvasive activity of Wnt-2 is mediated through a noncanonical Wnt pathway coupled to GSK-3 β and c-Jun/AP-1 signaling. *The FASEB Journal*, 19(1), 144–146. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2373fje>
101. Ueno, K., Hazama, S., Mitomori, S., Nishioka, M., Suehiro, Y., Hirata, H., ... Hinoda, Y. (2009). Down-regulation of frizzled-7 expression decreases survival, invasion and metastatic capabilities of colon cancer cells. *British Journal of Cancer*, 101(8), 1374–1381. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605307>
102. Nie, X., Liu, H., Liu, L., Wang, Y.-D., & Chen, W.-D. (2020). Emerging Roles of Wnt Ligands in Human Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10, 1341. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01341>
103. Ying, J., Li, H., Yu, J., Ng, K. M., Poon, F. F., Wong, S. C. C., ... Tao, Q. (2008). WNT5A Exhibits Tumor-Suppressive Activity through Antagonizing the Wnt/ β -Catenin Signaling, and Is Frequently Methylated in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(1), 55–61. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1644>

104. MacLeod, R. J., Hayes, M., & Pacheco, I. (2007). Wnt5a secretion stimulated by the extracellular calcium-sensing receptor inhibits defective Wnt signaling in colon cancer cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 293(1), G403–G411. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00119.2007>
105. Henry, C., Quadir, A., Hawkins, N. J., Jary, E., Llamosas, E., Kumar, D., ... Ford, C. E. (2015). Expression of the novel Wnt receptor ROR2 is increased in breast cancer and may regulate both β -catenin dependent and independent Wnt signalling. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(2), 243–254. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1824-y>
106. Dejmek, J., Dejmek, A., Säfholm, A., Sjölander, A., & Andersson, T. (2005). Wnt-5a Protein Expression in Primary Dukes B Colon Cancers Identifies a Subgroup of Patients with Good Prognosis. *Cancer Research*, 65(20), 9142–9146. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1710>
107. Flores-Hernández, E., Velázquez, D. M., Castañeda-Patlán, M. C., Fuentes-García, G., Fonseca-Camarillo, G., Yamamoto-Furusho, J. K., ... Robles-Flores, M. (2020). Canonical and non-canonical Wnt signaling are simultaneously activated by Wnts in colon cancer cells. *Cellular Signalling*, 72, 109636. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109636>
108. Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), 781–810. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.113126>
109. Tang, Z., Kang, B., Li, C., Chen, T., & Zhang, Z. (2019). GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W556–W560. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz430>

110. Voutsadakis, I. A. (2018). The pluripotency network in colorectal cancer pathogenesis and prognosis: an update. *Biomarkers in Medicine*, *12*(6), 653–665.
<https://doi.org/10.2217/bmm-2017-0369>
111. Li, Y., Liu, Y.-H., Hu, Y.-Y., Chen, L., & Li, J.-M. (2016). Special AT-rich sequence-binding protein 2 acts as a negative regulator of stemness in colorectal cancer cells. *World Journal of Gastroenterology*, *22*(38), 8528. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i38.8528>
112. Nemeth, M. J., Topol, L., Anderson, S. M., Yang, Y., & Bodine, D. M. (2007). Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(39), 15436–15441.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0704747104>
113. Thiel, G., Schmidt, T., & Rössler, O. G. (2021). Ca²⁺ Microdomains, Calcineurin and the Regulation of Gene Transcription. *Cells*, *10*(4), 875. <https://doi.org/10.3390/cells10040875>
114. Peuker, K., Muff, S., Wang, J., Künzel, S., Bosse, E., Zeissig, Y., ... Zeissig, S. (2016). Epithelial calcineurin controls microbiota-dependent intestinal tumor development. *Nature Medicine*, *22*(5), 506–515. <https://doi.org/10.1038/nm.4072>
115. Gang, W., Yu-Zhu, W., Yang, Y., Feng, S., Xing-Li, F., & Heng, Z. (2019). The critical role of calcineurin/NFAT (C/N) pathways and effective antitumor prospect for colorectal cancers. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(12), 19254–19273. <https://doi.org/10.1002/jcb.29243>
116. Ring, A., Kim, Y.-M., & Kahn, M. (2014). Wnt/Catenin Signaling in Adult Stem Cell Physiology and Disease. *Stem Cell Reviews and Reports*, *10*(4), 512–525.
<https://doi.org/10.1007/s12015-014-9515-2>
117. Vermeulen, L., De Sousa E Melo, F., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J. H., Borovski, T., ... Medema, J. P. (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is

regulated by the microenvironment. *Nature Cell Biology*, 12(5), 468–476.

<https://doi.org/10.1038/ncb2048>

118. Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035), 843–850. <https://doi.org/10.1038/nature03319>
119. Krishnamurthy, N., & Kurzrock, R. (2018). Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treatment Reviews*, 62, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.002>
120. Macheda, M., & Stacker, S. (2008). Importance of Wnt Signaling in the Tumor Stroma Microenvironment. *Current Cancer Drug Targets*, 8(6), 454–465. <https://doi.org/10.2174/156800908785699324>
121. Ishitani, T., Kishida, S., Hyodo-Miura, J., Ueno, N., Yasuda, J., Waterman, M., ... Matsumoto, K. (2003). The TAK1-NLK Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Functions in the Wnt-5a/Ca2^e Pathway To Antagonize Wnt/β-Catenin Signaling. *MOL. CELL. BIOL.*, 23.
122. Thrasivoulou, C., Millar, M., & Ahmed, A. (2013). Activation of intracellular calcium by multiple Wnt ligands and translocation of β-catenin into the nucleus: a convergent model of Wnt/Ca²⁺ and Wnt/β-catenin pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(50), 35651–35659. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.437913>
123. Xu, N., Zhou, W.-J., Wang, Y., Huang, S.-H., Li, X., & Chen, Z.-Y. (2015). Hippocampal Wnt3a is Necessary and Sufficient for Contextual Fear Memory Acquisition and Consolidation. *Cerebral Cortex*, 25(11), 4062–4075. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu121>
124. Moreno-Londoño, A. P., Castañeda-Patlán, M. C., Sarabia-Sánchez, M. A., Macías-Silva, M., & Robles-Flores, M. (2023). Canonical Wnt Pathway Is Involved in Chemoresistance and Cell Cycle Arrest Induction in Colon Cancer Cell Line Spheroids. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5252. <https://doi.org/10.3390/ijms24065252>

125. Slater, C., De La Mare, J., & Edkins, A. (2018). In vitro analysis of putative cancer stem cell populations and chemosensitivity in the SW480 and SW620 colon cancer metastasis model. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8431>
126. Carrasco-Garcia, E., Lopez, L., Aldaz, P., Arevalo, S., Aldaregia, J., Egaña, L., ... Matheu, A. (2016). SOX9-regulated cell plasticity in colorectal metastasis is attenuated by rapamycin. *Scientific Reports*, *6*(1), 32350. <https://doi.org/10.1038/srep32350>
127. Dieter, S. M., Ball, C. R., Hoffmann, C. M., Nowrouzi, A., Herbst, F., Zavidij, O., ... Glimm, H. (2011). Distinct Types of Tumor-Initiating Cells Form Human Colon Cancer Tumors and Metastases. *Cell Stem Cell*, *9*(4), 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.08.010>
128. Binda, E., Visioli, A., Giani, F., Trivieri, N., Palumbo, O., Restelli, S., ... Vescovi, A. L. (2017). Wnt5a Drives an Invasive Phenotype in Human Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Research*, *77*(4), 996–1007. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1693>
129. Lai, Y.-J., Tsai, J.-C., Tseng, Y.-T., Wu, M.-S., Liu, W.-S., Lam, H.-I., ... Benveniste, E. N. (2017). Small G protein Rac GTPases regulate the maintenance of glioblastoma stem-like cells in vitro and in vivo. *Oncotarget*, *8*(11), 18031–18049. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14949>
130. Cantilena, S., Pastorino, F., Pezzolo, A., Chayka, O., Pistoia, V., Ponzoni, M., & Sala, A. (2011). Frizzled receptor 6 marks rare, highly tumorigenic stem-like cells in mouse and human neuroblastomas. *Oncotarget*, *2*(12), 976–983. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.410>
131. Qin, L., Yin, Y.-T., Zheng, F.-J., Peng, L.-X., Yang, C.-F., Bao, Y.-N., ... Qian, C.-N. (2015). WNT5A promotes stemness characteristics in nasopharyngeal carcinoma cells leading to metastasis and tumorigenesis. *Oncotarget*, *6*(12), 10239–10252. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3518>

132. Yang, J., Zhang, K., Wu, J., Shi, J., Xue, J., Li, J., ... Liu, X. (2016). Wnt5a Increases Properties of Lung Cancer Stem Cells and Resistance to Cisplatin through Activation of Wnt5a/PKC Signaling Pathway. *Stem Cells International*, 2016, 1–16.
<https://doi.org/10.1155/2016/1690896>
133. Masckauchán, T. N. H., Agalliu, D., Vorontchikhina, M., Ahn, A., Parmalee, N. L., Li, C.-M., ... Kitajewski, J. (2006). Wnt5a Signaling Induces Proliferation and Survival of Endothelial Cells In Vitro and Expression of MMP-1 and Tie-2. *Molecular Biology of the Cell*, 17(12), 5163–5172. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-04-0320>
134. Povinelli, B. J., & Nemeth, M. J. (2014). Wnt5a Regulates Hematopoietic Stem Cell Proliferation and Repopulation Through the Ryk Receptor. *Stem Cells*, 32(1), 105–115.
<https://doi.org/10.1002/stem.1513>
135. Jiang, G., Lin, J., Wang, W., Sun, M., Chen, K., & Wang, F. (2017). WNT5A Promoter Methylation Is Associated with Better Responses and Longer Progression-Free Survival in Colorectal Cancer Patients Treated with 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 21(2), 74–79. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2016.0162>
136. Griesmann, H., Ripka, S., Pralle, M., Ellenrieder, V., Baumgart, S., Buchholz, M., ... Michl, P. (2013). WNT5A-NFAT Signaling Mediates Resistance to Apoptosis in Pancreatic Cancer. *Neoplasia*, 15(1), 11-IN9. <https://doi.org/10.1593/neo.121312>
137. Chen, Z., Tang, C., Zhu, Y., Xie, M., He, D., Pan, Q., ... Ma, X. (2017). TrpC5 regulates differentiation through the Ca²⁺/Wnt5a signalling pathway in colorectal cancer. *Clinical Science*, 131(3), 227–237. <https://doi.org/10.1042/CS20160759>
138. Ermakov, A., Daks, A., Fedorova, O., Shuvalov, O., & Barlev, N. A. (2018). Ca²⁺-dependent signaling pathways regulate self-renewal and pluripotency of stem cells. *Cell Biology International*, 42(9), 1086–1096. <https://doi.org/10.1002/cbin.10998>

139. Ermakov, A., Pells, S., Freile, P., Ganeva, V. V., Wildenhain, J., Bradley, M., ... De Sousa, P. A. (2012). A role for intracellular calcium downstream of G-protein signaling in undifferentiated human embryonic stem cell culture. *Stem Cell Research*, *9*(3), 171–184. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.06.007>
140. Deng, H., Gerencser, A. A., & Jasper, H. (2015). Signal integration by Ca²⁺ regulates intestinal stem-cell activity. *Nature*, *528*(7581), 212–217. <https://doi.org/10.1038/nature16170>
141. Gallo, E. M., Canté-Barrett, K., & Crabtree, G. R. (2006). Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. *Nature Immunology*, *7*(1), 25–32. <https://doi.org/10.1038/ni1295>
142. Todorova, M. G., Fuentes, E., Soria, B., Nadal, A., & Quesada, I. (2009). Lysophosphatidic acid induces Ca²⁺ mobilization and c-Myc expression in mouse embryonic stem cells via the phospholipase C pathway. *Cellular Signalling*, *21*(4), 523–528. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.12.005>
143. Quinlan, L. R., Faherty, S., & Kane, M. T. (n.d.). Phospholipase C and protein kinase C involvement in mouse embryonic stem-cell proliferation and apoptosis.
144. Cecchetti, S., Bortolomai, I., Ferri, R., Mercurio, L., Canevari, S., Podo, F., ... Iorio, E. (2015). Inhibition of Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C Interferes with Proliferation and Survival of Tumor Initiating Cells in Squamous Cell Carcinoma. *PLOS ONE*, *10*(9), e0136120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136120>
145. Mahoney, J. P., Bruguera, E. S., Vasishtha, M., Killingsworth, L. B., Kyaw, S., & Weis, W. I. (2022). PI(4,5)P₂-stimulated positive feedback drives the recruitment of Dishevelled to Frizzled in Wnt-β-catenin signaling. *Science Signaling*, *15*(748), eabo2820. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abo2820>

146. Shin, H. J., Lee, S., & Jung, H. J. (2019). A curcumin derivative hydrazinobenzoylcurcumin suppresses stem-like features of glioblastoma cells by targeting Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(4), 6741–6752. <https://doi.org/10.1002/jcb.27972>
147. Xu, H., Liu, L., Li, W., Zou, D., Yu, J., Wang, L., & Wong, C. C. (2021). Transcription factors in colorectal cancer: molecular mechanism and therapeutic implications. *Oncogene*, 40(9), 1555–1569. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01587-3>
148. Wu, L., Lin, W., Liao, Q., Wang, H., Lin, C., Tang, L., ... Zhao, L. (2020). Calcium Channel Blocker Nifedipine Suppresses Colorectal Cancer Progression and Immune Escape by Preventing NFAT2 Nuclear Translocation. *Cell Reports*, 33(4), 108327. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108327>
149. Ding, W., Tong, Y., Zhang, X., Pan, M., & Chen, S. (2016). Study of Arsenic Sulfide in Solid Tumor Cells Reveals Regulation of Nuclear Factors of Activated T-cells by PML and p53. *Scientific Reports*, 6(1), 19793. <https://doi.org/10.1038/srep19793>
150. Gerlach, K., Daniel, C., Lehr, H. A., Nikolaev, A., Gerlach, T., Atreya, R., ... Weigmann, B. (2012). Transcription Factor NFATc2 Controls the Emergence of Colon Cancer Associated with IL-6–Dependent Colitis. *Cancer Research*, 72(17), 4340–4350. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4155>
151. Jauliac, S., López-Rodríguez, C., Shaw, L. M., Brown, L. F., Rao, A., & Toker, A. (2002). The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nature Cell Biology*, 4(7), 540–544. <https://doi.org/10.1038/ncb816>
152. Robbs, B. K., Cruz, A. L. S., Werneck, M. B. F., Mognol, G. P., & Viola, J. P. B. (2008). Dual Roles for NFAT Transcription Factor Genes as Oncogenes and Tumor Suppressors. *Molecular and Cellular Biology*, 28(23), 7168–7181. <https://doi.org/10.1128/MCB.00256-08>

153. Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., & Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & Development*, *17*(18), 2205–2232.
<https://doi.org/10.1101/gad.1102703>
154. Aramburu, J., Yaffe, M. B., López-Rodríguez, C., Cantley, L. C., Hogan, P. G., & Rao, A. (1999). Affinity-Driven Peptide Selection of an NFAT Inhibitor More Selective Than Cyclosporin A. *Science*, *285*(5436), 2129–2133. <https://doi.org/10.1126/science.285.5436.2129>
155. Kar, P., & Parekh, A. B. (2015). Distinct Spatial Ca²⁺ Signatures Selectively Activate Different NFAT Transcription Factor Isoforms. *Molecular Cell*, *58*(2), 232–243.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.027>
156. Chen, W., An, P., Quan, X.-J., Zhang, J., Zhou, Z.-Y., Zou, L.-P., & Luo, H.-S. (2017). Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II regulates colon cancer proliferation and migration via ERK1/2 and p38 pathways. *World Journal of Gastroenterology*, *23*(33), 6111–6118.
<https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i33.6111>
157. Lakshmikuttyamma, A., Selvakumar, P., Kanthan, R., Kanthan, S. C., & Sharma, R. K. (2005). Increased expression of calcineurin in human colorectal adenocarcinomas. *Journal of Cellular Biochemistry*, *95*(4), 731–739. <https://doi.org/10.1002/jcb.20437>
158. Cheng, R., Sun, B., Liu, Z., Zhao, X., Qi, L., Li, Y., & Gu, Q. (2014). Wnt5a Suppresses Colon Cancer by Inhibiting Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition: Wnt5a AND COLON CANCER. *Journal of Cellular Physiology*, *229*(12), 1908–1917.
<https://doi.org/10.1002/jcp.24566>
159. Buchholz, M., Schatz, A., Wagner, M., Michl, P., Linhart, T., Adler, G., ... Ellenrieder, V. (2006). Overexpression of c-myc in pancreatic cancer caused by ectopic activation of NFATc1 and the Ca²⁺/calcineurin signaling pathway. *The EMBO journal*, *25*(15), 3714–3724.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601246>

160. Köenig, A., Linhart, T., Schlegemann, K., Reutlinger, K., Wegele, J., Adler, G., ... Ellenrieder, V. (2010). NFAT-Induced Histone Acetylation Relay Switch Promotes c-Myc-Dependent Growth in Pancreatic Cancer Cells. *Gastroenterology*, *138*(3), 1189-1199.e2. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.10.045>
161. Xu, W., Gu, J., Ren, Q., Shi, Y., Xia, Q., Wang, J., ... Wang, J. (2016). NFATc1 promotes cell growth and tumorigenesis in ovarian cancer up-regulating c-Myc through ERK1/2/p38 MAPK signal pathway. *Tumor Biology*, *37*(4), 4493–4500. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4245-x>
162. Karpurapu, M., Wang, D., Van Quyen, D., Kim, T.-K., Kundumani-Sridharan, V., Pulusani, S., & Rao, G. N. (2010). Cyclin D1 Is a Bona Fide Target Gene of NFATc1 and Is Sufficient in the Mediation of Injury-induced Vascular Wall Remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(5), 3510–3523. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.063727>
163. Hewitt, R. E., McMarlin, A., Kleiner, D., Wersto, R., Martin, P., Tsoskas, M., ... Stetler-Stevenson, W. G. (2000). Validation of a model of colon cancer progression. *The Journal of Pathology*, *192*(4), 446–454. [https://doi.org/10.1002/1096-9896\(2000\)9999:9999<::AID-PATH775>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH775>3.0.CO;2-K)
164. Wang, Y. (2009). Wnt/Planar cell polarity signaling: A new paradigm for cancer therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*, *8*(8), 2103–2109. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0282>
165. Dong, X., Liao, W., Zhang, L., Tu, X., Hu, J., Chen, T., ... Lu, X. (2017). RSPO2 suppresses colorectal cancer metastasis by counteracting the Wnt5a/Fzd7-driven noncanonical Wnt pathway. *Cancer Letters*, *402*, 153–165. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.024>
166. Li, Q., & Chen, H. (2012). Silencing of *Wnt5a* during colon cancer metastasis involves histone modifications. *Epigenetics*, *7*(6), 551–558. <https://doi.org/10.4161/epi.20050>

167. Tejada-Muñoz, N., González-Aguilar, H., Santoyo-Ramos, P., Castañeda-Patlán, M. C., & Robles-Flores, M. (2015). Glycogen Synthase Kinase 3 β Is Positively Regulated by Protein Kinase C ζ -Mediated Phosphorylation Induced by Wnt Agonists. *Molecular and Cellular Biology*, 36(5), 731–741. <https://doi.org/10.1128/MCB.00828-15>
168. Van Amerongen, R., & Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, 136(19), 3205–3214. <https://doi.org/10.1242/dev.033910>
169. Veeman, M. T., Slusarski, D. C., Kaykas, A., Louie, S. H., & Moon, R. T. (2003). Zebrafish Prickle, a Modulator of Noncanonical Wnt/Fz Signaling, Regulates Gastrulation Movements. *Current Biology*, 13(8), 680–685. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00240-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00240-9)
170. Sheldahl, L. C., Slusarski, D. C., Pandur, P., Miller, J. R., Kühl, M., & Moon, R. T. (2003). Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *The Journal of Cell Biology*, 161(4), 769–777. <https://doi.org/10.1083/jcb.200211094>
171. Choi, S.-C., & Han, J.-K. (2002). Xenopus Cdc42 Regulates Convergent Extension Movements during Gastrulation through Wnt/Ca²⁺ Signaling Pathway. *Developmental Biology*, 244(2), 342–357. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0602>
172. Yu, M., Ting, D. T., Stott, S. L., Wittner, B. S., Oszolak, F., Paul, S., ... Haber, D. A. (2012). RNA sequencing of pancreatic circulating tumour cells implicates WNT signalling in metastasis. *Nature*, 487(7408), 510–513. <https://doi.org/10.1038/nature11217>



OPEN ACCESS

EDITED BY

Cecilia Ana Suarez,
National Scientific and Technical Research
Council (CONICET), Argentina

REVIEWED BY

Nitin Telang,
Consultant, Montvale, NJ, United States
Mushtaq Ahmad Nengroo,
Northwestern University, United States
Zuzana Kozovska,
Slovak Academy of Sciences, Slovakia

*CORRESPONDENCE

Martha Robles-Flores
✉ rmartha@unam.mx

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

RECEIVED 12 December 2022

ACCEPTED 27 February 2023

PUBLISHED 10 March 2023

CITATION

Sarabia-Sánchez MA, Moreno-Londoño AP,
Castañeda-Patlán MC, Alvarado-Ortiz E,
Martínez-Morales JC and Robles-Flores M
(2023) Non-canonical Wnt/Ca²⁺ signaling
is essential to promote self-renewal and
proliferation in colon cancer stem cells.
Front. Oncol. 13:1121787.
doi: 10.3389/fonc.2023.1121787

COPYRIGHT

© 2023 Sarabia-Sánchez, Moreno-Londoño,
Castañeda-Patlán, Alvarado-Ortiz, Martínez-
Morales and Robles-Flores. This is an open-
access article distributed under the terms of
the [Creative Commons Attribution License
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Non-canonical Wnt/Ca²⁺ signaling is essential to promote self-renewal and proliferation in colon cancer stem cells

Miguel Angel Sarabia-Sánchez, Angela Patricia Moreno-Londoño, María Cristina Castañeda-Patlán, Eduardo Alvarado-Ortiz, Juan Carlos Martínez-Morales and Martha Robles-Flores*

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

Introduction: Cancer Stem Cells (CSC) are responsible for maintaining tumor growth, chemoresistance, and metastasis. Therefore, understanding their characteristics is critical to progress in cancer therapy. While the contribution of the canonical Wnt/b-catenin signaling in both normal and CSCs had been well established, the function of non-canonical Wnt signaling cascades in stem cells is unclear. Recently, we reported that Wnt ligands trigger complex signaling in which the canonical and non-canonical responses can be simultaneously activated by one ligand in colon cancer cells, suggesting, therefore, that noncanonical Wnt pathways may also be important in CSCs.

