



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**ESTUDIO DEL PAPEL DE LA VÍA WNT EN LA QUIMIO-RESISTENCIA DE
ESFEROIDES DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE COLON**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Angela Patricia Moreno Londoño

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Martha Robles Flores
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. María Antonieta Chávez González
Instituto Mexicano del Seguro Social

Dra. Marina Macías Silva
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México. Marzo 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**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:

**ESTUDIO DEL PAPEL DE LA VÍA WNT EN LA QUIMIO-RESISTENCIA DE
ESFEROIDES DE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER 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

Angela Patricia Moreno Londoño
Número de cuenta: 51504852-4

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).

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dra. Martha Robles Flores	Facultad de Medicina, UNAM
Dra. María Antonieta Chávez González	Instituto Mexicano del Seguro Social
Dra. Marina Macías Silva	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

La realización de esta tesis fue apoyada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), proyecto FOSSIS 2017-289600, y por el programa DGAPA-UNAM IN229420 e IV200220. Durante los estudios de doctorado la tesista recibió una beca otorgada por CONACYT con número de CVU 664983.

Durante el desarrollo de este trabajo se reconoce la asesoría técnica de la Dra. María Cristina Castañeda Patlán.

El jurado del examen de doctorado estuvo conformado por:

Presidente	Dra. Leticia Rocha Zavaleta
Secretario	Dr. Jesús Chimal Monroy
Vocal	Dr. Cristian Gabriel Oliverio Arriaga Canon
Vocal	Dr. Jesús Adolfo Gracia Sainz
Vocal	Dra. Magdalena Guerra Crespo

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de estos años, podría decir que han sido muchas las personas que han contribuido a mi formación profesional y crecimiento personal. En este espacio, mis agradecimientos van dirigidos a las personas que por su constancia han contribuido en mayor medida a que el camino hasta aquí fuera un poco más enriquecedor y alegre.

Primero, quisiera agradecer a la UNAM, que como institución ha sido mi casa de estudios. Gracias a los docentes, al personal administrativo del posgrado en ciencias bioquímicas y al personal de mantenimiento. Gracias por su trabajo, porque la UNAM es una reconocida institución gracias a la labor de cada uno de ustedes.

A mi familia y amigos en Colombia, gracias por su apoyo constante, especialmente a mi madre, a Ruth, a Nano y a Sandra. A mi madre, gracias por cada velita que encendió por mi, para que todo saliera bien. A Nano, por recordarme que es necesario mantener vivo el niño que tenemos dentro y mantener viva nuestra imaginación. Es divertido jugar a crear nuevos mundos donde miles de escenarios son posibles, aunque algunos ya parezcan conocidos. A Ruth, gracias por ser mi conexión con la familia, por cada detalle y por compartir conmigo sus experiencias y aprendizajes. A Sandra, gracias por escucharme y nunca minimizar mis sentimientos, porque todos tenemos derecho a sentir y exteriorizar nuestra tristeza y frustraciones.

Un especial agradecimiento a mis colegas y compañeros de laboratorio, a Mike, Carlos, Eduardo, Alex, Paola y Juan Carlos; gracias por sus palabras de apoyo y las pláticas sobre ciencia, anime, películas y otras cosas de la vida. Fue motivador verlos día a día contruir sus proyectos. Su disciplina, esfuerzo y pasión por lo que hacen es admirable y siempre los recordaré por ello.

A la Dra. Martha Robles, gracias por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y desarrollar mi trabajo de tesis en su laboratorio. Agradezco su apoyo, orientación y voto de confianza.

A Cris, gracias por el apoyo técnico, porque sin ti el laboratorio no funcionaría. Pero mas importante, gracias por tu amistad, por estar al pendiente y procurar que todos estuviéramos bien. Tu presencia durante estos años significó mucho para mi, fuiste lo mas cercano a tener una familia en México. Gracias por cada detalle y muestra de afecto.