Methods: The present work aimed to know the role of the Wnt/Ca²⁺ pathway in colon CSCs. We used tumorspheres as a model of CSCs enrichment of CRC cell lines with different Wnt/b-catenin contexts.

Results: Using Wnt3a and Wnt5a as prototype ligands to activate the canonical or the non-canonical pathways, respectively, we found that both Wnt3a and Wnt5a promote sphere-formation capacity and proliferation without stimulating b-catenin-dependent transcription. Upregulation of sphere formation by Wnt5a or Wnt3a requires the downstream activation of Phospholipase C and transcriptional factor NFAT. Moreover, the single specific inhibition of PLC or NFAT, using U73122 and 11R-VIVIT, respectively, leads to impaired sphere formation.

Discussion: Our results indicate that both types of ligands activate the Wnt/Ca²⁺ signaling axis to induce/maintain the self-renewal efficiency of CSCs, demonstrating to be essential for the functions of CSC in colon cancer.

KEYWORDS

cancer stem cell, non-canonical Wnt/Ca²⁺ signaling, PLC, NFAT, tumor spheres

1 Introduction

Stem cells are a population of cells characterized by the capacity for cell self-renewal and for giving rise to mature cells in a given tissue. Their regulation is essential to support embryo development, organogenesis, and homeostasis of tissues in the body since they are required for tissue replacement throughout the human lifespan (1). The disruption of stem cell functions leads to several human diseases, such as cancer. Cancer stem cells (CSCs) represent a cell subset with characteristics akin to healthy stem cells, like self-renewal capacity, but with tumor-initiating ability and high invasive capacity. These properties of CSCs are thus involved in tumor initiation, propagation, and relapse.

Canonical Wnt signaling has been defined as one of the most important regulators of normal and cancer stem cells (2–4). While it is well established that Wnt/ β -catenin signaling is aberrantly activated in most colorectal cancers (CRC), the implication of the non-canonical, non- dependent β -catenin Wnt signaling in carcinogenesis and CRC progression is still unclear (4–7). With respect to the role played by Wnt signaling in stem cell functions, it has been established that the canonical Wnt/ β -catenin signaling cascade is involved in the self-renewal of stem cells and proliferation or differentiation of progenitor cells (5–7). However, although it is well known that non-canonical Wnts regulate cellular polarization, control nuclear localization of NFAT transcriptional factor, suppresses canonical Wnt signaling, and promote invasion, survival, and metastasis of CSCs, the contribution of non-canonical cascades to stem cells biology is still not well defined.

We have recently reported that both canonical prototype Wnt3a ligand and non-canonical prototype Wnt5a ligand activate a typical Wnt/ Ca^{2+} non-canonical signaling pathway in malignant colon cells, promoting Ca^{2+} mobilization as a result of phospholipase C (PLC) activation and inducing cell migration in these cells (8). Importantly, we demonstrated that canonical Wnt3a ligand not only stimulated the β -catenin transcriptional activity in colon cancer cells but, at the same time, activated PLC, promoted Ca^{2+} mobilization, and induced Rho kinase and PLC-dependent cell migration (8). These results, therefore, indicated that Wnts might simultaneously activate canonical and non-canonical Wnt signaling in colon cancer cells (8).

The aim of this work was to examine the role played by the non-canonical Wnt/ Ca^{2+} pathway, specifically in colon cancer stem cells. Using the prototype non-canonical ligand, Wnt5a, in comparison with Wnt3a, the prototype of a canonical β -catenin activating ligand, we describe here that non-canonical Wnt/ Ca^{2+} cascade plays an essential role in inducing and maintaining the self-renewal capacity of colon cancer stem cells.

2 Materials and methods

2.1 Cell lines

All cancer cell lines and the L-Wnt3a or L-Wnt5a cell lines used here were purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA). RKO is a prototype of BRAF-

driven colon cancer cells and exhibits responsive canonical Wnt signaling. SW480 and SW620 are the prototype of KRAS-driven colon cancer cells and have a truncated version of APC. SW480 and SW620 were obtained from the same patient from the primary tumor and lymph node metastasis, respectively.

2.2 Monolayer culture

RKO was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and antibiotics (100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin). SW480 and SW620 were maintained in DMEM F-12 supplemented with 5% FBS, 2 mM L-glutamine, and antibiotics (100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ amphotericin). L-Wnt3a cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and L-Wnt5a cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 4 mM L-glutamine. All cell lines were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 .

2.3 Sphere culture

Cells were collected from monolayer standard culture by trypsinization. Viable cells were quantified by staining with Trypan blue and were seeded to 1 cell/ μl in serum-free medium containing DMEM F-12 supplemented with 1X B27, 20ng/ml of EGF and 1X antibiotics (100 U/ml of Penicilin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Streptomycin and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Gentamicin and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amphotericin) in ultralow-attachment plates. Fresh medium was added each third day. For further analysis or sequential cultures, spheres were dissociated into single cells using TrypLETM Express (Gibco Cat no. 12604-013) according to manufacturer instructions. Sphere forming efficiency (SFE) was evaluated using the formula: [number of spheres/number of seeded cells] x 100.

2.4 Plasmids

The plasmids used in this work were the following TOP-GFP-mCherry plasmid was a gift from Ramesh Shivdasani (Addgene #35491). M50 Super 8x TOPFlash (Addgene #12456) and M51 Super 8x FOPFlash (Addgene #12457) were a gift from Randall Moon. pCMV/mCherry, pSORE6/mCherry, pCMV/GFP, and pSORE6/GFP (which contains a tandem repeat of the response element to Oct4/Sox2 derived from Nanog promoter) were a gift from Marco Velasco Velázquez.

2.5 Wnt ligand treatment

The cells were stimulated in the absence or the presence of recombinant human Wnt-3a (Cat. No. 5036-WN-010 R&D Systems) or Wnt-5a (Cat. No. 645-WN-010 R&D Systems). When indicated, the conditioned medium, obtained from L-

Wnt3a or L-Wnt5a cell lines, was used according to the manufacturer's instructions.

2.6 TOP reporter gene assay

The β -catenin-dependent transcription was evaluated using the plasmid TOP-GFP-Mcherry. Briefly, the cells were lentivirally transduced with TOP-GFP-mCherry. Transduced cells were isolated using FACSaria sorter to isolate mCherry⁺ cells. Positive fluorescence to mCherry⁺ was corroborated by cytometry flow using Attune Nxt cytometer. Positive cells were seeded in sphere culture and stimulated each third day with DMSO (vehicle), 250 ng/ml of Wnt3a, or 250 ng/ml of Wnt5a. The 11th day of sphere formation, spheres were disaggregated at cell single and analyzed to detect GFP⁺ cells, β -catenin-dependent reporter, by cytometry flow using Attune Nxt cytometer.

2.7 Lentivirus generation and cell transduction

Lentivirus was generated by cotransfection with the plasmids pCMV-VSV-G (Addgene #8454) and pCMV-dR8.2 (Addgene #8455) together with the plasmid of interest in HEK-293T cells. Lentiviral particles were harvested 72 hours post-transfection, aliquoted, and frozen at -80°C until use. For transduction with lentiviral constructs, target cells were exposed to viral supernatants for 24 h with Polybrene (5-20 μ g/ml). Transduced cultures were selected with 5-10 μ g/ml of Puromycin for ten days in the case of plasmids that had resistance. For plasmids that do not allow selection for antibiotic resistance, lentiviral transduced cells were cell-single sorted.

2.8 Intracellular calcium determinations

The calcium was quantified as previously described (8). In brief, the cells were serum-starved for 1 h at 37°C. Then, cells were loaded with 2.5 μ M Fura-2/AM (Cat. No. F1201 Invitrogen) in Krebs-Ringer-HEPES containing 0.05% BSA, pH 7.4, for 1 h at 37°C. The cells were washed and incubated 5 min in the absence or presence of 4 μ M PLC inhibitor U-73122. Fluorescence measurements were carried out with Wnt3a or Wnt5a ligands at 340- and 380-nm excitation wavelengths and at 510-nm emission wavelength with a chopper interval set at 0.5 s, using an AMINCO-Bowman Series 2 luminescence spectrometer (Rochester, NY).

2.9 Pharmacological treatment

U73122, obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, Mo, USA), 11R-VIVIT (Merck Cat. no. 480401), or vehicle (DMSO), were added at indicated concentrations during spheres formation each third day. Regarding the specificity of these compounds: U73122 is a potent, selective, and cell-permeable inhibitor of C-type

phosphatidylinositol-specific phospholipases that inhibits agonist-induced phospholipase C activation (IC₅₀ = 1-2.1 μ M), but has also reported inhibiting 5-lipoxygenase. 11R-VIVIT is a competitive NFAT inhibitor peptide based on the conserved calcineurin docking site of the NFAT family. Referred to as VIVIT, this peptide interferes with calcineurin-NFAT interaction without disrupting calcineurin phosphatase activity and without affecting other signalings regulated by calcineurin, such as NFkB (9).

2.10 Cell viability

Spheres were treated with U73122 or 11R-VIVIT each third day at the indicated concentrations. Quantification of viable cells was carried out on the 11th day of spheres forming using Propidium Iodide at 1:2000 dilution, and fluorescence was measured in the ATTUNE NEXT equipment.

2.11 Cellular fractionation

Separation of cytoplasmic and nuclear proteins was performed as briefly described below. Spheres were centrifuged at 2,800 rpm for 9 min. Pellet was resuspended in cytoplasm homogenization buffer I (10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5% Triton X-100, pH8) and shaken vigorously. Lysates were incubated at 4°C for 15 min, and 1% NP-40 was added and shaken vigorously. Lysates were centrifuged at 900 rpm for 10 min at 4°C. The supernatant was recovered and stored as a cytoplasmic extract. The pellet was resuspended in nucleus homogenization buffer (5 mM HEPES, 0.75 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 0.25% Triton X-100, 0.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10% Glycerol, 0.25 mM DTT) and shaken vigorously. Lysates were incubated at 4°C for 15 min and centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. The supernatant was recovered and stored as a nuclear extract.

2.12 Western blotting

Cells were lysed with RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, and supplemented with protease and phosphatase inhibitors) and shaken vigorously every 10 min for 3 h. Lysates were centrifuged (13000 rpm for 5 min), and supernatants were stored at -80°C until use. Proteins were quantified by Bradford protein assay and separated by SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). The proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad), and membranes were blocked with 3% nonfat dry milk in TBS for 1 h. Primary antibodies incubated overnight at 4°C with the indicated primary antibody (Non-phospho (Active) β -catenin (Cat. No. 8814 Cell Signaling), NFAT1 (Cat. No. 610703 BD Biosciences), NFAT2 (Cat. No. 556602 BD Biosciences), NFAT3 (sc-271597 Santa Cruz Biotechnology), NFAT4 (SC-8405 Santa Cruz Biotechnology), Lamin B1 (ab16048 Abcam), α -Tubulin (T9026 Sigma)) according to manufacturer's instructions. Then, membranes were

washed with washing buffer (TBS, 0.025% Tween 20) and incubated with HRP-conjugated secondary antibody for 2 h at room temperature. Blots were revealed using SuperSignal Kit (Pierce) in C-DiGit Blot scanner (LI-COR Bioscience, Lincoln, NE, USA), and analysis was performed by Image Studio™ Lite Software (LI-COR Biosciences).

2.13 Flow cytometry

Cells were obtained by trypsinization or using TrypLETM Express from monolayer or sphere culture. The cells were incubated for 30 min at 4°C as follows: CD133-PE-coupled (Cat. No. 12-1338-42 eBioscience), CD44-APC-coupled (559942 BD Pharmingen), and CD44v6 (Cat. No. BMS125 eBioscience). In the case of CD44v6, the cells were washed and incubated with FITC-coupled anti-mouse secondary antibody for 30 min at 4°C in dark conditions. The Single cell suspension was acquired in Attune Nxt cytometer. Data were analyzed using the FlowJo software (Tree Star®). For FACS of cells transduced with the SORE reporter system, RKO^{CMV} and SW480^{CMV} were used as control of fluorescence, and cell sorting was performed using a FACSaria sorter.

2.14 In silico analysis

Gene signature quantification was performed using Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA2) platform considering the median group cutoff (10). For analysis of CAMK2B mRNA in different stages of American Joint Committee on Cancer, TCGA public data from Pan-Cancer was used (11).

2.15 Statistical analysis

The data is represented as the mean ± Standard Error of the Means (SEM) of at least three independent experiments. Student's t-test was used to compare the means of two groups. Multiple comparisons between three or more groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparisons. A p-value of p<0.05 was considered statistically significant.

3 Results

3.1 Tumor sphere culture is enriched in CSCs and serves as a study model of CSCs derived from colon cancer cell lines

Colon spheres have been widely described as a stable *in vitro* model to study stem cells since their enrichment has been demonstrated in these cultures (12). To establish whether RKO, SW480 and SW620 colon cancer cell lines have the capacity to grow in non-adherent conditions, cultures in a clonal density upon

anchorage-independent growth and serum-free medium were performed, and the sphere formation efficiency (SFE) was quantified. In each cell line, a cellular subpopulation survived and generated spheres. In particular, SW480 had the lowest SFE, while RKO and SW620 had similar SFE (Figure 1A). The self-renewal capacity is recognized through consecutive cultures, where spheres from the first generation are dissociated at cell single and seeded to form spheres in a subsequent generation and so on. As can be observed in Figure 1A, the quantification of SFE in the first, second and third generations showed that RKO, SW480 and SW620 cells had a cellular subpopulation able to maintain the capacity to form spheres (Figure 1A). This supported the notion of the self-renewal process and then that the spheres are constituted of stem cells.

The expression of several stem cell markers, such as CD133, CD44, and CD44v6 has been widely validated in colon CSCs (13, 14). Consistent with this, the analysis of cell surface expression of these markers by flow cytometry in second-generation spheres showed that more than 95% of RKO or SW480 spheres express CD44 and display a heterogeneous expression of CD133 and CD44v6 depending on the CRC cell line spheres tested (Supplementary Figure 1). Transcriptional factors OCT4, SOX2, and NANOG have also been reported to be relevant for stemness (15). Thereby, a reporter plasmid system referred to as pSORE6, containing a tandem repeat of an OCT4/SOX2 response element derived from the NANOG promoter, was used to confirm the presence of CSCs in the spheres. Analysis by flow cytometry detected SORE6+ cells in RKO and SW480 spheres transduced with pSORE6 (RKO^{SORE6} and SW480^{SORE6}, respectively) compared to cells transduced with pCMV, the control plasmid lacking SORE element (RKO^{CMV} and SW480^{CMV}) (Figure 1B). To corroborate that SORE6+ cells are enriched in CSC, SFE of single cell culture from SORE6+ cells and SORE6- cells was assessed. Results showed a higher SFE in SORE6+ cells compared to SORE6- cells, both in RKO^{SORE6} and SW480^{SORE6}, reinforcing the notion that SORE6+ cells have a higher capacity to form spheres than SORE6- cells (Figure 1C). Once SORE6+ cells were identified in RKO^{SORE6} and SW480^{SORE6} populations, it was of interest to know whether this subpopulation is maintained throughout consecutive sphere cultures. The analysis showed that the percentage of SORE6+ cells was also increased in the third generation but only statistically significant in RKO^{SORE6} (Figure 1D). Because the percentage of SORE6+ cells was augmented in subsequent sphere culture, SFE was measured in RKO^{SORE6} and SW480^{SORE6} populations to find out if it was related to an increase in the proportion of cells able to form spheres. Results showed that SFE improved in the third generation of RKO^{SORE6} spheres, while SW480^{SORE6} exhibited similar percentages (Figure 1E). Additionally, RKO^{CMV} and SW480^{CMV} had enrichment of sphere-forming cells, corroborating that the sphere culture is a tool to enrich the CSC subpopulation (Figure 1E).

3.2 Wnt3a but not Wnt5a stimulates β-catenin transcriptional activity in RKO and SW620 sphere cells

The response to Wnt ligands is partially dependent on mutations in components of the canonical Wnt pathway (16). In our work, we

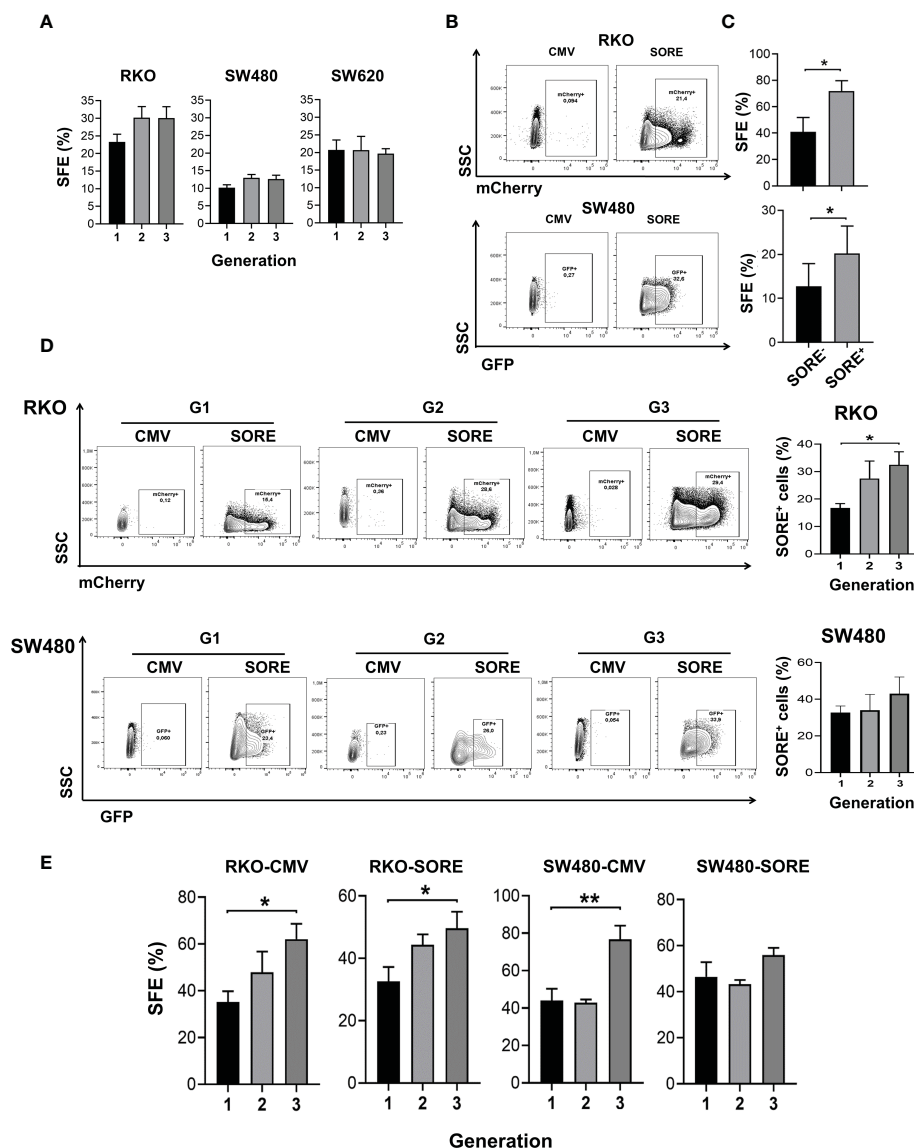


FIGURE 1

CSC are identified in spheres cultures derived from colon cancer cell lines. (A) Quantification of SFE of RKO, SW480, and SW620 cells throughout three consecutive generations. (B) Density plots of RKO and SW480 cells transduced with pSORE6/mCherry or pSORE6/GFP, respectively, and measured by flow cytometry. Transduced cells with pCMV were used as a reference for fluorescence. (C) Quantification of SFE of single cell cultures sorted from SORE⁶⁻ and SORE⁶⁺ subpopulations of RKO^{SORE6} and SW480^{SORE6} populations. (D) Density plots of RKO^{SORE6} and SW480^{SORE6} throughout three consecutive generations (left panel). Quantification of the percentage of SORE⁶⁺ subpopulation of each generation (right panel). (E) Quantification of SFE of RKO^{CMV}, RKO^{SORE6}, SW480^{CMV}, and SW480^{SORE6} throughout three consecutive generations. Data are represented as the mean values \pm SEM of at least three independent experiments using Student's t-test. (A, D, E) or one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$.

employed RKO and SW480 or SW620 human colon cancer cell lines as representative of normal Wnt signaling (RKO, which expresses normal APC protein) and constitutively active Wnt signaling (SW480 and SW620, which express a truncated version of APC and representative of distinct stage of progression in the same patient) (17). We have previously reported that in RKO cells, only prototype canonical Wnt3a is able to activate the β -catenin-mediated transcriptional activity in a dose-dependent manner and not Wnt5a, and this last one blocks the Wnt3a-induced β -catenin transcriptional activity (8). However, these studies were carried out in culture standard conditions of the monolayer. To examine if this

response mediated by Wnt ligands is conserved in spheres, RKO, SW480, and SW620 sphere cells were transduced with pmCherry-TOP/GFP, which allows evaluating the β -catenin-dependent transcriptional activity by GFP expression. For stimulation, the sphere medium was supplemented with Wnt3a or Wnt5a and added each third day (Figure 2A). In agreement with data from monolayer conditions, results showed an increase in the percentage of GFP+ cells in RKO^{TOP/GFP} and also an increase in active β -catenin (non-phosphorylated) levels when second-generation spheres were stimulated with Wnt3a, but not with Wnt5a, then demonstrating responsiveness of canonical Wnt pathway by Wnt3a in RKO spheres

(Figures 2B, C). In SW480^{TOP/GFP} spheres, as expected, there were no changes in the presence of Wnt3a or Wnt5a since these cells have ligand-independent, constitutive active canonical Wnt signaling. Furthermore, most SW480^{TOP/GFP} cells were GFP+, confirming that almost all of them have active canonical Wnt pathways (Figure 2B). SW620^{TOP/GFP} cells showed a different phenotype at basal conditions than RKO and SW480 because GFP+ and GFP- cells were clearly identified, indicating that, even though SW620 cells were derived

from the same patient that SW480 cells, the control of canonical Wnt pathway is distinct: in the presence of Wnt3a or Wnt5a, the percentage of GFP+ cells diminished in a statistically significant manner, demonstrating that, indeed, the response of canonical Wnt signaling to Wnt ligands is different between SW480 and SW620 (Figure 2B). Thus, data indicate that the response to Wnt ligands is an intrinsic characteristic of the cells, and each cell line represents a unique context for regulating Wnt signaling.

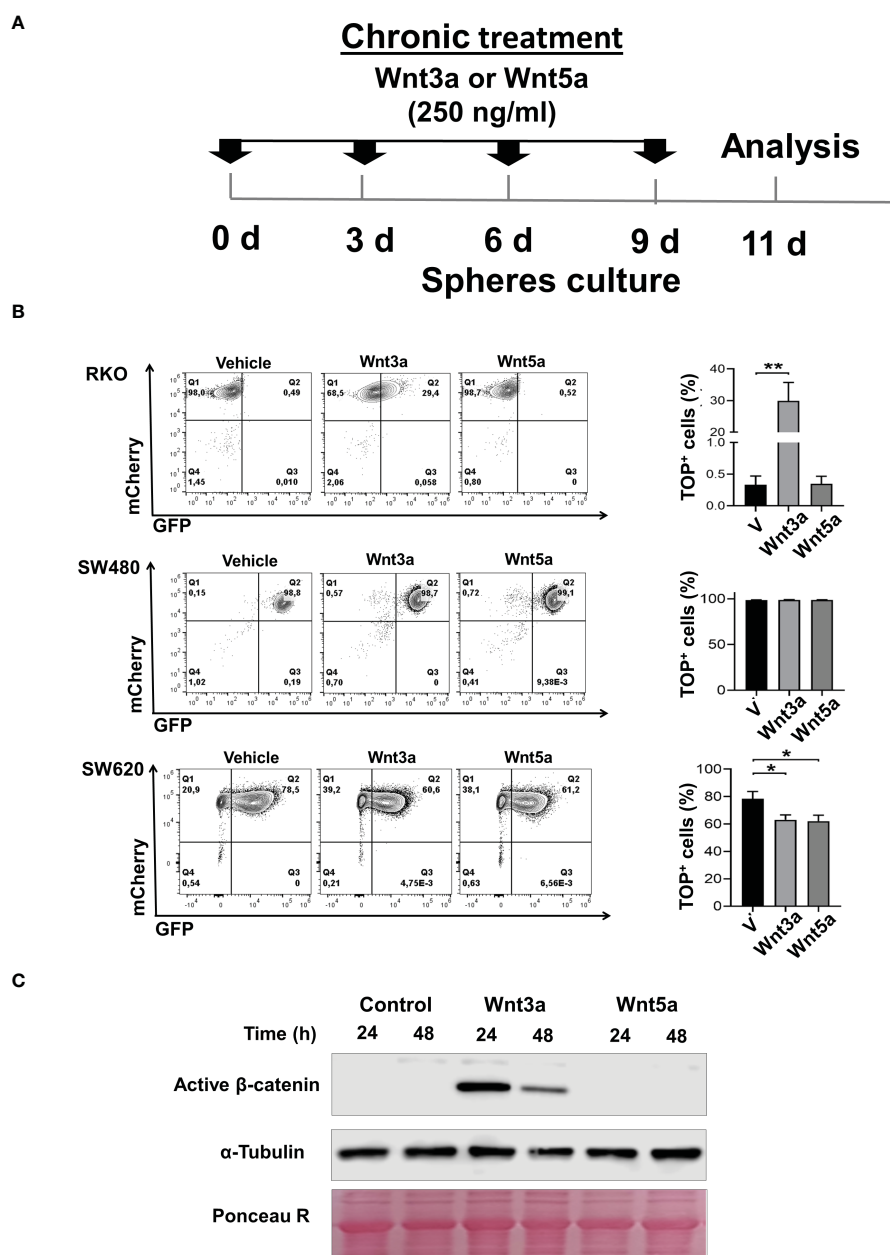


FIGURE 2
Wnt3a but not Wnt5a stimulates β-catenin transcriptional activity in RKO and SW620 sphere cells. (A). Experimental scheme for spheres stimulation of RKO^{TOP/GFP}, SW480^{TOP/GFP}, and SW620^{TOP/GFP} cells with Wnt3a (250ng/ml) or Wnt5a (250ng/ml). Transduced cells are indicated as mCherry+ cells (B). Density plots were measured by flow cytometry (left panel), and the quantification of the percentage of GFP+ cells of RKO^{TOP/GFP}, SW480^{TOP/GFP}, and SW620^{TOP/GFP} from spheres chronically treated with Vehicle, Wnt3a or Wnt5a are shown (right panel). (C) Analysis of active form of β-catenin by Western blot performed in samples obtained from RKO spheres (second generation) in the absence or the presence of Wnt3a or Wnt5a at the indicated times. α-Tubulin and Ponceau Red were used as loading controls. Data are represented as the mean values ± SEM of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons. *p<0.05; **p<0.005.

3.3 Wnt3a or Wnt5a stimulate sphere formation in RKO and SW620 cells

To know the effect of Wnt3a and Wnt5a in sphere formation, cells were pretreated with Wnt ligands in monolayer culture before seeding them to form spheres. Wnt ligands were also added every third day during the growth stage of spheres to maintain the stimulus. Our results showed that the SFE increased in both RKO and SW620 cells treated with Wnt3a or Wnt5a (Figure 3A). The positive effect of Wnt3a on sphere formation could be mediated in RKO cells due to the activation of the β -catenin transcriptional activity. However, the positive impact on SFE may not be mediated by a ligand-induced activation of β -catenin transcriptional activity

since in both RKO and SW620 cells, Wnt5a also produced an increase in SFE (Figure 3A). In addition, SW620 also augmented SFE with Wnt3a or Wnt5a (Figure 3A), although β -catenin-mediated transcription was decreased in the presence of Wnt3a or Wnt5a in these cells (Figure 2B). Together, these results suggested an alternative β -catenin transcriptional activity-independent mechanism for inducing sphere formation capacity in RKO and SW620 cells in response to Wnt ligands (Figure 3A). In SW480 cells, a decrease in SFE was obtained upon Wnt3a or Wnt5a treatment (Figure 3A). In this case, since SW480 cells did not show changes in the canonical Wnt pathway in the presence of Wnt3a or Wnt5a, as observed in Figure 2C, the decrease observed in sphere formation induced by both Wnt3a or Wnt5a, again suggests that it

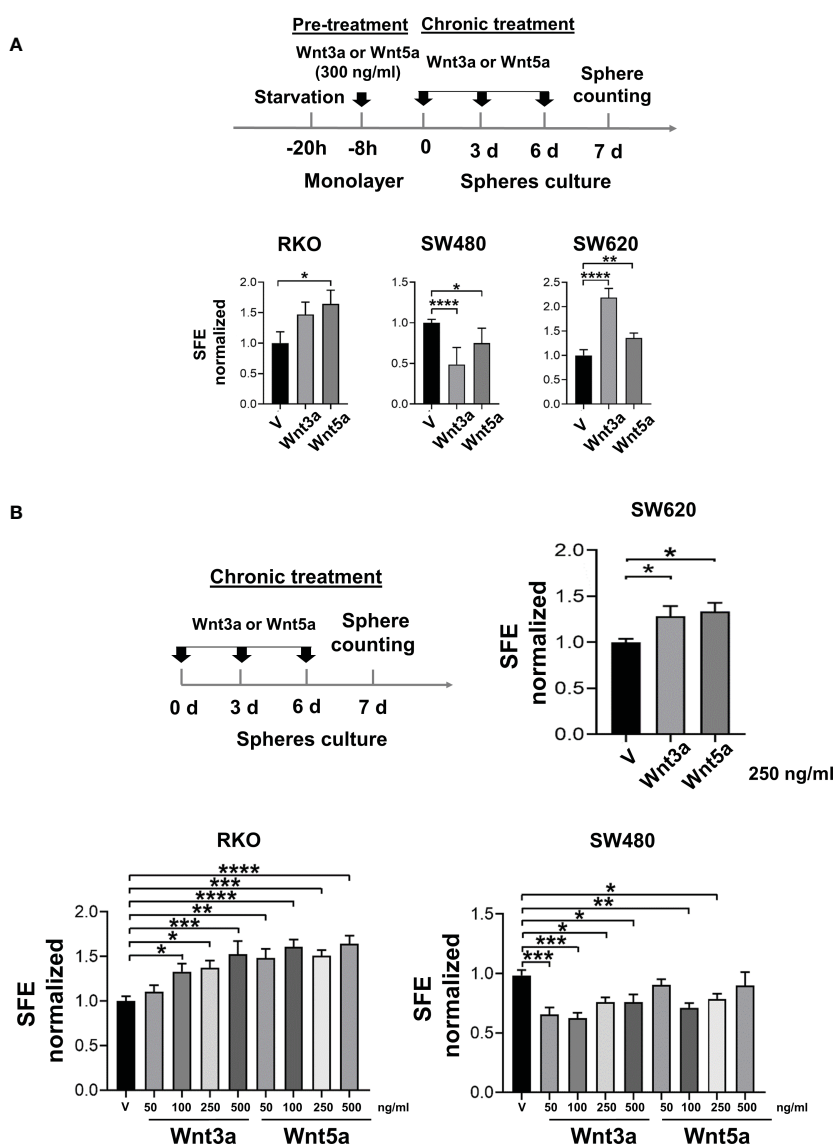


FIGURE 3

Wnt3a and Wnt5a stimulate spheres formation in RKO and SW620 but decrease in SW480. (A) Experimental scheme for spheres stimulation (upper panel) and quantification of SFE in RKO, SW480, and SW620 cells (lower panel) with pre-treatment and chronic treatment with Wnt3a or Wnt5a. (B) Experimental scheme for spheres stimulation (upper panel) and quantification of SFE in RKO, SW480, and SW620 cells (lower panel) with the chronic treatment of Wnt3a or Wnt5a at the indicated concentrations. Data are represented as the mean values \pm SEM of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

may occur through a β -catenin-independent, but Wnt-dependent mechanism.

To confirm that these results were due to a direct effect of Wnt ligands in CSC-enriched cultures, the spheres were stimulated exclusively in the growth stage of spheres by chronic treatment. Results showed that both RKO and SW620 cells increased SFE when Wnt3a or Wnt5a were present (Figure 3B). In the case of RKO, the increase was dose-dependent, and although both Wnt ligands stimulated SFE, the changes induced by Wnt5a were more significant than the ones induced by Wnt3a, suggesting that each ligand may not necessarily activate the same signaling mechanisms. On the contrary, SW480 cells decreased SFE when the spheres were stimulated with Wnt3a or Wnt5a, being statistically significant in most of the concentrations evaluated (Figure 3B). These findings were consistent with the effects of Wnt ligands in pretreated spheres, and therefore, the impact of Wnt ligands on sphere formation cannot be explained by the levels of activation of the canonical Wnt pathway.

3.4 Wnt ligands affect the proliferative capacity of spheres in the short and long term

The proliferation in a serum-free medium, such as in sphere culture, is an important aspect of the study of CSC under these conditions. The cell number obtained from sphere culture in the absence or the presence of Wnt ligands was quantified to know whether Wnt ligands have an impact on this process. Results showed that at the highest concentration used of either Wnt3a or Wnt5a, the cell number was lower compared to the vehicle in RKO cells (Figure 4A), although an increase in SFE has been previously observed in results shown in Figure 3B, indicating, therefore, that forming spheres and cellular propagation are two processes that can be regulated differently by the same stimulus. This phenomenon was similar in SW620 cells, where the cell number decreased (Figure 4C) though their SFE increased (Figure 3B) under the same conditions of Wnt ligand stimulation. The idea of differential regulation between sphere formation capacity and proliferation is reinforced with the findings obtained in SW480 cells, where both ligands induced an increase in proliferation (Figure 4B), while SFE was reduced (Figure 3B).

Because Wnt ligands can evoke changes in cells that can be sustained over long periods (18), we were interested to know whether a chronic stimulation in the first generation of sphere formation might have an impact on subsequent generations, specifically on proliferation. The results showed that Wnt3a increased proliferation at the third generation in the three RKO, SW480, and SW620 spheres, although it was only statistically significant in RKO and SW480 spheres (Figures 4D–F). These data demonstrated that Wnt3a is closely related to positive regulation of cell proliferation, which was observed more clearly in subsequent generations than in the first generation, despite having stopped stimulating with Wnt ligands in the second and third generations. Strikingly, the fold change was greater in SW480

cells than in RKO and SW620 cells, even though SW480 cells did not display changes in the canonical Wnt pathway in the first generation, as shown in Figure 2C. On the other hand, Wnt5a maintained low levels of proliferation in the three generations of RKO cells while increasing in SW480 and SW620 in the third and second generations, respectively (Figures 4D–F). These findings highlight that the relationship between Wnt5a and proliferation depends on the cellular context. Notably, the fold change observed in SW480 cells was greater than in SW620 cells, corroborating that spheres of SW480 are responsive to both types of ligands, which has repercussions in the proliferative capacity.

3.5 The activity of PLC is essential for sphere capacity formation

As mentioned before, we recently reported that both canonical prototype Wnt3a ligand and noncanonical prototype Wnt5a ligand promote PLC-dependent Ca^{2+} mobilization and migration in both RKO or SW480 colon cancer cells under standard monolayer culture conditions (8). In this work, we confirmed that both Wnt3a and Wnt5a ligands promote Ca^{2+} mobilization that is blocked as a result of PLC inhibition in RKO, SW480, and SW620 spheres, as can be observed in Figure 5A. In addition, we found that these same ligands cause changes in the ability to form spheres. To know whether noncanonical Wnt/ Ca^{2+} pathway is important in the regulation of sphere formation, the cells were treated with the PLC-specific inhibitor U73122 alone at different concentrations during sphere culture. Interestingly, the results showed that the percentage of SFE decreased in a dose-dependent manner at similar rates in all three cell lines tested (Figure 5B) despite the differences in the sphere formation capacity previously observed upon Wnt stimulation, suggesting that the role of PLC seems crucial for inducing and maintaining this capacity. The cell viability was measured to rule out if the effects of U73122 were due to toxicity mediated by the inhibitor. Quantification of living cells did not show statistically significant differences, even at the highest dose employed, demonstrating that PLC inhibition impairs CSC cultures without promoting cell death (Figure 5C). Because Wnt-dependent functions have been attributed to PLC, we next examine whether PLC inhibition could affect the changes in sphere formation induced by Wnt3a or Wnt5a. The spheres were then treated either with Wnt3a or Wnt5a along with 500 nM U73122. The results in Figure 5D show that U73122 decreased the SFE by a similar value indistinctly whether Wnt3a or Wnt5a was present or not (Figure 5D). In detail, the increase of SFE induced by Wnt ligands in RKO and SW620 cells was diminished, while in SW480 cells, in which the same stimulus decreased sphere formation, the levels of SFE remained low when U73122 was added in the absence or the presence of Wnt ligands (Figure 5D). These findings demonstrated that PLC activity is essential for sphere formation in these cell lines and that Wnt ligands could not compensate for the negative effect produced by PLC inhibition, suggesting that PLC is a downstream component in the signaling mediated by both ligands.

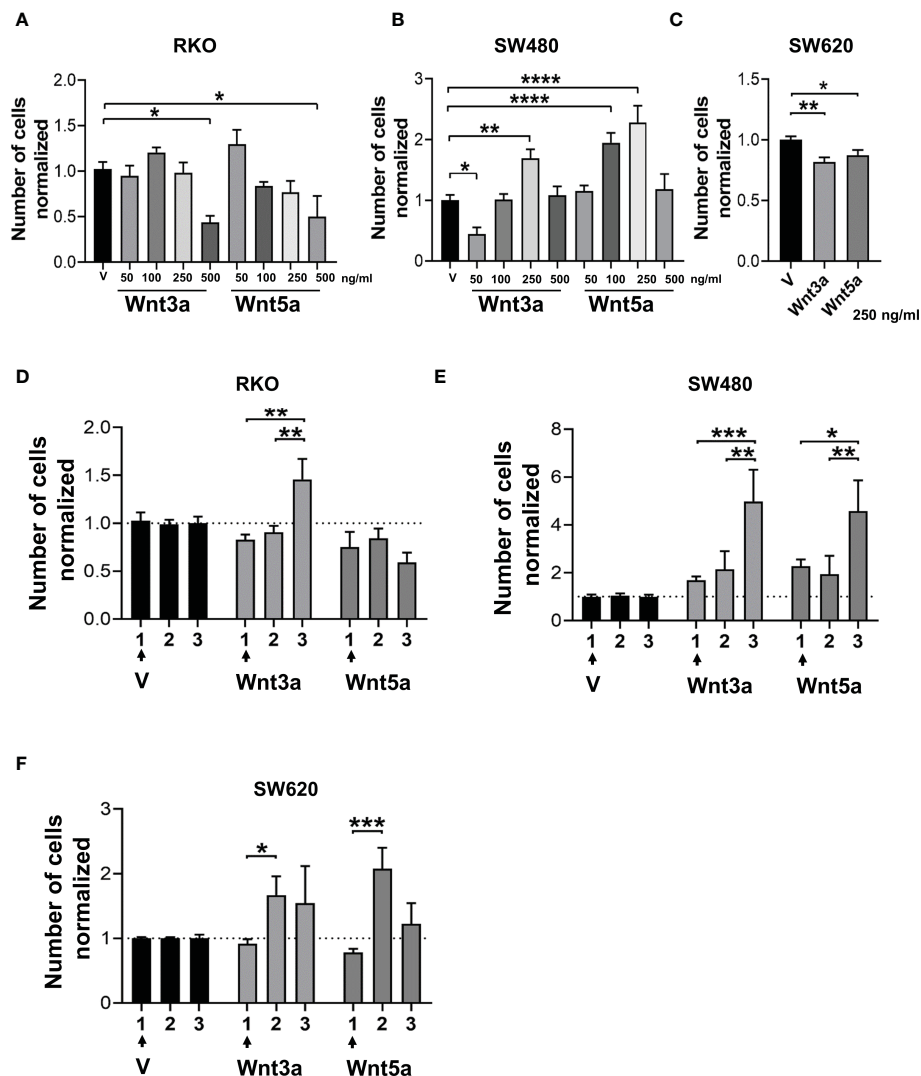


FIGURE 4

Effect of Wnt ligands on the proliferative capacity in spheres in the short and long term. (A–C) Normalized cell number obtained from the 1st generation of spheres of RKO, SW480, and SW620 cells treated with Wnt3a or Wnt5a at the indicated concentrations. (D–F) Comparison of normalized cell number obtained from the first, second, and third generation of RKO, SW480, and SW620 spheres treated with Wnt3a or Wnt5a only in the first generation. Data are represented as the mean values \pm SEM of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.6 Sphere forming capacity also required the NFAT function

The noncanonical Wnt/Ca²⁺ pathway has implications in transcriptional activation through NFAT family members. This family of transcription factors consists of NFAT1 (NFATc2), NFAT2 (NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATc3), and NFAT5. Therefore, we first elucidate the expression profile of NFATs in colon tumor spheres, in addition to knowing their activation by distinguishing their location at the nucleus. The subcellular fractions of spheres did not allow the detection of NFATs, possibly due to the low amount of protein, so the evaluation was performed in subcellular fractions of monolayer cultures. Results demonstrated that NFAT1, 2, 3, and 4 are expressed in RKO, SW480, and SW620 cells (Figure 6A). Remarkably, NFATs were found enriched in the

nucleus, suggesting they have constitutive activity in basal (unstimulated) conditions.

Subsequently, the activity of NFATs was blocked using 11R-VIVIT, a cell-permeable NFAT inhibitor (suitable for inhibiting all NFAT isoforms), during the sphere growth stage, and the SFE was measured. The capacity to form spheres in RKO, SW480 and SW620 cells was blocked with 11R-VIVIT in a dose-dependent manner. Notably, each cell line required a different concentration of 11R-VIVIT to induce the loss of 50% in SFE, being SW620 cells which required the highest concentration of 11R-VIVIT, followed by SW480 cells, and RKO cells required the less concentration, which suggests that the sensitivity to 11R-VIVIT is possibly due to the characteristics of each cell line (Figure 6B).