A Claudia y a Odalys, gracias por ser mis compañeras de viaje y de recocha. Disfruté muchos las tardes de chismes, películas, juegos, comida y tragos; me permitieron liberar el estrés y olvidar un poco los problemas y conflictos que golpean el alma. El futuro es incierto, pero espero que ustedes sean parte de mi constante en la vida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	ix
1. ANTECEDENTES.....	1
1.2 Cáncer colorrectal: Incidencia y mortalidad	1
1.2 Estadificación del cancer colorrectal y tratamiento	2
1.3 Mecanismos de quimioresistencia en cáncer colorrectal	6
1.3.1 Metabolismo del 5FU.....	6
1.3.2 Reparación de daño en el DNA.....	7
1.3.3 Alteración de apoptosis y autofagia	9
1.3.4 Transición epitelio-mesénquima	10
1.3.5 Poblaciones celulares con fenotipo troncal	11
1.3.5.1 Esferoides como modelo de estudio de células tumorales con fenotipo troncal	12
1.3.5.2 Las células tumorales con fenotipo troncal y su participación en la resistencia a fármacos	13
1.4 La vía de señalización Wnt en cáncer colorrectal	17
1.4.1 Epitelio Intestinal	17
1.4.2 La señalización Wnt.....	18
1.4.3 Las vías Wnt y su desregulación en cáncer colorrectal.....	22
1.4.4 Antecedentes de las vías Wnt en quimioresistencia en cáncer colorrectal.....	24
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
3. HIPÓTESIS	28
4. OBJETIVOS	29
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
5.1 Reactivos y anticuerpos	30
5.2 Plásmidos.....	31
5.3 Líneas celulares	31
5.4 Cultivo celular.....	31
5.5 Detección de proteínas en superficie celular	32
5.6 Western blot	32
5.7 Viabilidad celular	33
5.8 Análisis de ciclo celular	34
5.9 Proliferación celular dependiente e independiente de anclaje	34

5.10	Ensayo de gen reportero TOP	35
5.11	Inhibición de la vía de señalización Wnt canónica	35
5.12	Análisis estadístico	36
6.	RESULTADOS	37
6.1	Los cultivos de esferoides de líneas de cancer colorrectal se enriquecen de células con fenotipo troncal	37
6.2	El 5FU induce muerte y arresto del ciclo celular en esferoides de líneas celulares de cáncer colorrectal	40
6.3	La estimulación con ligandos Wnt promueve supervivencia celular en esferoides de la línea celular RKO que exhiben sensibilidad al 5FU	46
6.3.1	Los ligandos Wnt disminuyen la muerte por apoptosis independientemente de la activación de NFAT	49
6.4	La inhibición de la vía Wnt canónica favorece la supervivencia celular ante la acción citotóxica del 5FU en esferoides de líneas celulares que presentan activa esta vía de manera constitutiva	50
6.4.1	La expresión de la dominante negativa para TCF4 disminuye la muerte celular y el daño al DNA inducido por el 5FU	51
6.4.2	La inhibición farmacológica de la vía Wnt/ β -catenina promueve supervivencia celular frente a la acción citotóxica del 5FU	53
6.4.3	El tratamiento combinado con 5FU y Adavivint altera el flujo autofágico de esferoides de SW620 tratados con 5FU	58
6.4.3	La Inhibición de la vía Wnt canónica con Adavivint disminuye la expresión de marcadores asociados a troncalidad y la capacidad clonogénica de células tumorales en cultivo de esferoides	60
7.	DISCUSIÓN.....	65
8.	CONCLUSIONES	72
9.	PERSPECTIVAS	73
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	75
11.	ANEXOS	100

ABREVIATURAS

2D:	Cultivos en monocapa
5FU:	5-Fluorouracilo
BER:	Reparación como la escisión de bases
CAFs:	Fibroblastos asociados al tumor
CDK2:	cinasa dependiente de ciclina 2
cPARP:	PARP escindida o cortada
CRC:	Cáncer colorrectal
CSCs:	Células tumorales con fenotipo troncal
dnTCF4:	Dominante negativa para TCF4
DSB:	Roturas en la doble cadena de DNA
DVL:	Dishevelled
EFC:	Eficiencia de formación de colonias
EFS:	Eficiencia de formación de esferoides
EMT:	Transición epitelio mesénquima
FDA:	Administración de alimentos y medicamentos
FDZ:	Receptores Frizzled
FOLFIRI:	Leucovirin, 5FU, irinotecan
HCQ:	Hidroxicloroquina
HR:	Coeficiente de riesgo instantáneo
ISCs:	Células troncales intestinales
MMR:	Reparación de discordancias
MMR-D:	Deficiencia en la reparación de discordancias en el DNA
MSI-H:	Inestabilidad de microsatélites
NHEJ:	Reparación de extremos no homólogos
PCP:	Polaridad celular planar
PFS:	Supervivencia libre de la enfermedad
RTKs:	Receptores tirosina-cinasas
SFB:	Suero fetal bovino
SSB:	DNA monocatenario
TAM:	Macrófagos asociados al tumor
wt:	Tipo silvestre