Again, to investigate if 11R-VIVIT was affecting the viability of the cells, which could explain the decrease in the sphere-forming capacity, we measured dead cells by IP staining. As shown in

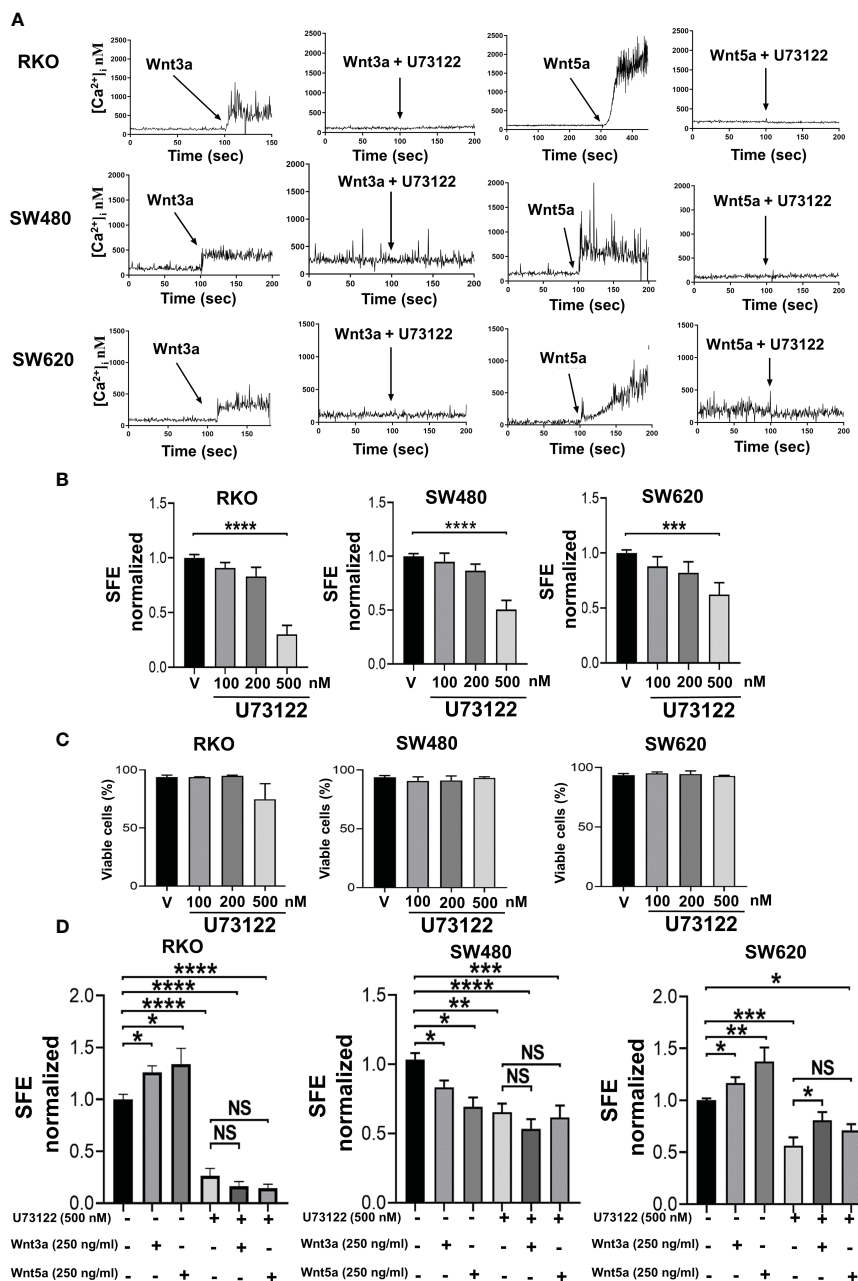


FIGURE 5
 Inhibition of PLC impairs sphere formation. (A) Both Wnt5a or Wnt3a increase cytosol calcium concentration in RKO, SW480 or SW620 spheres that was blocked by pretreatment of sphere cells with PLC-specific inhibitor U-73122. Cells were serum-starved overnight and then loaded with 2.5 μM of Fura-2/AM in Krebs-Ringer-HEPES containing 0.05% BSA, pH 7.4, for 1 h at 37 °C. Cells were washed and sphere cells stimulated with the conditioned medium containing Wnt3a or Wnt5a. Additionally, the spheres were pre-treated in the absence or presence of 4 μM PLC inhibitor U73122 before stimulation, as indicated. Traces are representative of three experiments using different cell preparations. (B) Quantifying SFE in spheres of RKO, SW480, and SW620 cells treated with the PLC inhibitor U73122 at the indicated concentrations each third day. (C) Quantification of viable cells of spheres of RKO, SW480, and SW620 under the same conditions as described in panel (B) Evaluation was performed by IP staining and detected by flow cytometry on the 11th day of culture. (D) Quantifying SFE in spheres of RKO, SW480, and SW620 cells treated with U73122, Wnt3a, Wnt5a, or a combination of them. The concentration of each stimulus is indicated in the figure. Data are represented as the mean values ± SEM of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001; NS, not significative.

Figure 6C, flow cytometry analysis demonstrated similar percentages of cell survival in each concentration of compound employed, thus indicating that the outcome of 11R-VIVIT was not due to toxicity (Figure 6C). Since it was established that 11R-VIVIT reduced sphere formation, we examined the SFE in co-treatment of

11R-VIVIT with Wnt3a or Wnt5 to know if they could induce any compensatory effect. We found that the exposure to 11R-VIVIT (IC₅₀ dose for each cell line) decreased the SFE, regardless of the presence of either Wnt ligand, showing that NFAT activity is also crucial for the sphere-forming capacity. In addition, these results

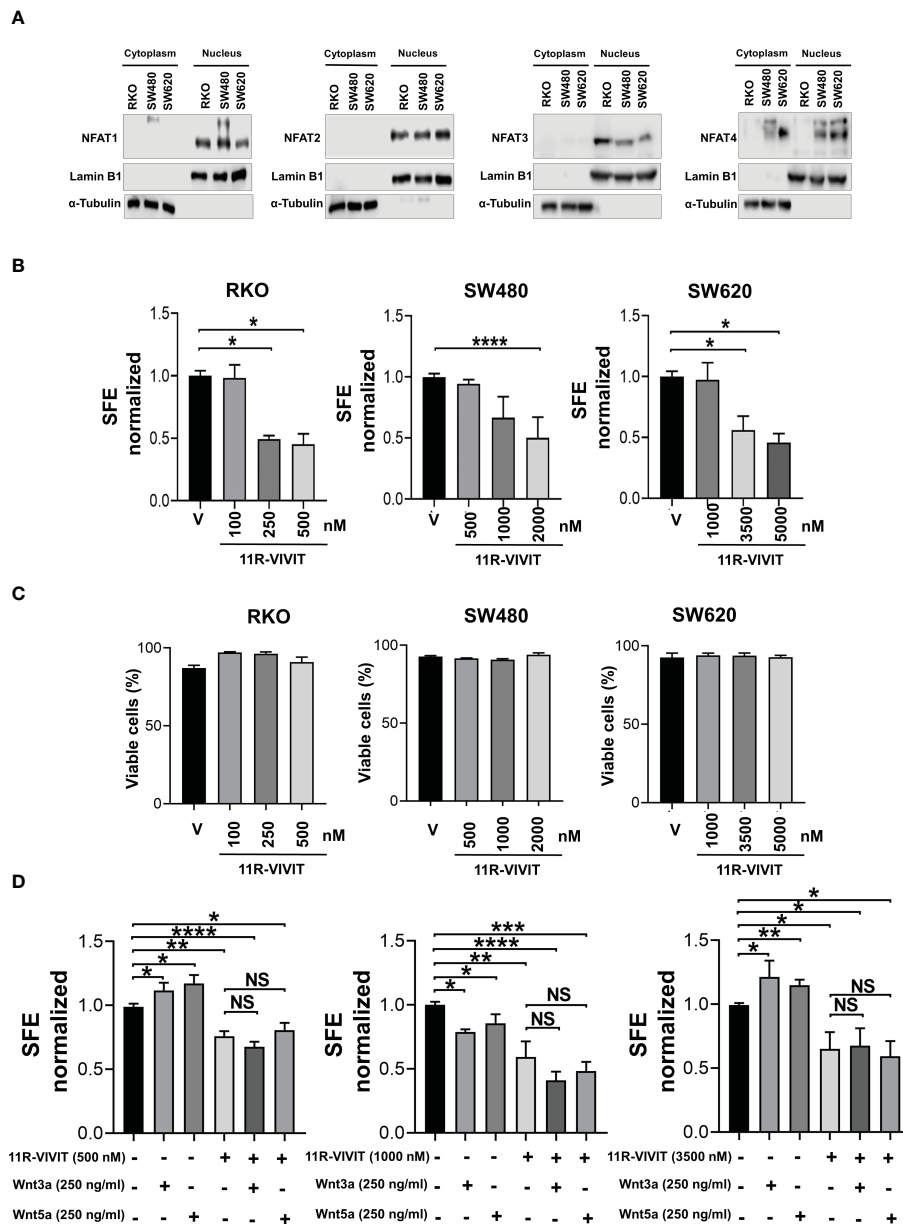


FIGURE 6 NFAT activity is required for spheres formation. (A) Analysis of NFAT1, NFAT2, NFAT3, and NFAT4 expression by Western blot performed in samples obtained from cell fractionation from monolayer cultures. Lamin B1 and α -tubulin were used as a loading control and fractionation purity of nuclear and cytoplasmic fractions, respectively. (B) Quantifying SFE in spheres of RKO, SW480, and SW620 cells treated with the NFAT inhibitor 11R-VIVIT at the indicated concentrations each third day. (C) Quantification of viable cells of spheres of RKO, SW480, and SW620 under the same conditions described in panel (B) Evaluation was performed by IP staining and detected by flow cytometry on the 11th day of culture. (D) Quantifying SFE in spheres of RKO, SW480, and SW620 cells treated with 11R-VIVIT, Wnt3a, Wnt5a, or their combination. The concentration of each stimulus is indicated in the figure. Data are represented as the mean values \pm SEM of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; NS, not significant.

also indicate that Wnt3a or Wnt5a stimulate a noncanonical Wnt-Ca²⁺ pathway since NFAT acts downstream of Wnt3a or Wnt5a stimulation of spheres (Figure 6D).

4 Discussion

Cancer stem cells (CSCs) or tumor-initiating cells have been the focus of cancer research during the last years because they have

been regarded as the cells of origin of cancer and are crucially involved in metastatic dissemination, resistance to cancer therapy, and disease recurrence (2–4). CSCs possess abilities generally associated with embryonic or adult stem cells, especially self-renewal and differentiation. In this work, we have used sphere culture, a widely used method to evaluate the self-renewal capacity of CSC. Despite the fact that the crucial role of the canonical Wnt pathway in self-renewal has been consistently reinforced, little is known about the involvement of β -catenin-independent Wnt

pathways in this process. Our results demonstrate here that the non-canonical Wnt/Ca²⁺ cascade is essential for CSC self-renewal, regardless of the activation status of the canonical Wnt pathway. Furthermore, the cell proliferation was stimulated by Wnt3a and Wnt5a without necessarily activating β -catenin-mediated transcription, which indicates that CSC requires non-canonical Wnt pathways.

CRC is considered an aberrant Wnt pathway disease because APC mutations are the earliest alteration detected in most colon cancer cases (3, 4). Considering this, we have used in our studies SW480 cells and its metastatic derivative SW620 cell line for being cancer cells with truncated APC representing distinct stages of progression in the same patient. We also employed RKO cells, as it harbors wild-type APC, and thus an inducible activation of the canonical Wnt pathway. This allows us to broaden the outlook of the implications of non-canonical Wnt pathways in different cellular contexts.

We found here that SW480 spheres no longer increased β -catenin-mediated transcription in the presence of Wnt3a, but this same ligand markedly promoted proliferation, suggesting the existence in these cells of Wnt-responsive non-canonical pathways. Remarkably, both Wnt3a and Wnt5a were capable of stimulating cell proliferation. The effects of Wnt ligands on proliferative capacity were evidently distinguishable in later generations of spheres, corroborating that Wnt ligands can have long-time outcomes. Several reports have exemplified that functional changes can be found by the passing of spheres (12, 15). For example, stimulation of hematopoietic stem cells (HSC) with Wnt5a during six days favored the short-term and long-term repopulating ability of HSC over 16 weeks from the latter, thus indicating that a Wnt stimulus can dispose cells to lasting changes (15). SW620 is a cell line with mutated APC since it comes from the same patient as SW480 but was isolated from a lymph node due to metastasis. Differences between SW480 and SW620 have been recognized here, which implies that they do not share identical biological characteristics (16).

The most salient finding obtained in this work was the demonstration that Wnt3a and Wnt5a ligands stimulate the non-canonical Wnt/Ca²⁺ pathway activating PLC and NFAT transcription factors to critically regulate the self-renewal capacity of CSCs. In this regard, the role of non-canonical Wnt signaling in CSCs was reported before by Qin L et al. in 2015 (17). They found that Wnt5a promoted epithelial-mesenchymal transition (EMT) in nasopharyngeal carcinoma (NPC) cells and induced the accumulation of CD24-CD44+ cells and side population, suggesting that Wnt5a is an important molecule in promoting stem cell characteristics in this cancer type (17). In addition, Yang J et al., in 2016 (18) showed that Wnt5a could increase the aldehyde dehydrogenase (ALDH) positive lung cancer stem cells inducing an enhanced capacity of cell proliferation, migration, invasion, and colony formation.

Based on our results, despite the contrasted alterations of sphere formation and proliferation in response to Wnt ligands between cell lines, the role of Wnt/Ca²⁺ turned out to be fundamental in CSC of CRC. The calcium signaling downstream of PLC has also been established as relevant for features of embryonic stem cells (ESC)

such as self-renewal and pluripotency, although upstream components have remained poorly understood. At the membrane level, mGlu (metabotropic glutamate) receptors increased intracellular calcium in mESC, and dietary L-glutamate encouraged the proliferation of intestinal stem cells (ISC) in *Drosophila*, indicating mGlu receptor-dependent calcium oscillations (19). On the other hand, LPA (Lysophosphatidic acid) has been reported to increase calcium levels in mESC, augmenting the proliferation of ESC. In this study, the PLC inhibitor U73122 blocked the effect of LPA, implicating PLC activity. Noteworthy, the effect of U73122 on the proliferation of ESC was not due to the toxicity of the compound (20, 21), similar to our data, in which U73122 decreased the sphere formation efficiency without affecting cellular viability. Activation of G-protein coupled receptors (GPCR) by culture media components has been proposed to be part of the signaling pathway in ESC, in which fluctuations of calcium levels are described (21). Specifically, G(α -q/11)-coupled GPCR can compensate for the absence of bFGF for hESC self-renewal, in which PLC β and CAMKII are downstream components (22).

Regarding what is known about the role played by the non-canonical Wnt/Ca²⁺ pathway in colon cancer patients, accumulating evidence has shown that the prototypal non-canonical Wnt5a ligand-mediated actions, along with an increase in Ror1/Ror2 non-canonical co-receptors expression have been found to be associated with an aggressive phenotype in colon cancer patients. However, specifically, the role(s) of the Wnt/Ca²⁺ pathway has not been studied so far in patients. Nevertheless and interestingly, using the American Joint Committee on Cancer, TCGA public data from Pan-Cancer, and the Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA2) platform, we performed an *in silico* analysis of some critical Wnt/Ca²⁺ components. The analysis of CAMK2B mRNA in different stages of colon cancer patients and the analysis of Kaplan-Meier curves of survival corresponding to NFAT1, NFAT2, NFAT3, and NFAT4 expression signatures demonstrated that all these Wnt/Ca²⁺ elements are overexpressed in advanced colorectal cancer stages, inducing a reduced survival time in patients (please see [Supplementary Figure 3](#)).

A more direct relationship of intracellular calcium oscillations with properties in CSC has begun to emerge, highlighting that PLC is crucial in the stemness of both normal and cancer cells. Interestingly, in 2015 Cecchetti S et al. (23) reported that the exposure of tumor-initiating cells in squamous cell carcinoma to the phosphatidylcholine-specific Phospholipase C inhibitor D609 interfered with the proliferation and survival of these cells (23). But a most direct implication of PLC activation in stimulating embryonic stem cell proliferation, although by an unknown ligand, was reported in 2003 by Quinlan RL et al. (24), who consistent with our findings, reported that the PLC inhibitor U-73122 significantly reduced the number of mouse ES cells in a dose-dependent manner but did not decrease cell viability or increase the incidence of apoptotic cells, indicating that PLC has a controlling role in ES-cell proliferation (24). It is noteworthy that this experimental evidence, along with that presented here, suggests that the Phosphatidylinositol (PtdIns) signaling system is essential for the normal proliferation of ES cells and for regulating self-

renewal capacity in CSCs. Interestingly, it has been reported very recently that recruitment of Dvl to the plasma membrane can increase the local PI (4,5)P2 concentration, which is the PLC substrate (25). These authors suggest a positive feedback loop in which Wnt-stimulated local PI (4,5)P2 production enhances Dvl recruitment and further PI (4,5)P2 production to support Dvl polymerization and Wnt-mediated signaling.

Altogether, our results demonstrate that Wnt ligands can improve characteristics of CSC of CRC in a β -catenin-independent manner, supporting that non-canonical Wnt pathways are essential in these types of cells. In detail, we have characterized a Wnt/Ca²⁺ PLC/NFAT signaling pathway as a key regulator pathway for the biological properties of CSC, which expands the panorama of the complex Wnt network beyond the canonical pathway.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Author contributions

MS-S and MR-F participated in the experimental design and writing. MS-S, AM-L, MC-P, EA-O, and JM-M performed the experiments. MS-S, AM-L, and MR-F analyzed the data. MR-F provided the financial support. MR-F supervised and approved the final version of this manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This research was supported by grants from Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM IN229420 and IV200220) and from CONACYT (FOSSIS 2017-289600).

Acknowledgments

MS-S is a Ph.D. student in the Program “Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)”, and was granted with a Fellowship by CONACYT, CVU550337. JM-M was granted with a Postdoctoral Fellowship by DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

References

1. Sugimura R, Li L. Noncanonical wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Res (Part C)* (2010) 90:243–56. doi: 10.1002/bdrc.20195
2. Ring A, Kim YM, Kahn M. Wnt/catenin signaling in adult stem cell physiology and disease. *Stem Cell Rev Rep* (2014) 10(4):512–25. doi: 10.1007/s12015-014-9515

We thank the LABNALCIT-UNAM technical support in the acquisition, analysis and sorting of flow cytometry samples. We thank Dr. Nohemí Salinas-Jazmín and Dr. Marco Velasco-Velázquez for donating the following plasmids: pCMV/mCherry, pSORE6/mCherry, pCMV/GFP and pSORE6/GFP. We also thank Dr. Maria Teresa Romero Ávila and Dr. J. Adolfo García-Sáinz for technical assistance with calcium measurements.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2023.1121787/full#supplementary-material>

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

CSC-related markers are expressed in spheres cultures. (A) Density plots showing the proportion of CD133, CD44 and CD44v6 in spheres of RKO, SW480 and SW620 cells were measured by flow cytometry.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2

Cell viability is not affected by U73122 or 11R-VIVIT. Density plots of viable cells of spheres of RKO, SW480, and SW620 cells treated with U73122 (A) or 11R-VIVIT (B) at the indicated concentrations each third day, evaluated by IP staining and detected by flow cytometry on the 11th day of culture.

SUPPLEMENTARY FIGURE 3

Components of Non-canonical Wnt pathway are associated with clinical parameters. Kaplan-Meier curves of survival for Signature: *NFAT1*, *NFAT2*, *NFAT3* and *NFAT4* (A) and *CAMK2B* (B) in patients with CRC are shown. (C) Analysis of *CAMK2B* mRNA in different stages of CRC according to American Joint Committee on Cancer. Data are represented as Z-scores relative to all samples. Statistical analysis was performed using Mann-Whitney U test non-parametric. **p*<0.05; ***p*=0.0015; *****p*<0.0001

3. Vermeulen L, De Sousa E, Melo F, van der Heijden M, Cameron K, de Jong JH, et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* (2010) 12(5):468–76. doi: 10.1038/ncb2048
4. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* (2005) 434:843–50. doi: 10.1038/nature03319
5. Barker N. Adult intestinal stem cells: Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2014) 15:19–33. doi: 10.1038/nrm3721
6. Yang K, Wang X, Zhang H, Wang Z, Nan G, Li Y, et al. The evolving roles of canonical WNT signaling in stem cells and tumorigenesis: Implications in targeted cancer therapies. *Lab Invest* (2016) 96:116–36. doi: 10.1038/labinvest.2015.144
7. Kato M. Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches: Cellular heterogeneity, omics reprogramming, targeted therapy and tumor plasticity. *Int J Oncol* (2017) 51:1357–1369. doi: 10.3892/ijo.2017.4129
8. Flores-Hernández E, Velázquez DM, Castañeda-Patlán MC, Fuentes-García G, Fonseca-Camarillo G, Yamamoto-Furusho JK, et al. Canonical and non-canonical wnt signaling are simultaneously activated by wnts in colon cancer cells. *Cell Signal* (2020) 72:109636. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109636
9. Aramburu J, Yaffe MB, López-Rodríguez C, Cantley LC, Hogan PG, Rao A. Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin a. *Science* (1999) 285(5436):2129–33. doi: 10.1126/science.285.5436.2129
10. Tang Z, Kang B, Li C, Chen T, Zhang Z. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res* (2019) 47:W556–60. doi: 10.1093/nar/gkz430
11. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* (2013) 6(269):pl1. doi: 10.1126/scisignal.2004088
12. Li Y, Liu Y-H, Hu Y-Y, Chen L, Li J-M. Special AT-rich sequence-binding protein 2 acts as a negative regulator of stemness in colorectal cancer cells. *WJG* (2016) 22:8528. doi: 10.3748/wjg.v22.i38.8528
13. Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise review: Emerging role of CD44 in cancer stem cells: A promising biomarker and therapeutic target. *Stem Cells Transl Med* (2015) 4(9):1033–43. doi: 10.5966/sctm.2015-0048
14. Taniguchi H, Moriya C, Igarashi H, Saitoh A, Yamamoto H, Adachi Y, et al. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancer. *Cancer Sci* (2016) 107(11):1556–62. doi: 10.1111/cas.13069
15. Nemeth MJ, Topol L, Anderson SM, Yang Y, Bodine DM. Wnt5a inhibits canonical wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proc Natl Acad Sci USA* (2007) 104:15436–41. doi: 10.1073/pnas.0704747104
16. Hewitt RE, McMarlin A, Kleiner D, Wersto R, Martin P, Tsoskas M, et al. Validation of a model of colon cancer progression. *J Pathol* (2000) 192:446–54. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999::AID-PATH775>3.0.CO;2-K
17. Qin L, Yin Y-T, Zheng F-J, Pengn LX, Yang C-F, Bao Y-N, et al. WNT5A promotes stemness characteristics in nasopharyngeal carcinoma cells leading to metastasis and tumorigenesis. *Oncotarget* (2015) 6(12):10239–52. doi: 10.18632/oncotarget.3518
18. Yang J, Zhang K, Wu J, Shi J, Xue J, Li J, et al. Wnt5a increases properties of lung cancer stem cells and resistance to cisplatin through activation of Wnt5a/PKC signaling pathway. *Stem Cells Int* (2016) 1690896:1–16. doi: 10.1155/2016/1690896
19. Ermakov A, Daks A, Fedorova O, Shuvalov O, Barlev NA. Ca2+ -dependent signaling pathways regulate self-renewal and pluripotency of stem cells. *Cell Biol Int* (2018) 42:1086–96. doi: 10.1002/cbin.10998
20. Todorova MG, Fuentes E, Soria B, Nadal A, Quesada I. Lysophosphatidic acid induces Ca2+ mobilization and c-myc expression in mouse embryonic stem cells via the phospholipase c pathway. *Cell Signal* (2009) 21:523–8. doi: 10.1016/j.cellsig.2008.12.005
21. Ermakov A, Pells S, Freile P, Ganeva VV, Wildenhain J, Bradley M, et al. A role for intracellular calcium downstream of G-protein signaling in undifferentiated human embryonic stem cell culture. *Stem Cell Res* (2012) 9:171–84. doi: 10.1016/j.scr.2012.06.007
22. Deng H, Gerencser AA, Jasper H. Signal integration by Ca2+ regulates intestinal stem-cell activity. *Nature* (2015) 528:212–7. doi: 10.1038/nature16170
23. Cecchetti S, Bortolomai I, Ferri R, Mercurio L, Canevari S, Podo F, et al. Inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase c interferes with proliferation and survival of tumor initiating cells in squamous cell carcinoma. *PLoS One* (2015) 10(9):e0136120. doi: 10.1371/journal.pone.0136120
24. Quinlan RL, Faherty S, Kane MT. Phospholipase c and protein kinase c involvement in mouse embryonic stem-cell proliferation and apoptosis. *Reproduction* (2003) 126:121–31. doi: 10.1530/rep.0.1260121
25. Mahoney JP, Bruguera ES, Vasishtha M, Killingsworth LB, Kyaw S, Weis WI. PI (4,5)P2-stimulated positive feedback drives the recruitment of dishevelled to frizzled in wnt-β-catenin signaling. *Sci Signal* (2022) 15:eabo2820. doi: 10.1126/scisignal.abo2820



WNT Signaling in Stem Cells: A Look into the Non-Canonical Pathway

Miguel Angel Sarabia-Sánchez¹ · Martha Robles-Flores¹

Accepted: 17 August 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Tissue homeostasis is crucial for multicellular organisms, wherein the loss of cells is compensated by generating new cells with the capacity for proliferation and differentiation. At the origin of these populations are the stem cells, which have the potential to give rise to cells with both capabilities, and persevere for a long time through the self-renewal and quiescence. Since the discovery of stem cells, an enormous effort has been focused on learning about their functions and the molecular regulation behind them. Wnt signaling is widely recognized as essential for normal and cancer stem cell. Moreover, β -catenin-dependent Wnt pathway, referred to as canonical, has gained attention, while β -catenin-independent Wnt pathways, known as non-canonical, have remained conspicuously less explored. However, recent evidence about non-canonical Wnt pathways in stem cells begins to lay the foundations of a conceivably vast field, and on which we aim to explain this in the present review. In this regard, we addressed the different aspects in which non-canonical Wnt pathways impact the properties of stem cells, both under normal conditions and also under disease, specifically in cancer.

Keywords Non-canonical Wnt · Stemness · Cancer · Cancer stem cell

Introduction

The canonical Wnt pathway has been extensively supported to be critical in stem cell biology and functions, but little is known about the roles of non-canonical Wnt pathways in these cells [1]. Stem cells are crucial for physiological tissue renewal and regeneration due to their ability to self-renew and to give rise to multiple cell types by differentiation [2]. The maintenance of the undifferentiated state of stem cells in adulthood is achieved due to self-renewal, wherein the biological characteristics and developmental potential are preserved despite going through cell division [3]. Self-renewal allows stem cells to persist. However, in addition to self-renewal, quiescence is part of the stem cell strategy to be available during the adult stage because it implies a low cell cycle rate, which consequently establishes two populations of stem cells: quiescent and proliferating/active stem cells [4]. In specific conditions, the stem cells differentiate

into progenitors, giving rise to the cell lineages corresponding to the tissue where they reside. However, the stem cells can enter a senescent state wherein the potential to proliferate and differentiate is missing [5]. For this reason, the microenvironment or niche plays a decisive role in keeping stem cells in an optimal state, in which the secretion of Wnt ligands is indispensable [6]. Recent research on stem cells has revealed that the non-canonical Wnt pathways enable stem cells to carry out their tasks.

Noteworthy, the canonical and non-canonical Wnt pathways were initially conceived as linear and independent mechanisms, but nowadays, it has been demonstrated that they share several signaling components, supporting the idea of a whole signaling network. As previously mentioned, the findings reinforce the notion that that one ligand can promote simultaneous activation under specific conditions [7]. However, in this review, we were interested in explaining the findings that discern the regulation of traits of stem cells by non-canonical Wnt pathways as complementary knowledge to what is known for the canonical Wnt pathway, even under disease conditions such as cancer.

✉ Martha Robles-Flores
rmartha@unam.mx

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM),
Mexico City, Mexico

Wnt Pathways

The Wnt family consists of cysteine-rich secreted glycoproteins that act as ligands in an autocrine and paracrine manner to regulate a wide range of cellular functions [8]. Within the transduction mechanisms, the β -catenin-dependent signaling has been the first and most widely described, being categorized as the canonical Wnt pathway [9]. However, it is known that Wnt ligands can elicit β -catenin-independent mechanisms, classifying them as non-canonical Wnt pathways. Specifically, Wnt/calcium and PCP (Planar Cell Polarity) pathways have been well-studied non-canonical Wnt pathways [8]. Briefly, the Wnt/calcium pathway leads to increased intracellular calcium levels and, hence, the activation, but not exclusively, of CAMKII, PKC, and Calcineurin. Interestingly, this pathway, in addition to leading to NFAT-mediated transcriptional activation downstream of Calcineurin, also triggers cytoskeletal rearrangement by improving the activity of CDC42, a target of PKC [10]. Meanwhile, the PCP pathway involves the signaling module DAAM/RHOA/ROCK, which has an effect on actin polymerization [11]. Therefore, WNT/calcium and Wnt/PCP pathways influence the cell polarity and migration [12, 13]. In the case of the PCP pathway, the genetic expression profile can be modified through JUN downstream of JNK, and JNK, in turn, is activated by RAC1, a parallel component of the PCP pathway [8] (Fig. 1).

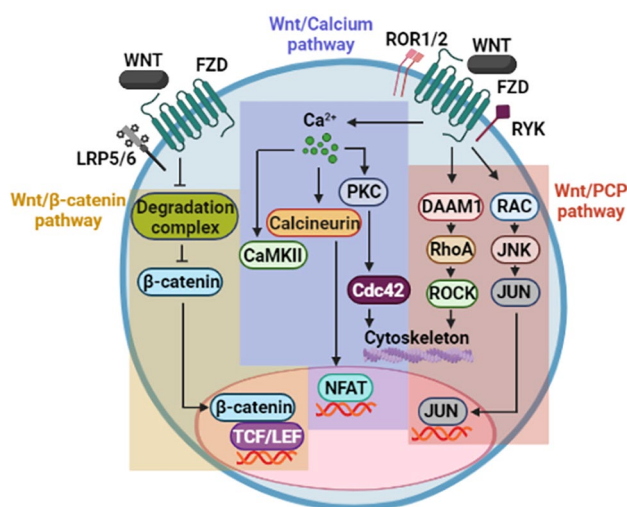


Fig. 1 Wnt signaling network. The canonical Wnt pathway is mediated by β -catenin-dependent transcription. Typical non-canonical signaling comprises Wnt/calcium and Wnt/PCP pathways, both of which cause activation of members of the GTPase family, with modulation of gene expression and cytoskeletal rearrangements. Wnt/calcium pathway activates effectors such as CaMKII, Calcineurin, and PKC through oscillations in intracellular calcium levels, in addition to upregulating NFAT. Meanwhile, Wnt/PCP pathway stimulates RAC and RhoA, as well as the transcriptional activity of JUN.

New components in both types of Wnt pathways are being discovered, while some already described are associated with a specific Wnt pathway [14, 15]. For example, Wnt3a and Wnt5a are referred to as prototype ligands that activate canonical and non-canonical Wnt pathways, respectively [16]. As will be seen throughout the present review, these ligands are indicators of whether one or another pathway is activated; however, it is crucial to take into account that the same Wnt ligand may activate both canonical and non-canonical Wnt pathways simultaneously [7].

Recognition of Wnt ligands requires Fzd (Frizzled) receptors, which can be assisted by co-receptors, which serve as accessories and cooperate in determining the specificity of the downstream effectors. Like Wnt3a and Wnt5a, co-receptors are commonly related to one particular Wnt signaling. The LRP5/6 co-receptor employs the canonical Wnt pathway, while ROR1/2 and Ryk are linked to the activation of non-canonical Wnt pathways [16]. ROR1/2 are atypical RTK co-receptors, and Ryk can act as a receptor or co-receptor [17].

The Perseverance to Keep Walking: Non-Canonical Wnt Pathway as a Path to Self-Renewal

A hallmark characteristic of stem cells is their self-renewal capacity, which allows them to preserve their undifferentiated state features and maintain the potential to specialize towards specific cell lineages [3]. It has been challenging to assess the self-renewal ability; however, there are methods to address it, such as the ability to reconstitute hematopoiesis in the case of *in vivo* transplantation of HSC (Hematopoietic Stem Cells) or the ability to form spheres, one of the most widely used assays under culture conditions, that is considering as standard test in the study of the self-renewal.

Although the hematopoiesis reconstitution is considered an *in vivo* gold functional test of HSC, transplantation into serial recipients is also required to demonstrate the long-term clonal growth [18]. The expression of the non-canonical Wnt5a ligand in primitive hematopoietic cells [7, 12–17] has emphasized the essential role of non-canonical Wnt signaling in replenishing the hematopoietic system [19]. Indeed, an assay of hematopoiesis reconstitution of xenotransplanted mice with human HSCs demonstrated that CD34⁺CD38⁻Lin⁻ cells were enriched in Wnt5a-treated mice and that the engrafted mice repopulated more efficiently with Wnt5a-treated HSCs than unstimulated HSCs.

Regarding the canonical Wnt pathway, although the activity of β -catenin in response to Wnt3a has been proven to be important for the self-renewal of HSC [20, 21], the deletion of β -catenin in bone marrow-derived precursors

displayed a similar potential for hematopoietic repopulation than wild-type precursors. Because no detection of β -catenin in mature blood cells was described, the dispensable role of β -catenin in the hematopoietic process under physiological conditions was proposed [22, 23]. Consistent with this, it has been reported recently [24] that using Wnt3a and Wnt5a as prototype ligands to activate the canonical or the non-canonical pathways, respectively, in colon cancer stem cells (CSCs), both ligands promote sphere-formation capacity and proliferation in a β -catenin-independent manner. Both Wnt3a and Wnt5a were also found to induce or maintain sphere formation by the downstream activation of Phospholipase C and transcriptional factor NFAT. The single specific inhibition of PLC or NFAT leads to impaired sphere formation, indicating, therefore, that the non-canonical Wnt/Ca²⁺ signaling activated by both Wnt ligands is essential to induce/maintain the self-renewal efficiency of the CSCs [24].

The relevance of the non-canonical Wnt pathway in Melanocyte precursor cells (MPCs) has been demonstrated for the preservation of a less-differentiated state. MPCs obtained from iPSCs (induced pluripotent stem cells) and comparable to melanocyte stem cells expressed high levels of Wnt5a and non-canonical ROR2 co-receptor. Because the knockdown of ROR2 triggered MPCs differentiation by activating the canonical WNT pathway, it was suggested that non-canonical Wnt partially favors a less-differentiated state, likely involving JUN due to its upregulation in MPCs [3].

In addition, higher levels of Wnt5a, Ror2, and Fzd1 were detected in Mesenchymal Stem Cells (MSCs) derived from bone marrow (BM) and umbilical cord blood than in human iPSCs [25]. In this report, the expression profile of surface proteins in MSC was maintained by circFOXP1, a circRNA originating from the *FOXP1* gene. This circFOXP1 acts as a miRNA sponge targeting miR-17-3p and miR-127-5p. Both miRNAs downregulate WNT5A and ROR2 mRNAs. Thereby circFOXP1 sustains non-canonical Wnt in MSC through increasing levels of WNT5A and ROR2 [25].

The canonical Wnt pathway has been demonstrated to be important in the efficiency of forming spheres when, for example, normal neural stem cells (NSC) are exposed to Wnt3a without affecting the range of cell division in the spheres [26]. In mammary epithelial cells (MEC), both Wnt3a and Wnt5a increased the capacity to form mammospheres wherein each type of ligand induced distinct signaling pathways. Wnt3a upregulated the canonical Wnt signaling dependent on Lrp5/6, while Ror2 and JNK activities were necessary for Wnt5a stimulus [27]. Indeed, recently it has been reported that using Wnt3a and Wnt5a as prototype ligands to activate the canonical or the non-canonical pathways, respectively, promotes sphere-formation capacity

and proliferation through the β -catenin-independent manner in colon cancer cells [24]. Both Wnt3a and Wnt5a were found to induce or maintain sphere formation by triggering Phospholipase C (PLC) and transcriptional factor NFAT activation. Consistent with this, the inhibition of PLC or NFAT impaired sphere formation, indicating that the non-canonical Wnt/calcium signaling activated by both Wnt ligands is essential for self-renewal of CSC, discussed in detail later in the text [24].

Exploration of the self-renewal has revealed that Wnt5a and components of the non-canonical Wnt pathway act as molecular intermediaries cooperating in maintaining the undifferentiated state [28]. Therefore, non-canonical Wnt ligands might be secreted to prevent premature differentiation and maintaining self-renewal simultaneously [29]. However, as discussed below, this seems to depend on the cellular context, as non-canonical Wnt signaling promotes differentiation in specific circumstances [30, 31]. Since self-renewal has been associated with other capabilities, such as cell migration [32] and hematopoietic repopulation [23, 29], it would be interesting to know what other cellular functions are closely related to self-renewal capacity, which are regulated by the non-canonical Wnt pathway (Fig. 2).

Acquiring a New Destiny: Non-canonical Wnt Pathway as a Passport to Differentiation

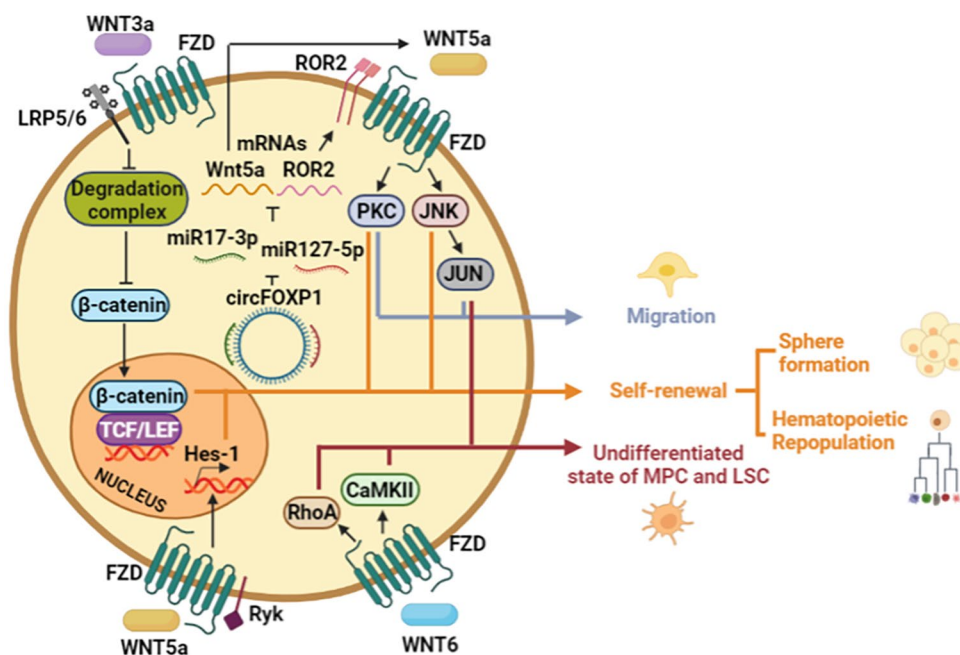
According to the requirements of the tissues, the stem cells begin the differentiation process to compensate for the loss of cells, either through normal attrition or in response to pathological conditions [43]. Although it was previously mentioned that Wnt5a could sustain the undifferentiated state of stem cells, Wnt5a participates in the differentiation of other cell types, which emphasizes that the role of Wnt5a in differentiation depends on the traits of the biological model under study [44].

The differentiation capacity towards one or several cell lineages depends on the degree of the stem cell potentiality. In the case of multipotent cells, the balance in the expression between two prototypical canonical and non-canonical ligands, Wnt3a and Wnt5a, respectively, can dictate the specific lineage acquired. For instance, Wnt3a favors lymphopoiesis, while Wnt5a augments myelopoiesis in the BM and spleen; however, it is necessary to know the mechanisms triggered by each one [45].

MSCs categorized as multipotent progenitors have attracted attention because MSCs can be isolated from different anatomical locations and obtain a specific cell type to replace damaged cells when transplanted [33]. Within MSC-derived cell lineages, osteogenic differentiation has provided insights into the role of the non-canonical Wnt

Fig. 2 Regulation of self-renewal by Wnt ligands. Wnt3a and Wnt5a confer self-renewal capacity, where Wnt3a increases β -catenin activity, while Wnt5a stimulates JNK and PKC.

Furthermore, PKC and JUN stimulate the migratory capacity of stem cells. Wnt5a and ROR2 mRNAs are downregulated by miR17-3p and miR-127-5p. However, these miRNAs are inhibited by circFOXP1. Wnt5a can elicit the expression of Hes-1, a component of the Notch pathway, to allow the self-renewal of HSC. In the case of MPC and LSC, the undifferentiated state is maintained by JUN, RhoA, and CaMKII.



pathways in differentiation. Indeed, experimental evidence of the Calcium-dependent signaling participation in osteogenic differentiation has been reported [34]. Previous studies showed that Wnt3a increased nuclear β -catenin levels, but also NKD1 (Naked cuticle 1 homolog), Wnt11, and Wnt5a expression in human MSCs during osteogenesis. Activation of JNK stimulated osteogenic differentiation while repressed adipogenic differentiation, confirming additional mechanisms to those dependent on β -catenin in decision-making towards a specific cell lineage. It is conceivable that the non-canonical Wnt signaling emerges because Wnt5a was upregulated in this phenomenon [35]. Consistently, tendon-derived stem cells can induce osteogenic differentiation upon uniaxial mechanical tension (UMT). During the process, mechanical stress upregulated the levels of Wnt5a, Wnt5b, Ror2, and Rac1. Moreover, the absence of Wnt5a or Wnt5b impaired UMT-induced Runx2 expression, but this repressed effect was reversed when JNK1 was overexpressed, revealing that Wnt5a or Wnt5b promotes osteogenic differentiation through JNK activation [36]. In MSC obtained from human adult oral and craniofacial tissues, Wnt4 is shown to be a positive regulator in osteogenic differentiation without affecting cell proliferation or death. Besides, p38 MAPK augmented while β -catenin levels did not undergo changes in the presence of Wnt4. Even an auto-crine mechanism by another stimulus is unlikely due to the short time response of p38 activation [30]. Interestingly, p38 phosphorylation induced by Wnt4 was dependent on Axin, which did not alter its levels, so the interaction of Axin with MEKK1, an activator of JNK, could be a mode of action [37].

The notion of Wnt mediating calcium oscillations in osteogenic differentiation has also been strengthened by other findings in adipocyte-derived stem cells (ADSCs), in which the overexpression of miR-26a-5p, a miRNA targeting mRNA of Wnt5a, reduced the intracellular calcium concentration, protein levels of CaMKII and phosphorylated form of PKC in these cells [38]. Besides, high levels of miR-26a-5p impaired osteogenic differentiation while levels of β -catenin were increased, indicating that the canonical Wnt pathway must be repressed to allow the cellular process [53]. The inhibitor effect of the canonical Wnt pathway could explain why the Wnt ligands restrict osteogenic differentiation in some cases, demonstrating that Wnt ligands can elicit opposite responses depending on the downstream effectors [39, 40].

During an early stage of differentiation, stem cells may divide symmetrically or asymmetrically. In asymmetric division, one daughter cell remains a stem cell, and the other is a non-stem cell [41]. In osteogenic induction of MSCs, they proliferate asymmetrically, and Osterix and OCT4 are expressed in differentiated cells and undifferentiated cells, respectively [42]. Sr (Strontium), an osteogenic compound, increases the proportion of Osterix⁺ cells, but the ratio of Osterix⁻ cells remains similar, revealing that the MSC pool is maintained while generating differentiated cells [42]. During Sr treatment, both Wnt3a and Wnt5a were augmented, and the use of Box-5, a Wnt5a antagonist, reversed Sr-mediated downregulation of aPKC and Par3, components of PAR complex. Because the reduction of aPKC and Par3 occurred simultaneously with a diminished asymmetric distribution between Osterix⁺ and Osterix⁻ cells, the role of Wnt5a was

associated with proper asymmetric division. Additionally, Ror2 and Fzd4 were proposed to participate in this axis signaling due to their increase upon Sr treatment [42].