RESUMEN

La presencia de células tumorales con fenotipo troncal (CSCs, por sus siglas en inglés) se ha asociado con la inducción de resistencia a la terapia farmacológica. El 5-fluorouracilo (5FU) ha sido ampliamente utilizado como primera línea de terapia contra el cáncer colorrectal (CRC). Sin embargo, su efectividad puede verse limitada debido a la resistencia que los tumores desarrollan durante el tratamiento. La vía de señalización Wnt desempeña un papel clave en el desarrollo y progresión del cáncer, pero su contribución a la quimioresistencia de las CSCs no se comprende completamente. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue investigar el papel de la vía Wnt en la resistencia de las CSCs a la citotoxicidad inducida por el 5FU. Para ello, se utilizaron cultivos de esferoides como modelo de enriquecimiento de CSCs de líneas celulares de CRC que muestran diferentes estados de activación de la vía Wnt/ β -catenina.

En este trabajo encontramos que el 5FU induce muerte celular, daño al DNA y quiescencia en todos los cultivos de esferoides, con variaciones en la sensibilidad entre las líneas celulares. Los esferoides de la línea RKO exhibieron una mayor sensibilidad al 5FU, seguido de los esferoides de SW480 y los esferoides de la línea SW620, la cual representa un estado avanzado de la enfermedad al haber sido derivada de metástasis a nódulos linfáticos. Los esferoides de SW620 exhibieron una mayor resistencia a apoptosis y una mayor capacidad clonogénica después del tratamiento con 5FU.

La activación de la vía Wnt/ β -catenina en esferoides de RKO con el ligando Wnt3a disminuyó la muerte inducida por 5FU, mientras que el ligando Wnt5a puede promover supervivencia mediante la activación de vías Wnt independientes de la estabilización de β -catenina. En contraste, la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina con el compuesto Adavivint en esferoides de varias líneas celulares que exhiben la activación de esta vía de manera constitutiva, lejos de lo esperado, también disminuyó la muerte y el daño al DNA inducido por el 5FU. Sin embargo, el tratamiento con Adavivint solo o en combinación con 5FU produce un efecto citostático severo que compromete la clonogenicidad de las células residuales y disminuye la expresión de marcadores asociados a troncalidad como CD133 y SOX2 en los esferoides de SW480 y esferoides de SW620. Es importante destacar que el tratamiento combinado en esferoides de la línea SW620 seleccionó una subpoblación tolerante que tiene la capacidad de proliferar y recuperar los niveles de SOX2 después del tratamiento farmacológico. Este hallazgo sugiere que las células sobrevivientes pueden inducir un mecanismo adaptativo que les permite tolerar la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina.

ABSTRACT

The presence of cancer stem cells (CSCs) has been associated with the induction of drug resistance and disease recurrence after therapy. 5-Fluorouracil (5FU) is widely used as the first-line treatment of colorectal cancer (CRC). However, its effectiveness may be limited by the induction of drug resistance in tumor cells. The Wnt pathway plays a key role in the development and CRC progression, but it is not clearly established how it is involved in CSCs' resistance to 5FU treatment. This work aimed to investigate the role played by the canonical Wnt/ β -catenin pathway in CSC resistance to 5FU treatment, using tumor spheroids as a model of CSCs enrichment of CRC cell lines with different Wnt/ β -catenin contexts.

We found that 5FU induces cell death, DNA damage, and quiescence in all CRC spheroids tested, but in different proportions for each one. RKO spheroids were very sensitive to 5FU, while SW480 were less susceptible, and the SW620 spheroids, the metastatic derivative of SW480 cells, displayed the highest resistance to death, high clonogenic capacity, and the highest ability for regrowth after 5FU treatment. Activating the canonical Wnt pathway with Wnt3a in RKO spheroids decreased the 5FU-induced cell death, while Wnt5a can promote survival by activating non-canonical Wnt pathways. In contrast, Wnt/ β -catenin pathway inhibition with Adavivint alone or in combination with 5FU in spheroids with aberrant activation of this pathway produced a severe cytostatic effect, compromising their clonogenic capacity and diminishing the protein levels of stem cell markers such as CD133 and SOX2. Remarkably, this combined treatment also induced the survival of a small cell subpopulation that could exit the arrest, recover SOX2 levels, and re-grow after treatment.

1. ANTECEDENTES

1.2 Cáncer colorrectal: Incidencia y mortalidad

Dentro del grupo de enfermedades denominadas cáncer, el cáncer colorrectal (CRC) es el tercero de mayor incidencia y el segundo de mayor mortalidad a nivel mundial; con una representatividad del 10% de los nuevos casos, y del 9.4% de los fallecimientos por cáncer en 2020, según los reportes de la Agencia Internacional para el Estudio del Cáncer en su plataforma GLOBOCAN [1]. En la región de América Latina y el Caribe, la incidencia y mortalidad fueron del 7% y 7.4%, respectivamente, para el mismo año (Figura 1). Según las proyecciones de esta organización, se estima un incremento del 56.06% en el número de nuevos casos y un 69.3% en el número de fallecimientos por esta enfermedad a nivel mundial para el año 2040 [2]. Aunque la mayor proporción de los casos se diagnostican en personas de edad avanzada (mayor de 70 años), se ha reportado un aumento en el número de casos en la población menor de 55 años. Por ejemplo, en la población estadounidense Siegel *et al.* (2023) reportaron un incremento anual de un 2% desde 1990, con una estimación de nuevos casos del 20% en 2019 y un aumento de la mortalidad del 0.5% en 2011 al 3% en 2020 [3]. Resultados similares fueron registrados por Leal *et al.* (2020) en un estudio en población mexicana en el Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI durante el periodo 2014-2019, en el cual, de 3436 individuos diagnosticados con CRC, el 21% tenían menos de 50 años en el momento del diagnóstico [4].

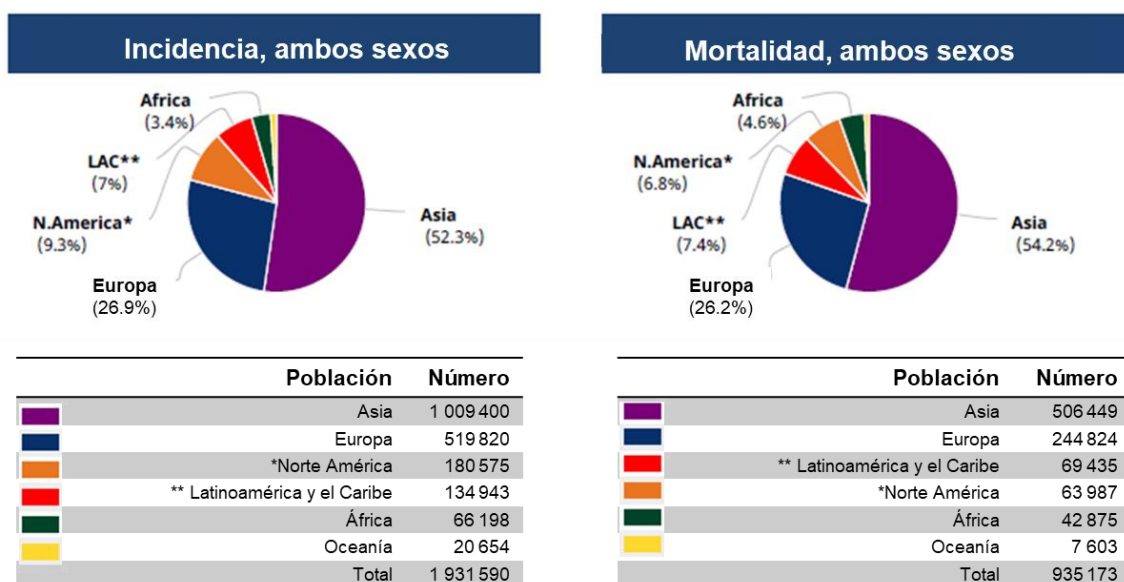


Figura 1. Incidencia y mortalidad de CRC en diferentes regiones del mundo. Tomado y modificado de GLOBOCAN 2020 [1].