Although many findings support the fact that Wnt5a contributes to osteogenic differentiation, exceptions have been described. For example, in human periodontal ligament-derived stem cells, Wnt5a suppressed the osteogenic differentiation, wherein Ror2 was responsible for triggering the phosphorylation of JNK [43]. This evidence highlights that the cell context influences the action of Wnt5a, and therefore, the relationship between Wnt ligands and the differentiation must be analyzed carefully.

MSCs have been reported to be capable of differentiating into cell types other than mesenchymal, such as neuronal lineage, which could be an alternative treatment for neurodegenerative diseases [44]. In another study, Wnt3a increased neuron and astrocyte markers in BM-MSC induced by β -mercaptoethanol, wherein the levels of RhoA, c-Jun, and Wnt3a were augmented, suggesting a role of non-canonical Wnt/PCP (cell polarity) pathway, but further studies are required because the formation of neurons was not examined [45]. Regarding the neuronal differentiation, Wnt3a increased intracellular calcium levels and, as a consequence, stimulated the active form of CaMKII and Pyk2 (Proline-rich tyrosine kinase 2) in human neural progenitor cells. Worthy of mentioning, Pyk2 negatively regulated the active form of GSK3 β and favored the stabilization of β -catenin [46]. Whether the effect of Pyk2 on β -catenin is through a direct or indirect mechanism remains to be elucidated because Pyk2 can interact with β -catenin to mediate its phosphorylation status [47]. In contrast, downregulation of the canonical Wnt pathway has been described in the presence of Wnt3a during neurogenic differentiation of human embryonic stem cell-derived neural progenitor cells [48]. Furthermore, JNK and ATF2 were required to promote neural precursor specification, acting through CREB, c-Jun, and AP-1 downstream. In contrast, DKK1 did not affect neuronal gene expression, supporting the notion of canonical Wnt-independent mechanisms, which was similar to primary NSC [48]. Therefore, regulating the canonical Wnt pathway in neurogenic differentiation may depend on the stem cells origin.

In a subpopulation of Intestinal Stem Cells (ISCs), the switch from Wnt/ β -catenin pathway to Wnt/PCP pathway activation has been demonstrated, wherein an upregulation of Vangl2, Dvl2, Ror2, and Celsr1 was detected [49]. Wnt/PCP signaling was associated with the lineage priming toward Paneth cells and Enteroendocrine cells through unipotent progenitors, in which JNK activity was implicated, and Fltp (Flatlop) found to be the effector [49].

There is considerable evidence establishing the pivotal role of non-canonical Wnt signaling in embryonic

development, and we focus on Embryonic Stem Cell (ESC) differentiation [50]. Retinoic acid (RA) reduces stem cell marker Lrh-1 (Liver receptor homolog-1) and increases differentiation markers Cyr61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61) and Zic3 (Zinc finger protein family member 5) in ESC. Likewise, increased expression of canonical and non-canonical Wnt ligands, including Wnt3a and Wnt5a, was observed with RA treatment. Meanwhile, the transcriptional reporter activity of β -catenin was repressed, and NFAT activity was stimulated. Thus, RA seems to improve non-canonical Wnt signaling. Interestingly, Tcf3, a typical partner of β -catenin, was localized in promoters of Lrh-1, Sox2, and Oct4 upon RA treatment; thereby, Tcf3 functions dually, either as a transcriptional activator or repressor, according to the cellular context [51].

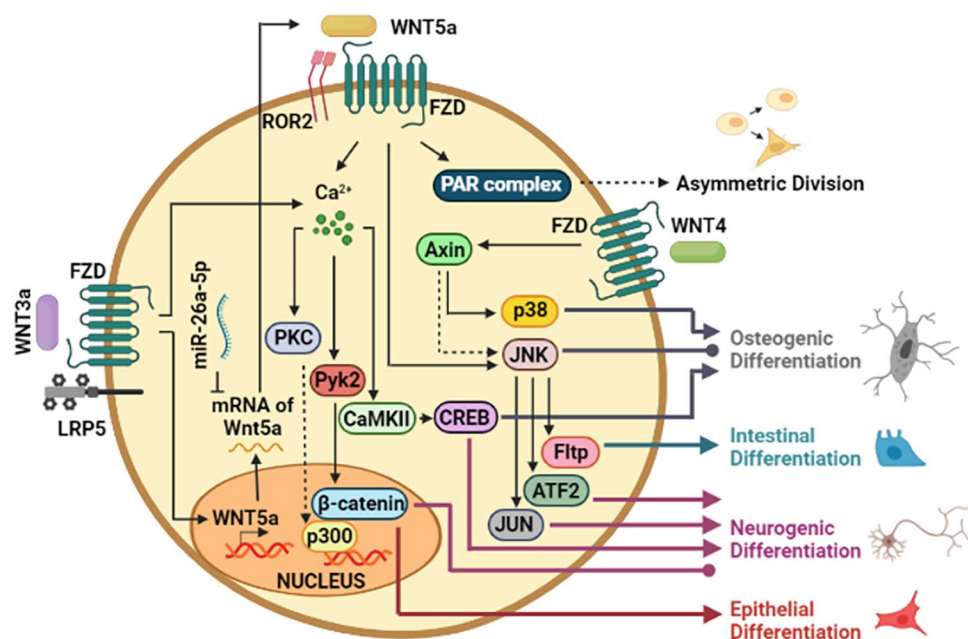
In adult lung epithelial progenitors, the β -catenin/p300 complex is an example in which β -catenin acts together with its interaction partner to drive differentiation toward AT1 cell-like phenotype, wherein components of non-canonical Wnt pathway perform as cooperative effectors [31]. Specifically, Wnt5a promoted the formation of p300/ β -catenin complex through the phosphorylation of p300 at Ser-89, for which PKC ζ was proposed as the possible responsible kinase [31]. Interaction between p300 and β -catenin resulted in being important for the specialization of non-epithelial cells so that it could be similar in other types of differentiation [31].

The study of differentiation has proven to be a complex process since different types of cells can give rise to the same differentiated cell, whether evaluated from molecular markers or functional assays [33]. However, the notion that Wnt signaling contributes to cell specification suggests that other types of differentiation may be dictated by β -catenin-independent mechanisms (Fig. 3).

We are Not Alone in this Universe: Non-Canonical Wnt Pathway in Communicating with the Normal and Cancer Conditions Microenvironment

The interaction between the microenvironment and stem cells is crucial to perform their functions because the cell identity is partially conferred by extrinsic factors, thus defining a specific niche for stem cells [52]. Progress on this issue has been achieved mainly in intestinal crypts, in which the telocytes, an interstitial cell type, are essential to provide Wnt ligands to the niche of ISC. Moreover, the function of telocytes could be shared due to their presence in various epithelial tissues [53]. Several studies have demonstrated the activation of the non-canonical Wnt pathway in niche-forming cells involved in the maintenance of stem

Fig. 3 Differentiation in response to Wnt. In specific stem cells, Wnt3a induces the expression of Wnt5a, in which Wnt5a mRNA can be targeted by miR-26a-5p. Wnt5a increases intracellular calcium levels and JNK activity to regulate downstream targets, including β -catenin. Possible direct interactions between effectors are indicated (dotted line). Positive regulation of differentiation is indicated (arrowhead line). Nevertheless, effectors described as activators and inhibitors of specific lineage are also indicated (round point line). Asymmetric division, as an initial step in differentiation, is dictated by Wnt5a through the function of the PAR complex. The role of other Wnt ligands, such as Wnt4, in osteogenic differentiation is shown



cells [54, 55]. However, in this section, we have focused on the reports that mainly address stem cells.

Components of the extracellular matrix can influence the properties of stem cells, in which, for instance, the limbus promotes the development and maintenance of rLESCs (rabbit Limbal Epithelial Stem Cells). FN (Fibronectin), one component of the limbus, upregulated the expression of Ror1 and Ryk. In fact, FN acting through Wnt11/Fzd7 complex subsequently activates ROCK1 and ROCK2, improving the proliferation of rLESCs [56]. On the other hand, variations in the niche, such as oxygen levels, can affect stemness [68]. In a model of hypoxia to recapitulate the embryonic stage, Wnt5a was augmented in cardiovascular progenitor cells. Concomitantly, an increase in OCT4, SOX2, and NANOG expression was observed, suggesting a relationship between the dedifferentiated state and non-canonical Wnt pathway activation [57].

In addition to encompassing components of the extracellular matrix, the microenvironment involves cellular communication established in a bidirectional way through soluble factors secreted from the stem cells to the surrounding cells and vice-versa [58]. The upregulation of canonical Wnt signaling was found in HFSC (hair follicle stem cells) when cocultured with DPC (Dermal papilla cells). In detail, exosomes from DPCs increased the expression of β -catenin-dependent genes and augmented the proliferation and survival of HFSC, predominantly when Wnt3a was overexpressed [58]. Concerning the non-canonical Wnt pathway, HSC maintenance was partially mediated by Wnt5a secreted from urogenital ridge cells [59].

The maintenance of the stem cell pool must be ensured upon coming out of quiescence, a stage discussed in detail

below, both under normal and regenerative conditions [15]. MuSC (Muscle Stem Cells) and committed myogenic precursors originate from asymmetric apical-basal cell divisions in the muscle [60]. However, it was found that Wnt7a/Fzd7 activates Vangl2 to promote stem cell expansion by symmetric division during muscle regeneration. Wnt7a did not affect TCF7 and Axin2 levels, nor the proliferation or differentiation of primary myoblasts. Interestingly, Vangl2 was absent in quiescent cells but detected along with Prickle1 and Celsr2, both interacting partners, when these cells enter the cell cycle [60]. Vangl2 had polarized localization on opposite poles of daughter cells. Still, the polarized distribution of α 7-integrin suggests a mechanism through planar division by which the adherence to the basal lamina allows permanence in the niche. Meanwhile, cells oriented toward sarcolemma during apical-basal cell division move away from the niche and commit to a progenitor fate [60]. Therefore, the PCP pathway operates as a positional signal relying on the distribution of effector proteins because the absence of Vangl2 led to accelerated differentiation. Lastly, the symmetric division was unaffected by the deletion of Fzd7 in a single myofiber system. Thus, the PCP pathway could be cooperatively activated by other Wnt receptors or components such as Syn4 [60].

The role of progeny as a component of the microenvironment of stem cells is a less explored but fascinating field. Specifically, TACs (Transit Amplifying Cells) were considered a transitory state towards a differentiated lineage. Still, recently TAC was found to be an important element of the niche for stem cells, establishing that the communication between stem cells and their progeny is essential for the preservation of tissues [61]. On the one hand, canonical

Wnt signaling dictates the cell fate of TAC, while on the other hand, TAC-derived Wnt5a activates non-canonical Wnt signaling through Ror2 in MSCs. In addition, MSCs regulate the timing of TACs differentiation through IGF secretion upstream of canonical Wnt signaling. Curiously, a canonical ligand Wnt10a, in addition to Wnt5a, is secreted by TACs, which could disclose an autocrine and paracrine regulation by TACs [62].

In cancer, MSC can be recruited to the tumor and exchange signals with malignant cells [83]. For example, the migratory capacity of breast cancer was stimulated upon treatment with exosomes from MSC, in which β -catenin-mediated transcription was involved [63]. On the other hand, the non-canonical Wnt pathway is relevant to convert non-malignant cells into tumor-supporting cells. LNM-GC (Lymph node metastasis-derived gastric cancer cells) reprogram BM-MSCs, which are recruited to metastatic lesions, to favor lymphangiogenesis and migration of cancer cells [50]. Wnt5a-containing exosomes mediate the reprogramming by activating YAP signaling in MSC. Interestingly, high levels of Wnt5a were identified in LNM-GCs-derived exosomes and serum exosomes of gastric cancer patients with regional LNM [64]. Moreover, MSC acquires the role of chemokine sources such as CXCL12. Once CXCL12 binds to CXCR4 in cancer cells, the levels of β -catenin are augmented, triggering epithelial to mesenchymal transition [65]. According to this idea, Minami's group reported the proliferation of undifferentiated gastric cancer cells in response to secreted CXCL16 from BM-MSCs. Worthy of attention, Ror2 and Wnt5a were necessary for CXCL16 secretion [66].

MSCs are not the only non-malignant cells affected by cancer cells to promote tumor progression since macrophages can acquire a cancer cell migration-stimulating phenotype when exposed to microvesicles (MV) from patients with different cancer types, wherein Wnt5a expression occurs [67]. The phenomenon was corroborated when MV and exosomes from breast cancer cells triggered the expression of Wnt5a in macrophages. In turn, Wnt5a was transported via MV and exosomes to cancer cells, activating AP-1/c-Jun and increasing the invasiveness properties of cancer cells [68].

In regard to CSC, it has been observed that an aggressive cell subpopulation prevails upon the chemotherapeutic treatment (FOLFOX). This effect can be mediated by CAFs (Cancer-associated fibroblasts), which favor the expression of stem cell markers such as CD44V6 in CSC, by stimulating β -catenin-dependent signaling in response to Wnt3a secretion [69]. Furthermore, CAF-derived exosomes containing miR-92a-3p target FBXW7, an antagonist of β -catenin, thus upregulating the canonical Wnt pathway and eliciting stemness-related features such as the expression of CD133, CD44, and OCT4, in addition, to improve sphere-formation

capacity [70]. Remarkably, the transition from somatic fibroblasts to CAFs is augmented by activation of Wnt/ β -catenin signaling caused by Wnt2B released into the exosomes of cancer cells [71]. Concerning the non-canonical Wnt pathway, macrophages induced Wnt2, Wnt5a, Fzd10, and Dvl2 expression in mammary CSC. However, the functional implication remains to be investigated [72].

Expression of Wnt ligands is frequently analyzed in stem cells due to their autocrine action; however, the microenvironment plays a pivotal role as a source of these signals [70]. The complexity of a system where different cells interact and each has a unique expression profile of Wnt ligands has been challenging to understand under normal and pathological conditions. However, it is important to consider that the characteristics of normal and cancer stem cells are based on the communication they establish with their surroundings, both with cellular and non-cellular components, and in which non-canonical Wnt pathways functions are increasingly recognized (Fig. 4).

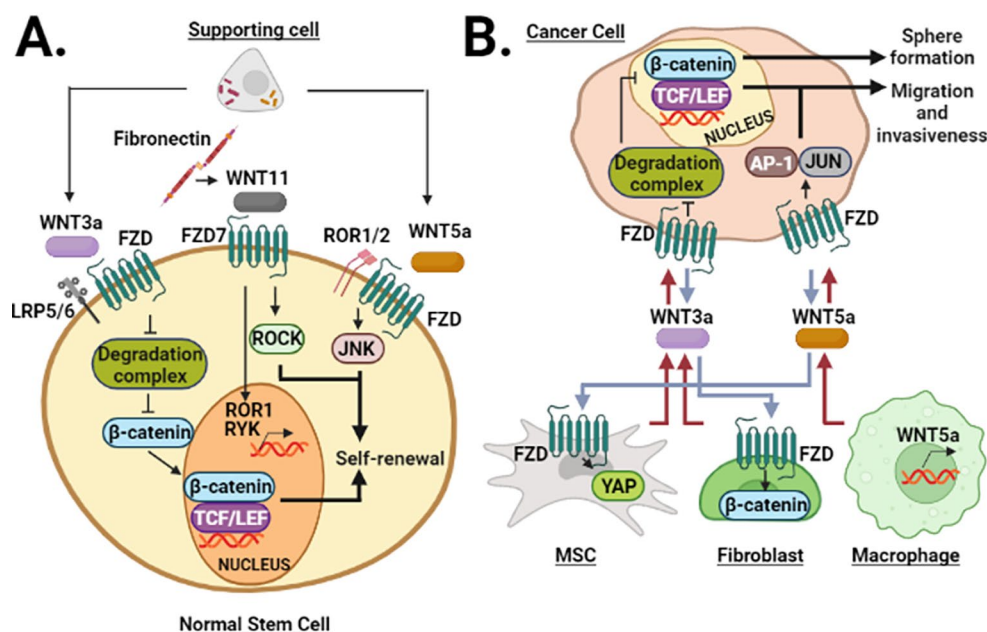
The Virtue of Knowing How to Wait: Non-Canonical Wnt Pathway in the Quiescent State

Quiescence is a crucial trait of stem cells that allows them to long-term persevere and is closely related to the microenvironment [15]. Therefore, this section details the findings regarding the non-canonical Wnt pathway in quiescent stem cells. Spatial positioning is one of the critical characteristics of stem cells in relation to the niche. In the case of neural stem cells (NSC), the location is held by VCAM-1 and N-cadherin, and disruption of these molecules leads to the proliferation of NSC [73, 74]. Cdc42 activity-dependent Wnt5a maintains quiescence of NSC to express N-cadherin, thus allowing both polarity and anchoring to the apical subventricular zone [75].

The coordinated passing between proliferative and quiescent stages of stem cells must be finely balanced to meet the tissue cell turnover requirements [76]. In this regard, the hematopoietic system has allowed us to know in depth about HSCs with high and low proliferation rates, and most of the findings regarding quiescence have been obtained by studying these cells. Highly proliferating cells are the origin of differentiated hematopoietic cells, while low-proliferating cells, also known as dormant cells, replace the function of proliferative HSC when they are lost, either due to damage or disease [77]. Despite several studies exploring the relevance of the canonical Wnt pathway in hematopoiesis, the contrast of the findings reinforces the system's complexity. Apparently, a low activation of the canonical Wnt pathway promotes self-renewal, but a high activity impairs this

Fig. 4 Communication of normal and cancer stem cells with the microenvironment.

(A) Cellular components secrete Wnt3a and Wnt5a to upregulate β -catenin and JNK activities, respectively, allowing for self-renewal. Fibronectin, as an acellular component, depends on Wnt11/FZD7 complex to maintain stem cell proliferation. (B) Secreted Wnt3a and Wnt5a mediate paracrine communication between cancer and normal cells in the tumor, including MSC, fibroblasts, and macrophages. On the one hand, Wnt ligands transform non-malignant cells into protumoral components while stimulating migration and invasiveness in cancer cells, as well as CSC-associated capabilities, such as sphere formation



process and prevents terminal differentiation [77]. Quiescence in HSC has been attributed as a response to the secretion of non-canonical Wnt ligands: Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, and Wnt11 by N-cad⁺ osteoblasts in bone marrow [78].

It was reported that a subpopulation of HSC (LSK corresponding to Lin-Scal+Kit+ cells) expressing the non-canonical co-receptor Ryk are quiescent cells [79]. Ryk partially contributed to Wnt5a-induced quiescence and hematopoietic repopulation, and even the proportion of RYK⁺ cells diminished when HSC became multipotent progenitors. Interestingly, upon treatment with 5-fluorouracil (5-FU), an antitumor compound, Ryk⁺ HSC went into quiescence; meanwhile, RYK⁻ HSC came out. Because non-Wnt ligands for Ryk have not been described, and since the proliferation of HSC LSK by Wnt5a is disrupted, Ryk seems to be dependent on Wnt5a. Moreover, low levels of ROS were linked to Wnt5a treatment, repopulation capacity, and Ryk expression, thus emerging as an indicator of quiescence in HSC [80].

Another report found that the mode of action of Wnt5a depends on Fzd8 and Fmi to sustain the quiescent state of long-term HSC (LT-HSC). Exhaustively, Wnt5a/Fzd8 axis maintains low levels of intracellular calcium and nuclear NFAT in quiescent LT-HSC. The results denoted two possible but not mutually exclusive mechanisms: the first encompasses LTCC (L-type calcium channel), and the second involves the release of NFAT from the Cdc42/Pak1/CK1 α complex [81]. Remarkably, the absence of Fzd8 stimulated the AKT-dependent phosphorylation form of β -catenin, indicating the downregulation of canonical Wnt signaling in quiescent LT-HSC. The enrichment of Fzd8 and Fmi between HSC and supportive cells was necessary to

suppress nuclear NFAT, emphasizing the role of the niche in the homeostasis of HSC. Additionally, 5FU caused quiescent HSC to proliferate through the de-repression of the concomitantly canonical Wnt pathway and NFAT/calcium axis [81]. In NSC, the demyelination injury inactivates the non-canonical Wnt/Cdc42 axis to activate the canonical Wnt/ β -catenin pathway, expanding the stem cell pool. This evidence corroborates the switch signaling during the transition from dormancy to reentry into the cell cycle. In the case of NSC, Wnt5a-mediated expression of Notch1 suggests it as a possible regulator of self-renewal during the quiescent state [75].

In adult muscle fibers, conditional deletion of Wnt4 demonstrated its role as a paracrine-acting niche factor, contributing to the quiescence of stem cells [47]. Interestingly, many SCs from the Wnt4-overexpressing niche remained quiescent despite exposure to mitogen stimulation. Deletion of Wnt4 in the niche did not affect canonical Wnt signaling in quiescent SCs. Nevertheless, upregulation of the phosphorylated forms of MLC (Myosin Light Chain) and FAK (Focal Adhesion Kinase), relevant to actomyosin assembly and focal adhesions, respectively, depended on Wnt4. Moreover, RhoA and ROCK contributed to maintaining the quiescence and localization of SCs within the niche. Noteworthy, the deletion of mechano-transducer YAP (Yes-Associated Protein) restored the dormancy of SC when RhoA was absent [82]. Although the function of YAP as a negative regulator of quiescence was observed, further studies are necessary because the lack of an active form of YAP has been found to improve SC proliferation [83].

There are quiescent and actively proliferating stem cells, and the transition between both states must be finely

regulated by exogenous factors that dictate whether tissue conditions require stem cells to multiply. Within these factors, Wnt ligands, being communicators between cells, have been shown to participate [15]. Strikingly, the non-canonical Wnt pathways are relevant in maintaining the quiescent state, which is complicated to ascertain, because it can take up to years to remain in this way (Fig. 5).