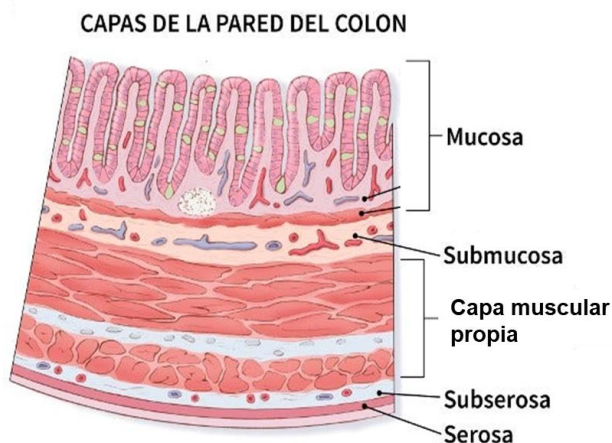
El aumento de la incidencia de CRC en población joven y de edad media se ha relacionado con factores de riesgo ambientales modificables, como el consumo de alcohol, el tabaquismo, dietas poco saludables, sedentarismo y obesidad, factores asociados con un estilo de vida cada vez más común desde la adolescencia e incluso la niñez [5]. Debido a que la mayoría de estos pacientes no presentan antecedentes

familiares de CRC y pocos presentan una condición que incrementa la predisposición a padecer esta enfermedad (ej: enfermedad inflamatoria intestinal), el diagnóstico se retrasa y la mayoría de los pacientes se encuentran en una etapa avanzada del cáncer en el momento del diagnóstico, e incluso el 27% presentan metástasis en el hígado y/o pulmón. En general, el 60% de los pacientes al momento del diagnóstico presentan una enfermedad avanzada, lo cual disminuye la probabilidad de supervivencia a 5 años, de un 91% para pacientes con tumores localizados a solo el 14% para aquellos con enfermedad metastásica [3], por lo que el diagnóstico temprano es fundamental. A pesar de los avances desde los años 70 en materia de resección quirúrgica, radioterapia y quimioterapia, el 35% de los pacientes presentan recurrencia de la enfermedad [6-8], y la resistencia farmacológica incrementa la probabilidad de fracaso del tratamiento [9].

1.2 Estadificación del cancer colorrectal y tratamiento

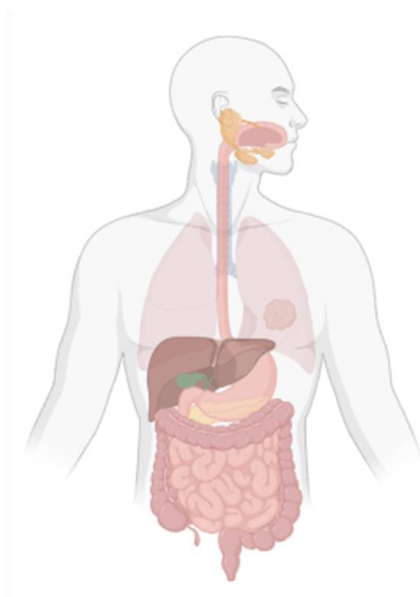
La estrategia terapéutica para cada paciente puede variar según la etapa clínica del cáncer, su caracterización histopatológica, características moleculares, la edad y el estado de salud del paciente. La forma más común de clasificación del CRC en la clínica es según el sistema TNM del Comité conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC), que se basa en la extensión del tumor (T), la propagación a nódulos linfáticos adyacentes (N) y la propagación a sitios distantes (M) (Figura 2) [10]. Esta información se combina con otros factores, como el grado de diferenciación, el tipo celular y la localización del tumor, para la asignación de la etapa general, la cual se representa por los números romanos I, II, III, IV. En la etapa I se clasifican los tipos de cáncer menos avanzados, y en las etapas subsiguientes se clasifican los tumores que se han propagado más y tienen un peor pronóstico. A veces, el cáncer puede clasificarse con el número 0, lo que indica que el cáncer no se ha extendido más allá de la capa celular donde se originó (Tabla 1).

En las primeras etapas de la enfermedad, generalmente se opta por la extirpación de los pólipos y la colectomía parcial, lo que suele ser suficiente. Sin embargo, debido al riesgo de células tumorales remanentes y la posible expansión a tejidos adyacentes, se recurre a la quimioterapia adyuvante para reducir el riesgo de recurrencia y desarrollo de metástasis. En caso de tumores muy grandes, se utiliza la quimio/radioterapia como tratamiento neoadyuvante antes de la resección quirúrgica. En pacientes con tumores avanzados o aquellos que no son candidatos para cirugía, la quimioterapia es el principal frente terapéutico utilizado, y puede combinarse con radioterapia y terapia dirigida para controlar la progresión del cáncer y aumentar la probabilidad de supervivencia del paciente [11].



Niveles de extensión del tumor (T)

- Tis:** Carcinoma *in situ*, el tumor no ha crecido más allá de la mucosa del colon o recto.
- T1:** Hasta la submucosa
- T2:** Hasta la capa muscular propia.
- T3:** Hasta la capa de tejido conectivo subserosa y serosa que cubre el colon pero no ha atravesado estas.
- T4a:** A través de la pared del colon hasta la superficie del peritoneo visceral pero no ha alcanzado órganos adyacentes.
- T4b:** A través de la pared del colon o del recto y está unido o crece hacia tejidos adyacentes.



Niveles de propagación a nódulos (N)

- N0:** No se ha propagado a nódulos linfáticos adyacentes
- N1:** 1 a 3 nódulos linfáticos adyacentes
- N1c:** Propagación hacia áreas de grasa cercanas pero no a los ganglios en si.
- N2a:** 4 a 6 ganglios cercanos afectados
- N2b:** 7 o más ganglios adyacentes afectados.

Niveles de propagación a sitios distantes (M)

- M0:** No hay propagación a sitios distantes
- M1a:** Propagación a un sitio distante (hígado o pulmón) o a un grupo de nódulos distantes pero no se ha propagado a partes distantes del peritoneo.
- M1b:** Propagación a más de un órgano distante o a un grupo de ganglios distantes pero no se ha propagado a partes distantes del peritoneo.
- M1c:** Propagación a partes distantes del peritoneo y puede o no haberse propagado a nódulos linfáticos distantes.

Figura 2. Parámetros del sistema de estadificación del CRC TNM. Tomado y modificado del sitio web de la Asociación Americana del cáncer [10].

Los regímenes quimioterapéuticos generalmente incluyen el 5FU y sus derivados, ya sea en monoterapia o en combinación con otros agentes antineoplásicos como oxaliplatino e irinotecan. Aunque la quimioterapia ha contribuido a extender el tiempo de supervivencia en pacientes con metástasis, a aproximadamente 20 meses [12], la citotoxicidad de la combinación de quimiofármacos, su baja selectividad y la resistencia innata de algunos tumores, así como la resistencia adquirida, limitan su eficacia. Esfuerzos considerables se han realizado para desarrollar nuevos fármacos más selectivos, dirigidos a blancos moleculares específicos, con el objetivo de aumentar la supervivencia del paciente, mejorar su calidad de vida y prolongar el período de remisión de la enfermedad.

Tabla 1. Estadificación del CRC según el sistema TNM y estrategia terapéutica general según la etapa clínica del cáncer.

Etapa	Agrupamiento	Terapia
0	Tis, N0, M0	Extirpación de pólipos mediante escisión local o colectomía parcial.
I	T1 o T2; N0, M0	Resección quirúrgica
IIA	T3, N0, M0	Resección quirúrgica y probablemente quimioterapia adyuvante (después de la cirugía) 5FU, OXA, CAP.
IIB	T4a; N0, M0	
IIC	T4b; N0, M0	
IIIA	T1 o T2 N1/N1c; M0 o T1, N2a, M0	Resección quirúrgica y quimioterapia adyuvante. Usualmente se utilizan las combinaciones FOLFOX o CAPEOX. En dependencia de la edad y estado de salud del paciente se emplea la monoterapia con 5FU o CAP.
IIIB	T3 o T4a N1/N1c M0 o T2 o T3 N2a M0 T1 o T2 N2b M0	La quimioterapia junto con radioterapia es una alternativa para reducir el tamaño del tumor antes de la cirugía. La radioterapia adyuvante es recomendable para tratar el cáncer remanente que no fue extraído durante la cirugía.
III C	T4a N2a M0 T3 o T4a N2b M0 T4b N1 o N2 M0	
IV A	Cualquier T y N M1a	Quimioterapia y/o terapia dirigida: -Diferentes combinaciones con 5FU o CAP. -Terapia dirigida: Inhibidores de VEGF, EGFR, HER2 o BRAF, de acuerdo a la caracterización molecular del tumor.
IVB	Cualquier T y N M1b	
IVC	Cualquier T y N M1b	

Información tomada de la Sociedad Americana del Cáncer. 5FU: 5-fluorouracilo; OXA: Oxaliplatino; CAP: Capecitabina; FOLFOX: 5FU, Leucovirin y Oxaliplatino; CAPEOX: Capecitabina y Oxaliplatino; VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial; EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico; HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano.