Time does not Stand Still: Non-Canonical Wnt Pathway as Clockwork in Senescence

The advancement of knowledge has revealed that stem cells undergo aging due to their perpetuity, which can lead to senescence. In this way, stem cell dysfunction impairs the regenerative capacity of tissues [84]. In hematopoiesis, the transition from canonical to non-canonical Wnt signaling occurs from the embryonic to the adult stage and during aging [78]. Levels of Wnt5a and Wnt4 mRNAs are higher in older than in young HSC. In aged HSC, Wnt5a was mainly localized within the cytoplasm, similar to β -catenin. Concomitantly, Cdc42 activity is triggered and associated with apolarity for Cdc42 and α -tubulin in aged HSC. In contrast, young HSC upregulated p57 and p27, markers of senescence, in response to Wnt5a, possibly by the rise of intracellular calcium and activity of CamKII and NFATc1.

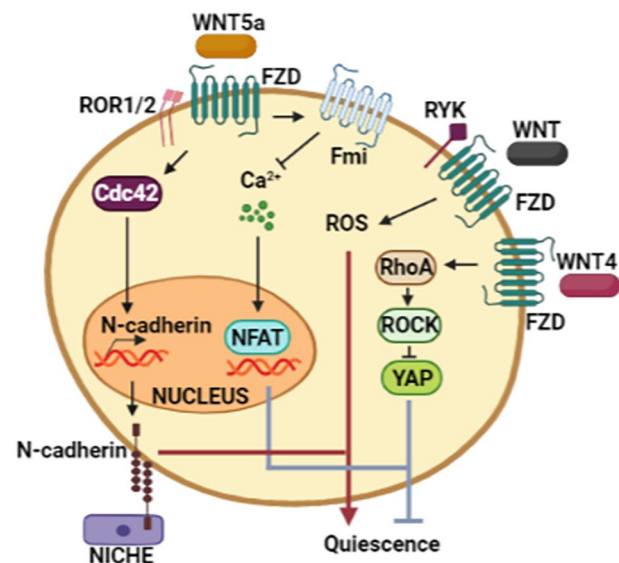


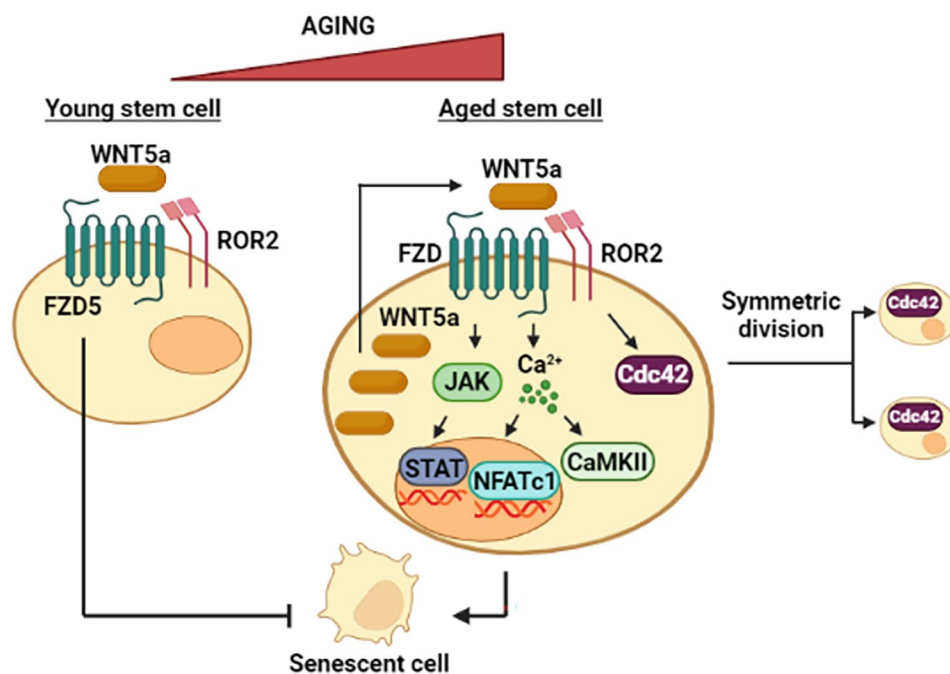
Fig. 5 Relationship between the quiescent state and non-canonical Wnt pathways. Wnt5a maintains stem cells quiescence through two mechanisms. First, the upregulation of Cdc42 increases the expression of N-cadherin, which enables to keep the anchorage in the niche. Second, the reduction of intracellular Calcium-mediated by Fmi, which leads to restraining the activity of NFAT, a repressor of quiescence in HSC. Furthermore, low ROS levels are related to the quiescence state. For its part, Wnt4 activates the signaling module formed by RhoA/ROCK/YAP to augment the proliferation

Meanwhile, the downregulation of Wnt5a rejuvenated aged HSC [84]. A similar phenomenon was observed in HFSC, within which Wnt5a/Cdc42 axis was activated during the aging. In aged HFSC, a reduction in the capacity of forming colonies accompanied by low levels of nuclear β -catenin and a less polar distribution of Cdc42 were described [85]. Also, the pattern of cell division is dictated by aging, being that young HSC carries it out asymmetrically, implicating differential segregation of Cdc42 into daughter cells, while aged HSC divides symmetrically. CASIN, an inhibitor of Cdc42, increased the frequency of asymmetric divisions, while Wnt5a increased symmetric divisions. Interestingly, old HSC were found in cell clusters, which could serve as niches for other HSC, while young HSC were identified as single cells. Finally, the polarity is closely related to cell division, where polar HSC undergoes asymmetric divisions and declines upon aging, while apolar HSC divides symmetrically [86].

The presence of Wnt5a as indicative of senescent cells was demonstrated in Tendon stem/progenitor cells (TSPCs). The levels of Wnt5a augmented as TSPCs enter age-related senescence [87]. In contrast, the knockdown of Wnt5a diminished senescence. In aged TSPC, the non-canonical receptor Ror2 recognizes Wnt5a, and JAK-STAT signaling acts as the mediator of the Wnt signal. For its part, β -catenin relocates from the nucleus to the cytoplasm when TSPCs age, demonstrating a switch from canonical to non-canonical Wnt signaling in these cells [87].

It is important to explain that the positive relationship between the non-canonical Wnt pathways and senescence is not yet definitive since reports are scarce. In contrast, MSC is an example of an opposite association [85–87]. The heterogeneity of MSC has allowed the identification of REC (Rapidly expanding clones), MEC (Moderately expanding clones) and SEC (Slowly expanding clones). The findings demonstrated that the Wnt5a/Fzd5/Ror2 axis was essential to maintain a high proliferation rate in REC. Additionally, senescence-related genes were upregulated, and non-canonical Wnt-associated genes, such as AP1, PLCB1, SDC1, PRKACA, and PRKCA, were downregulated upon Fzd5 knockdown. In contrast, Fzd5 overexpression inhibited senescence, demonstrating the importance of Wnt signaling for REC. Noteworthy, REC displayed c-JUN phosphorylation compared to MEC and SEC and responded to Wnt5a by activating RAC and CDC42, validating that REC is a different cell subpopulation [88]. Therefore, the phenomenon of an exacerbated activation of Wnt5a signaling that leads to senescence may not occur in each type of cell since it probably depends on the cell lineage's characteristics, including the proliferation rate (Fig. 6).

Fig. 6 Dual role of Wnt5a in senescence. Wnt5a restricts entry into senescence, in which the FZD5 receptor was identified. However, high levels of intracellular Wnt5a are found in senescent cells. Specifically, JAK/STAT and Calcium/CamKII/NFATc1 are signaling axes that act downstream of Wnt5a in these cells. Cdc42, besides to respond to Wnt5a, is linked to symmetric divisions according to its distribution in the daughter cells



Stem Mask: Non-Canonical Wnt Pathway in Cancer Stem Cells

Tumors are characterized by cellular heterogeneity, within which some cells exhibit molecular and functional features of normal stem cells, like the self-renewal capacity and the ability to differentiate into specific cell lineages, but are also tumor-initiating cells. For this reason, the term CSC has been widely employed to refer to these cells [88]. Therefore, CSCs serve as the origin of the bulk of the rest of cancer cells.

Canonical Wnt pathways have been demonstrated to be important in CSCs of prostate cancer, wherein β -catenin nuclear in response to Wnt3a stimulated the size and proportion of spheres generated [89]. Furthermore, spheres of CSC obtained from glioblastoma cell lines maintain an undifferentiated state upon combined treatment with Wnt3a and Rspo2, stimulating β -catenin activity, which correlated with a higher tumorigenic capacity [90]. Similarly, Wnt3a and Rspo1 upregulated canonical Wnt target genes and stemness-related genes in hepatocellular carcinoma cells, an effect promoted by LGR5 overexpression [91]. Regarding the β -catenin-independent mechanisms, depletion of VANGL2 impaired spheres and increased differentiation markers in cells obtained from rhabdomyosarcoma [92]. VANGL2⁺ cells were enriched in the expression of FGFR3 and CD133, progenitor-related genes. The constitutively active form of RhoA reversed the effect by the absence of VANGL2. Meanwhile, activation of RAC1 had no effect, indicating that RhoA acts downstream of VANGL2 to

sustain an undifferentiated state [92]. Activation of RhoA by Wnt5a serves as a survival stimulus in cancer cells during non-adherent conditions due to evasion of anoikis. In IGC (Intestinal-type gastric cancer) organoids, Wnt5a increased sphere formation, wherein Rho activity was required in the absence of Cadherin 1. Noteworthy, Cxcr4⁺ ILCs (Innate Lymphoid Cells) produced Wnt5a to favor the progression of DGC (Diffuse-type gastric cancer), revealing the contribution of the microenvironment [93].

As mentioned before, it was shown recently that Wnt3a and Wnt5a stimulate sphere formation in colorectal CSCs in a β -catenin-independent transcriptional activity [24]. Interestingly, the spheres-derived cells mobilized calcium in response to both Wnt ligands and pointed out Wnt/calcium signaling as an essential pathway to induce and maintain the self-renewal capacity of colon CSCs. In fact, the inhibition of phospholipase C and NFAT impaired the self-renewal in this model [24].

Another characteristic of CSC, also named TPC (Tumor-promoting stem-like cells), is the migratory phenotype to invade distant tissues, which is closely related to the aggressiveness of cancer. Xenografts of TPC obtained from glioblastoma patients exhibited invasive cells, which retained their stemness identity by maintaining the ability to form neurospheres. However, the major invasiveness was abolished by the inhibition of Wnt5a/PKC/Ca²⁺ signaling [80]. In glioblastoma, CD133 is a molecular marker for CSC. In fact, only 100 CD133⁺ cells are required to induce an invasive tumor development in vivo [94]. When comparing CD133⁺ and CD133⁻ cells, it was found that both

canonical and non-canonical Wnt pathway components were expressed mainly in CD133⁺ cells, specifically RHOA, ROCK2, RAC2, and DAAM1 [95]. Accordingly, reports found impaired glioma sphere formation when RAC was inhibited [96].

Another feature related to CSC is their high capacity to efflux cytotoxic compounds, important to display chemoresistance, and frequently referred to as “side population” (SP). The percentage of SP was augmented when Wnt5a was overexpressed in nasopharyngeal cancer cells, and high rates of CD44⁺CD24⁻ cells, immunophenotype associated with CSC in some types of cancer, were detected [97]. In detail, Wnt5a increased the phosphorylation state of PKC, which in turn triggers positive feedback, upregulating Wnt5a protein levels without affecting nuclear β -catenin. In contrast, the tumorigenic potential was diminished when Wnt5a was knocked down [97].

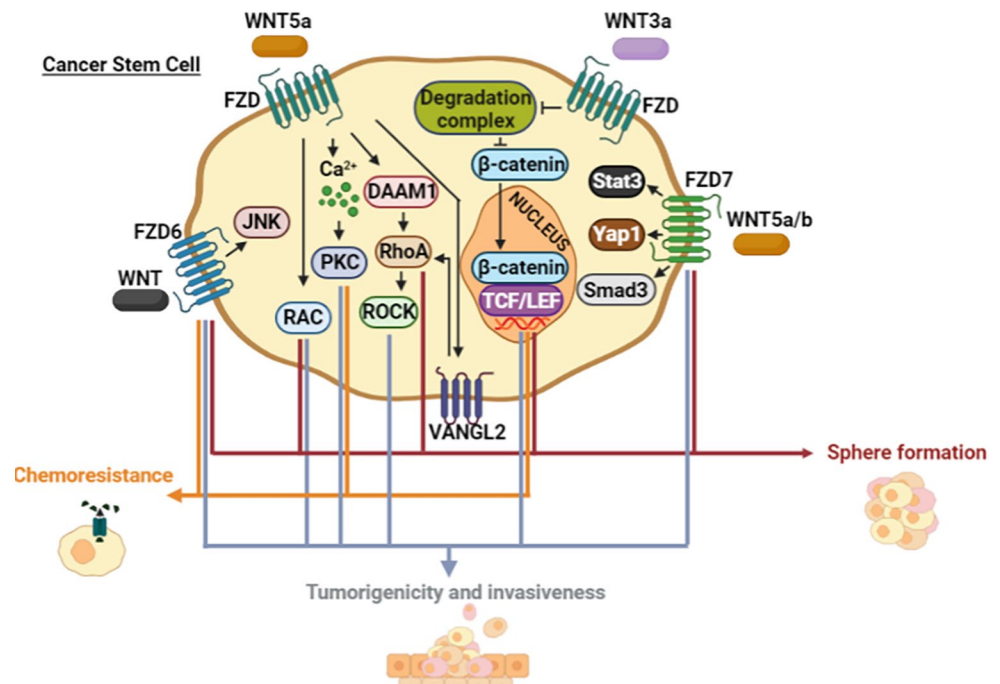
The presence of Fzd receptors makes it possible to distinguish the involvement of Wnt pathways within the heterogeneity in tumor cells. For instance, Fzd7 expression correlated with stemness-related genes (CD44, LGR5, NOTCH2, EGFR, IL6, TNC, ANTXR1) in breast cancer [98]. Moreover, a positive correlation of Fzd7 and Wnt5b was found in cell lines and tissues of the same type of cancer. Functionally, levels of Fzd7 were directly proportional to the mammosphere formation capacity of breast cancer cell lines. Furthermore, Fzd7 interacted with Wnt5a/b, regulating the expression of surface markers such as Lgr5 and CD44, and stimulating the signaling effectors Smad3, Yap1, and Stat3. Nonetheless, it remains to be known in which

processes of the CSC these effectors participate and how they regulate each other [98].

Fzd6 is another example of the relationship between Fzd family members and CSCs. A Fzd6⁺ cell subpopulation of human neuroblastoma-derived cells was identified with the potential to form neurospheres more efficiently and invasively when compared to cells lacking Fzd6 [99]. Fzd6⁺ cells expressed both canonical and non-canonical Wnt-related genes: MYC, CD44, CyclinD1, Twist, and TH (Tyrosine hydroxylase). Furthermore, FZD6⁺ cells were resistant to doxorubicin and exhibited a significant capacity for tumorigenicity and metastasis. Remarkably, the phosphorylated form of JNK was enriched in FZD6⁺ cells. Besides, the knockdown of Fzd6 decreased neurosphere formation and gene expression of CD44 and TH without affecting canonical Wnt targets MYC and Cyclin D1 [99]. It might be interesting to know the implications of Fzd6 in other cell types, such as Leukemic Stem Cells from CLL (Chronic Lymphocytic Leukemia), which also express this same receptor [100].

Exploring in-depth non-canonical Wnt pathways will allow us to know even more about altered biological processes (Fig. 7). Although cancer has been intensively explored, other health disorders are seen to be related to the functionality of these mechanisms, glimpsing its implications and possible applications in the medical field.

Fig. 7 Wnt signaling in CSC. Wnt3a and Wnt5a improve CSC-associated features, including chemoresistance, sphere formation, invasiveness, and tumorigenicity. Non-canonical Wnt pathways encompass increased intracellular calcium and GTPases activity. VANGL2 can act as an intermediary between Wnt5a/FZD and RhoA. FZD6 and FZD7 are reported to activate β -catenin-independent mechanisms and promote CSC functionality



Conclusions

The field of stem cell research has been expanded in recent years. During this journey, we have learned the essential roles of canonical Wnt signaling in normal and cancer stem cells. However, exploring the non-canonical Wnt pathways in stem cell biology under health and disease has taken more effort to understand its importance. Although it is well known that non-canonical Wnts regulate cell polarity, repress canonical Wnt signaling, and promote an aggressive CSC phenotype, only recently has it been demonstrated that non-canonical Wnt/calci- um cascade exhibit a crucial function in inducing and maintaining the self-renewal capacity of CSCs [24].

Searching the non-canonical Wnt pathways, along with activation or inhibition of the canonical Wnt pathways, is a more comprehensive step towards understanding the global role of Wnt signaling in stem cells under conditions of health and disease. Finally, recognizing the relevance of both canonical and non-canonical Wnt signaling as a whole and as the foundation of stem-like cells in cancer could lead us to consider new strategies to fight against this disease.

Acknowledgements Miguel Angel Sarabia-Sánchez is a Ph.D. student in the Program “Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)”, and was granted with a Fellowship by CONACYT, CVU 550337.

Author Contribution All authors contributed to the study conception and approved it for publication. Specifically, their contributions were: Conceptualization, investigation: MASS and MRF. Figure design and writing: MASS. Manuscript editing: MRF. The first draft of the manuscript was written by MASS and the final writing and editing was performed by MRF.

Funding This research was supported by grants from Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM IN229420 and IV200220).

Data Availability Within the article.

Declarations

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

1. Clevers, H., Loh, K. M., & Nusse, R. (2014). An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*, 346(6205), 1248012. <https://doi.org/10.1126/science.1248012>.
2. Whyte, J. L., Smith, A. A., & Helms, J. A. (2012). Wnt signaling and Injury Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(8), a008078–a008078. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008078>.
3. Barker, N., Huch, M., Kujala, P., Van De Wetering, M., Snip- pert, H. J., Van Es, J. H., & Clevers, H. (2010). Lgr5 + ve stem cells drive Self-Renewal in the stomach and build long-lived gastric units in Vitro. *Cell Stem Cell*, 6(1), 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.11.013>.
4. Li, L., & Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*, 327(5965), 542–545. <https://doi.org/10.1126/science.1180794>.
5. Meng, L., Yang, P., Zhang, W., Zhang, X., Rong, X., Liu, H., & Li, M. (2023). Brain-derived neurotrophic factor promotes ortho- dontic tooth movement by alleviating periodontal ligament stem cell senescence. *Cellular Signalling*, 108, 110724. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2023.110724>.
6. Clevers, H. (2013). The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment. *Cell*, 154(2), 274–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.004>.
7. Flores-Hernández, E., Velázquez, D. M., Castañeda-Patlán, M. C., Fuentes-García, G., Fonseca-Camarillo, G., Yamamoto- Furusho, J. K., & Robles-Flores, M. (2020). Canonical and non- canonical wnt signaling are simultaneously activated by wnts in colon cancer cells. *Cellular Signalling*, 72, 109636. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109636>.
8. Niehrs, C. (2012). The complex world of WNT receptor signal- ing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(12), 767–779. <https://doi.org/10.1038/nrm3470>.
9. Asem, M., Buechler, S., Wates, R., Miller, D., & Stack, M. (2016). Wnt5a Signaling in Cancer. *Cancers*, 8(9), 79. <https://doi.org/10.3390/cancers8090079>.
10. Chen, Y., Chen, Z., Tang, Y., & Xiao, Q. (2021). The involve- ment of noncanonical wnt signaling in cancers. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, 110946. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110946>.
11. Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 36(11), 1461–1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>.
12. Weeraratna, A. T., Jiang, Y., Hostetter, G., Rosenblatt, K., Duray, P., Bittner, M., & Trent, J. M. (2002). Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic mela- noma. *Cancer Cell*, 1(3), 279–288. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00045-4).
13. Taciak, B., Pruszynska, I., Kiraga, L., Bialasek, M., & Krol, M. (2018). Wnt signaling pathway in development and cancer. *Journal of Physiology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.2.07>.
14. Dai, Y., Liu, J., Li, X., Deng, J., Zeng, C., Lu, W., & Liu, Q. (2023). Let-7b-5p inhibits colon cancer progression by prohib- iting APC ubiquitination degradation and the wnt pathway by targeting NKD1. *Cancer Science*, 114(5), 1882–1897. <https://doi.org/10.1111/cas.15678>.
15. Lu, Y., Liu, M., Guo, X., Wang, P., Zeng, F., Wang, H., & Tao, T. (2023). miR-26a-5p alleviates CFA-induced chronic inflam- matory hyperalgesia through Wnt5a/CaMKII/NFAT signaling in mice. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 29(5), 1254–1271. <https://doi.org/10.1111/cns.14099>.
16. Grumolato, L., Liu, G., Mong, P., Mudbhary, R., Biswas, R., Arroyave, R., & Aaronson, S. A. (2010). Canonical and

- noncanonical wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes & Development*, 24(22), 2517–2530. <https://doi.org/10.1101/gad.1957710>.
17. Katoh, M. (2017). Canonical and non-canonical WNT signaling in cancer stem cells and their niches: Cellular heterogeneity, omics reprogramming, targeted therapy and tumor plasticity (review). *International Journal of Oncology*, 51(5), 1357–1369. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4129>.
 18. Eaves, C. J. (2015). Hematopoietic stem cells: Concepts, definitions, and the new reality. *Blood*, 125(17), 2605–2613. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-570200>.
 19. Van Den Berg, D. J., Sharma, A. K., Bruno, E., & Hoffman, R. (1998). Role of members of the wnt gene family in human hematopoiesis. *Blood*, 92(9), 3189–3202. <https://doi.org/10.1182/blood.V92.9.3189>.
 20. Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., & Weissman, I. L. (2003). A role for wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423(6938), 409–414. <https://doi.org/10.1038/nature01593>.
 21. Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., & Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423(6938), 448–452. <https://doi.org/10.1038/nature01611>.
 22. Cobas, M., Wilson, A., Ernst, B., Mancini, S. J. C., MacDonald, H. R., Kemler, R., & Radtke, F. (2004). β -Catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *Journal of Experimental Medicine*, 199(2), 221–229. <https://doi.org/10.1084/jem.20031615>.
 23. Scheller, M., Huelsken, J., Rosenbauer, F., Taketo, M. M., Birchmeier, W., Tenen, D. G., & Leutz, A. (2006). Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive β -catenin activation. *Nature Immunology*, 7(10), 1037–1047. <https://doi.org/10.1038/ni1387>.
 24. Sarabia-Sánchez, M. A., Moreno-Londoño, A. P., Castañeda-Patlán, M. C., Alvarado-Ortiz, E., Martínez-Morales, J. C., & Robles-Flores, M. (2023). Non-canonical Wnt/Ca2 + signaling is essential to promote self-renewal and proliferation in colon cancer stem cells. *Frontiers in Oncology*, 13, 1121787. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1121787>.
 25. Cherubini, A., Barilani, M., Rossi, R. L., Jalal, M. M. K., Rusconi, F., Buono, G., & Lazzari, L. (2019). FOXP1 circular RNA sustains mesenchymal stem cell identity via microRNA inhibition. *Nucleic Acids Research*, 47(10), 5325–5340. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz199>.
 26. Kalani, M. Y. S., Cheshier, S. H., Cord, B. J., Bababeygy, S. R., Vogel, H., Weissman, I. L., & Nusse, R. (2008). Wnt-mediated self-renewal of neural stem/progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(44), 16970–16975. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808616105>.
 27. Many, A. M., & Brown, A. M. C. (2014). Both canonical and non-canonical wnt signaling independently promote stem cell growth in Mammospheres. *Plos One*, 9(7), e101800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101800>.
 28. Murdoch, B., Chadwick, K., Martin, M., Shojaei, F., Shah, K. V., Gallacher, L., & Bhatia, M. (2003). Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(6), 3422–3427. <https://doi.org/10.1073/pnas.0130233100>.
 29. Nemeth, M. J., Topol, L., Anderson, S. M., Yang, Y., & Bodine, D. M. (2007). Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15436–15441. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704747104>.
 30. Chang, J., Sonoyama, W., Wang, Z., Jin, Q., Zhang, C., Krebsbach, P. H., & Wang, C. Y. (2007). Noncanonical Wnt-4 signaling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in Craniofacial defects through activation of p38 MAPK. *Journal of Biological Chemistry*, 282(42), 30938–30948. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702391200>.
 31. Rieger, M. E., Zhou, B., Solomon, N., Sunohara, M., Li, C., Nguyen, C., & Borok, Z. (2016). p300/ β -Catenin interactions regulate adult progenitor cell differentiation downstream of WNT5a/Protein kinase C (PKC). *The Journal of Biological Chemistry*, 291(12), 6569–6582. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.706416>.
 32. Scheel, C., Eaton, E. N., Li, S. H. J., Chaffer, C. L., Reinhardt, F., Kah, K. J., & Weinberg, R. A. (2011). Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and Stem Cell States in the breast. *Cell*, 145(6), 926–940. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.029>.
 33. De la Fuente-Hernandez, M. A., Sarabia-Sanchez, M. A., Melendez-Zajgla, J., & Maldonado-Lagunas, V. (2022). lncRNAs in mesenchymal differentiation. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, 322(3), C421–C460. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00364.2021>.
 34. Soltanoff, C. S., Yang, S., Chen, W., & Li, Y. P. (2009). Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 19(1), 1–46. <https://doi.org/10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v19.i1.10>.
 35. Qiu, W., Chen, L., & Kassem, M. (2011). Activation of non-canonical Wnt/JNK pathway by Wnt3a is associated with differentiation fate determination of human bone marrow stromal (mesenchymal) stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413(1), 98–104. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.08.061>.
 36. Liu, X., Chen, W., Zhou, Y., Tang, K., & Zhang, J. (2015). Mechanical tension promotes the osteogenic differentiation of rat tendon-derived stem cells through the Wnt5a/Wnt5b/JNK signaling pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(2), 517–530. <https://doi.org/10.1159/000430117>.
 37. Luo, W., Ng, W. W., Jin, L. H., Ye, Z., Han, J., & Lin, S. C. (2003). Axin utilizes distinct regions for competitive MEKK1 and MEKK4 binding and JNK activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37451–37458. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305277200>.
 38. Li, S., Hu, C., Li, J., Liu, L., Jing, W., Tang, W., & Long, J. (2016). Effect of miR-26a-5p on the Wnt/Ca2 + pathway and osteogenic differentiation of mouse adipose-derived mesenchymal stem cells. *Calcified Tissue International*, 99(2), 174–186. <https://doi.org/10.1007/s00223-016-0137-3>.
 39. De Boer, J., Wang, H. J., & Van Blitterswijk, C. (2004). Effects of wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering*, 10(3–4), 393–401. <https://doi.org/10.1089/107632704323061753>.
 40. Li, X., Liu, P., Liu, W., Maye, P., Zhang, J., Zhang, Y., & Wu, D. (2005). Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. *Nature Genetics*, 37(9), 945–952. <https://doi.org/10.1038/ng1614>.
 41. Mayer, I. M., Hoelbl-Kovacic, A., Sexl, V., & Doma, E. (2022). Isolation, maintenance and expansion of adult hematopoietic Stem/Progenitor cells and leukemic stem cells. *Cancers*, 14(7), 1723. <https://doi.org/10.3390/cancers14071723>.
 42. Li, Y., Yue, J., Liu, Y., Wu, J., Guan, M., Chen, D., & Lu, W. W. (2021). Strontium regulates stem cell fate during osteogenic differentiation through asymmetric cell division. *Acta Biomaterialia*, 119, 432–443. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.10.030>.
 43. Hasegawa, D., Wada, N., Yoshida, S., Mitarai, H., Arima, M., Tomokiyo, A., & Maeda, H. (2018). Wnt5a suppresses osteoblastic differentiation of human periodontal ligament stem cell-like cells via Ror2/JNK signaling. *Journal of Cellular Physiology*, 233(2), 1752–1762. <https://doi.org/10.1002/jcp.26086>.

44. Phinney, D. G., & Prockop, D. J. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*, 25(11), 2896–2902. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0637>.
45. Yao, P., Yu, Q., Zhu, L., Li, J., Zhou, X., Wu, L., & Zhou, L. (2022). Wnt/PCP pathway regulates the migration and neural differentiation of mesenchymal stem cells in vitro. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 60(1), 44–54. <https://doi.org/10.5603/FHC.a2022.0006>.
46. Narendra Talabattula, V. A., Morgan, P., Frech, M. J., Uhrmacher, A. M., Herchenröder, O., Pützer, B. M., & Luo, J. (2017). Non-canonical pathway induced by Wnt3a regulates β -catenin via Pyk2 in differentiating human neural progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.030>.
47. Otero, K., Turnbull, I. R., Poliani, P. L., Vermi, W., Cerutti, E., Aoshi, T., & Colonna, M. (2009). Macrophage colony-stimulating factor induces the proliferation and survival of macrophages via a pathway involving DAP12 and β -catenin. *Nature Immunology*, 10(7), 734–743. <https://doi.org/10.1038/ni.1744>.
48. Bengoa-Vergniory, N., Gorroño-Etxebarria, I., González-Salazar, I., & Kypka, R. M. (2014). A switch from canonical to non-canonical wnt signaling mediates early differentiation of human neural stem cells. *Stem Cells*, 32(12), 3196–3208. <https://doi.org/10.1002/stem.1807>.
49. Böttcher, A., Büttner, M., Tritschler, S., Sterr, M., Aliluev, A., Oppenländer, L., & Lickert, H. (2021). Non-canonical Wnt/PCP signalling regulates intestinal stem cell lineage priming towards enteroendocrine and paneth cell fates. *Nature Cell Biology*, 23(1), 23–31. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-00617-2>.
50. De, A. (2011). Wnt/Calcium signaling pathway: A brief overview. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(10), 745–756. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmr079>.
51. Osei-Sarfo, K., & Gudas, L. J. (2014). Retinoic acid suppresses the canonical wnt signaling pathway in embryonic stem cells and activates the noncanonical wnt signaling pathway. *Stem Cells*, 32(8), 2061–2071. <https://doi.org/10.1002/stem.1706>.
52. Sun, X., Lv, X., Yan, Y., Zhao, Y., Ma, R., He, M., & Wei, M. (2020). Hypoxia-mediated cancer stem cell resistance and targeted therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110623. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110623>.
53. Mittermeier, L., & Virshup, D. M. (2022). An itch for things remote: The journey of Wnts. In *Current Topics in Developmental Biology* (Vol. 150, pp. 91–128). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2022.03.007>.
54. Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destree, O., Kielman, M., & Clevers, H. (2005). Expression pattern of wnt Signaling Components in the adult intestine. *Gastroenterology*, 129(2), 626–638. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.06.007>.
55. Upadhyay, M., Kuna, M., Tudor, S., Martono Cortez, Y., & Rangan, P. (2018). A switch in the mode of wnt signaling orchestrates the formation of germline stem cell differentiation niche in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, 14(1), e1007154. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007154>.
56. Zheng, M., Tian, C., Fan, T., & Xu, B. (2019). Fibronectin regulates the self-renewal of rabbit limbal epithelial stem cells by stimulating the Wnt11/Fzd7/ROCK non-canonical wnt pathway. *Experimental Eye Research*, 185, 107681. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.05.021>.
57. Knox, C., Camberos, V., Ceja, L., Monteon, A., Hughes, L., Longo, L., & Kearns-Jonker, M. (2021). Long-term Hypoxia maintains a state of dedifferentiation and enhanced stemness in fetal Cardiovascular Progenitor cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17), 9382. <https://doi.org/10.3390/ijms22179382>.
58. Li, J., Zhao, B., Dai, Y., Zhang, X., Chen, Y., & Wu, X. (2022). Exosomes Derived from Dermal Papilla Cells Mediate Hair Follicle Stem Cell Proliferation through the Wnt3a/ β -Catenin Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 9042345. <https://doi.org/10.1155/2022/9042345>.
59. Buckley, S. M., Ulloa-Montoya, F., Abts, D., Oostendorp, R. A. J., Dzierzak, E., Ekker, S. C., & Verfaillie, C. M. (2011). Maintenance of HSC by Wnt5a secreting AGM-derived stromal cell line. *Experimental Hematology*, 39(1), 114–123e5. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2010.09.010>.
60. Le Grand, F., Jones, A. E., Seale, V., Scimè, A., & Rudnicki, M. A. (2009). Wnt7a activates the Planar Cell Polarity Pathway to drive the symmetric expansion of Satellite Stem cells. *Cell Stem Cell*, 4(6), 535–547. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.03.013>.
61. Louis, I., Heinonen, K. M., Chagraoui, J., Vainio, S., Sauvageau, G., & Perreault, C. (2008). The signaling protein Wnt4 enhances thymopoiesis and expands multipotent hematopoietic progenitors through β -Catenin-independent signaling. *Immunity*, 29(1), 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.04.023>.
62. Jing, J., Feng, J., Li, J., Zhao, H., Ho, T.-V., He, J., & Chai, Y. (2021). Reciprocal interaction between mesenchymal stem cells and transit amplifying cells regulates tissue homeostasis. *eLife*, 10, e59459. <https://doi.org/10.7554/eLife.59459>.
63. Lin, R., Wang, S., & Zhao, R. C. (2013). Exosomes from human adipose-derived mesenchymal stem cells promote migration through wnt signaling pathway in a breast cancer cell model. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 383(1–2), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1746-z>.
64. Wang, M., Zhao, X., Qiu, R., Gong, Z., Huang, F., Yu, W., & Xu, W. (2021). Lymph node metastasis-derived gastric cancer cells educate bone marrow-derived mesenchymal stem cells via YAP signaling activation by exosomal Wnt5a. *Oncogene*, 40(12), 2296–2308. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01722-8>.
65. Jung, Y., Kim, J. K., Shiozawa, Y., Wang, J., Mishra, A., Joseph, J., & Taichman, R. S. (2013). Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nature Communications*, 4(1), 1795. <https://doi.org/10.1038/ncomms2766>.
66. Takiguchi, G., Nishita, M., Kurita, K., Kakeji, Y., & Minami, Y. (2016). Wnt5a-Ror2 signaling in mesenchymal stem cells promotes proliferation of gastric cancer cells by activating CXCL16–CXCR6 axis. *Cancer Science*, 107(3), 290–297. <https://doi.org/10.1111/cas.12871>.
67. Menck, K., Bleckmann, A., Wachter, A., Hennies, B., Ries, L., Schulz, M., & Binder, C. (2017). Characterisation of tumour-derived microvesicles in cancer patients' blood and correlation with clinical outcome. *Journal of Extracellular Vesicles*, 6(1), 1340745. <https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1340745>.
68. Menck, K., Klemm, F., Gross, J. C., Pukrop, T., Wenzel, D., & Binder, C. (2013). Induction and transport of wnt 5a during macrophage-induced malignant invasion is mediated by two types of extracellular vesicles. *Oncotarget*, 4(11), 2057–2066. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1336>.
69. Ghatak, S., Hascall, V. C., Karamanos, N., Markwald, R. R., & Misra, S. (2022). Interplay between chemotherapy-activated Cancer Associated fibroblasts and Cancer initiating cells expressing CD44v6 promotes Colon Cancer Resistance. *Frontiers in Oncology*, 12, 906415. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.906415>.
70. Hu, J. L., Wang, W., Lan, X. L., Zeng, Z. C., Liang, Y. S., Yan, Y. R., & Liang, L. (2019). CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Molecular Cancer*, 18(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1019-x>.
71. Liang, L.-J., Yang, Y., Wei, W.-F., Wu, X.-G., Yan, R.-M., Zhou, C.-F., & Fan, L.-S. (2021). Tumor-secreted exosomal Wnt2B activates fibroblasts to promote cervical cancer progression. *Oncogenesis*, 10(3), 30. <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00319-w>.

72. Rybicka, A., Eyileten, C., Taciak, B., Mucha, J., Majchrzak, K., Hellmen, E., & Krol, M. (n.d.). Tumour-associated macrophages influence canine mammary cancer stem-like cells enhancing their pro-angiogenic properties.
73. Porlan, E., Martí-Prado, B., Morante-Redolat, J. M., Consiglio, A., Delgado, A. C., Kypta, R., & Fariñas, I. (2014). MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin. *Nature Cell Biology*, *16*(7), 629–638. <https://doi.org/10.1038/ncb2993>.
74. Kokovay, E., Wang, Y., Kusek, G., Wurster, R., Lederman, P., Lowry, N., & Temple, S. (2012). VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression. *Cell Stem Cell*, *11*(2), 220–230. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.06.016>.
75. Chavali, M., Klingener, M., Kokkosis, A. G., Garkun, Y., Felong, S., Maffei, A., & Aguirre, A. (2018). Non-canonical wnt signaling regulates neural stem cell quiescence during homeostasis and after demyelination. *Nature Communications*, *9*(1), 36. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02440-0>.
76. Flanagan, D., Austin, C., Vincan, E., & Pesse, T. (2018). Wnt signalling in gastrointestinal epithelial stem cells. *Genes*, *9*(4), 178. <https://doi.org/10.3390/genes9040178>.
77. Luis, T. C., Naber, B. A. E., Roozen, P. P. C., Brugman, M. H., de Haas, E. F. E., Ghazvini, M., & Staal, F. J. T. (2011). Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion. *Cell Stem Cell*, *9*(4), 345–356. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.07.017>.
78. Bowie, M. B., McKnight, K. D., Kent, D. G., McCaffrey, L., Hoodless, P. A., & Eaves, C. J. (2006). Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*(10), 2808–2816. <https://doi.org/10.1172/JCI28310>.
79. Chen, S., & Liu, Y. (2018). Battle in stem cell niches: Canonical versus noncanonical wnt signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, *103*(3), 377–379. <https://doi.org/10.1002/JLB.2CE1117-453RR>.
80. Povinelli, B. J., & Nemeth, M. J. (2014). Wnt5a regulates hematopoietic stem cell proliferation and repopulation through the Ryk receptor. *Stem Cells*, *32*(1), 105–115. <https://doi.org/10.1002/stem.1513>.
81. Sugimura, R., He, X. C., Venkatraman, A., Arai, F., Box, A., Semerad, C., & Li, L. (2012). Noncanonical Wnt Signaling Maintains Hematopoietic Stem Cells in the Niche. *Cell*, *150*(2), 351–365. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.041>.
82. Eliazar, S., Muncie, J. M., Christensen, J., Sun, X., D'Urso, R. S., Weaver, V. M., & Brack, A. S. (2019). Wnt4 from the Niche Controls the Mechano-Properties and quiescent state of muscle stem cells. *Cell Stem Cell*, *25*(5), 654–665e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.007>.
83. Tremblay, A. M., Missiaglia, E., Galli, G. G., Hettmer, S., Urcia, R., Carrara, M., & Camargo, F. D. (2014). The Hippo transducer YAP1 transforms activated satellite cells and is a potent effector of embryonal rhabdomyosarcoma formation. *Cancer Cell*, *26*(2), 273–287. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.05.029>.
84. Florian, M. C., Nattamai, K. J., Dörr, K., Marka, G., Überle, B., Vas, V., & Geiger, H. (2013). A canonical to non-canonical Wnt signalling switch in haematopoietic stem-cell ageing. *Nature*, *503*(7476), 392–396. <https://doi.org/10.1038/nature12631>.
85. Tiwari, R. L., Mishra, P., Martin, N., George, N. O., Sakk, V., Nalapareddy, K., & Geiger, H. (n.d.). A Wnt5a-Cdc42 axis controls aging and rejuvenation of hair-follicle stem cells
86. Florian, M. C., Klose, M., Sacma, M., Jablanovic, J., Knudson, L., Nattamai, K. J., & Geiger, H. (2018). Aging alters the epigenetic asymmetry of HSC division. *PLoS Biology*, *16*(9), e2003389. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003389>.
87. Chen, M., Li, Y., Xiao, L., Dai, G., Lu, P., & Rui, Y. (2021). Non-canonical Wnt5a signaling regulates tendon stem/progenitor cells senescence. *Stem Cell Research & Therapy*, *12*(1), 544. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02605-1>.
88. Harada, S., Mabuchi, Y., Kohyama, J., Shimojo, D., Suzuki, S., Kawamura, Y., & Matsuzaki, Y. (2021). FZD5 regulates cellular senescence in human mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells*, *39*(3), 318–330. <https://doi.org/10.1002/stem.3317>.
89. Bisson, I., & Prowse, D. M. (2009). WNT signaling regulates self-renewal and differentiation of prostate cancer cells with stem cell characteristics. *Cell Research*, *19*(6), 683–697. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.43>.
90. Liu, S., Zhang, U. K. P., Tsang, J., Huang, L. L., Tu, J., S. P., & Jiang, X. (2018). R-spondin2 enhances canonical wnt signaling to maintain the stemness of glioblastoma cells. *Cancer Cell International*, *18*(1), 156. <https://doi.org/10.1186/s12935-018-0655-3>.
91. Akbari, S., Kunter, I., Azbazzar, Y., Ozhan, G., Atabey, N., Karagonlar, F., Z., & Erdal, E. (2021). LGR5/R-Spo1/Wnt3a axis promotes stemness and aggressive phenotype in hepatoblast-like hepatocellular carcinoma cell lines. *Cellular Signalling*, *82*, 109972. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.109972>.
92. Hayes, M. N., McCarthy, K., Jin, A., Oliveira, M. L., Iyer, S., Garcia, S. P., & Langenau, D. M. (2018). Vangl2/RhoA Signaling Pathway Regulates Stem Cell Self-Renewal Programs and Growth in Rhabdomyosarcoma. *Cell Stem Cell*, *22*(3), 414–427. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.02.002>.
93. Binda, E., Visioli, A., Giani, F., Trivieri, N., Palumbo, O., Restelli, S., & Vescovi, A. L. (2017). Wnt5a Drives an Invasive Phenotype in Human Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Research*, *77*(4), 996–1007. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1693>.
94. Introduction to Brain Tumor Stem Cells - PubMed. (n.d.). Retrieved January 25 (2023). from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30324509/>.
95. Shevchenko, V., Arnotskaya, N., Zaitsev, S., Sharma, A., Sharma, H. S., Bryukhovetskiy, A., & Bryukhovetskiy, I. (2020). Proteins of Wnt signaling pathway in cancer stem cells of human glioblastoma. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 151, pp. 185–200). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.im.2020.03.006>.
96. Lai, Y.-J., Tsai, J.-C., Tseng, Y.-T., Wu, M.-S., Liu, W.-S., Lam, H.-I., & Benveniste, E. N. (2017). Small G protein Rac GTPases regulate the maintenance of glioblastoma stem-like cells in vitro and in vivo. *Oncotarget*, *8*(11), 18031–18049. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14949>.
97. Qin, L., Yin, Y.-T., Zheng, F.-J., Peng, L.-X., Yang, C.-F., Bao, Y.-N., & Qian, C.-N. (2015). WNT5A promotes stemness characteristics in nasopharyngeal carcinoma cells leading to metastasis and tumorigenesis. *Oncotarget*, *6*(12), 10239–10252. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3518>.
98. Yin, P., Bai, Y., Wang, Z., Sun, Y., Gao, J., Na, L., & Zhao, C. (2020). Non-canonical Fzd7 signaling contributes to breast cancer mesenchymal-like stemness involving Col6a1. *Cell Communication and Signaling*, *18*(1), 143. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00646-2>.
99. Cantilena, S., Pastorino, F., Pezzolo, A., Chayka, O., Pistoia, V., Ponzoni, M., & Sala, A. (2011). Frizzled receptor 6 marks rare, highly tumorigenic stem-like cells in mouse and human neuroblastomas. *Oncotarget*, *2*(12), 976–983. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.410>.
100. Wu, Q. L., Zierold, C., & Ranheim, E. A. (2009). Dysregulation of frizzled 6 is a critical component of B-cell leukemogenesis in a mouse model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *113*(13), 3031–3039. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-163303>.