Varias vías de señalización implicadas en la proliferación, migración, supervivencia celular y comunicación con el microambiente tumoral, como la vía Wnt/ β -catenina, NOTCH, Hedgehog y TGF β /SMAD, han sido objeto de estudio por muchos investigadores como posibles blancos terapéuticos. Sin embargo, la compleja interacción entre vías de señalización ha dificultado su transición a estudios clínicos [12]. Entre los principales fármacos de terapia dirigida aprobados por la FDA se encuentran inhibidores de VEGF, EGFR, BRAF y HER2. Además, se han aprobado inhibidores de puntos de control inmunológico para el tratamiento específico de tumores con una alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H) y deficiencia en la reparación de discordancias en el DNA (MMR-D) [13].

Los anticuerpos anti-EGFR, como el Cetuximab y el Panitumumab, son ampliamente utilizados como primera línea de terapia contra el CRC, especialmente en pacientes con tumores que expresan la forma silvestre de los genes *KRAS* y *BRAF* [14, 15]. Las mutaciones en estos genes se han relacionado con una falta de respuesta a estos anticuerpos [15]. Se ha observado que la combinación de estos anticuerpos anti-EGFR

con quimioterapia en pacientes con KRAS/BRAF silvestre prolonga la supervivencia hasta por 4 meses en comparación con el tratamiento sin estos anticuerpos [13].

Por otro lado, el anticuerpo monoclonal anti-VEGF Bevacizumab, utilizado para inhibir la angiogénesis en el microambiente tumoral, ha demostrado beneficiar a los pacientes independientemente de la presencia de mutaciones en *KRAS*. El tratamiento con este anticuerpo ha mostrado una respuesta del 44% y una extensión de la supervivencia global de hasta 4.7 meses (HR: 0.66 $p < 0.001$) [16]. Además, el tratamiento continuo con Bevacizumab ha demostrado aumentar significativamente la supervivencia global en pacientes con progresión de la enfermedad después del tratamiento combinado con este agente y quimioterapia (HR=0.48, $p < 0.001$) [17].

Otros fármacos de terapia dirigida utilizados en el tratamiento del CRC, incluyen inhibidores de BRAF y HER2. Los inhibidores de BRAF se utilizan para el tratamiento de tumores que expresan la variante *BRAF* p.V600E, común en el 15% (5-15%) de los pacientes con esta enfermedad. Su utilización en combinación con Cetuximab extendió el tiempo de supervivencia global en 3 meses en comparación con el tratamiento de Cetuximab con FOLFIRI (HR: 0.62, $p < 0.001$) [18]. En contraste, el inhibidor de HER2 Tucatinib en combinación con Trastuzumab (anticuerpo monoclonal anti-HER2) se aprobó específicamente para el tratamiento de metástasis o tumores de CRC inoperables, positivos para este receptor, que no presentan mutaciones en *KRAS* y que han progresado después de la quimioterapia. Aunque el estudio MOUNTAINEER reportó que el 29% de los pacientes presentan una respuesta parcial al tratamiento con Tucatinib+Trastuzumab y solo el 3% presenta una respuesta completa, la duración de la respuesta se mantuvo por 12.4 meses (95% CI: 8.5-20.5) [19], lo cual está relacionado con un control de la enfermedad y un retraso en la progresión del cáncer.

Estos reportes indican que, a pesar de los avances logrados mediante la implementación de terapias dirigidas y la clasificación molecular de los tumores, la supervivencia global a 5 años en subtipos avanzados metastásicos es inferior al 20%. La resistencia adquirida a estos fármacos, la poca efectividad de la terapia adyuvante y los resultados controversiales de la terapia neoadyuvante han restringido su aplicación [12]. Por lo tanto, la quimioterapia, independientemente del régimen terapéutico, sigue siendo la estrategia principal en la lucha contra el cáncer. Sin embargo, es evidente que se requiere seguir investigando sobre los mecanismos de resistencia tanto a la quimioterapia como a los fármacos dirigidos, con el objetivo de ajustar los protocolos de tratamiento y encontrar nuevos blancos terapéuticos que permitan superar la resistencia preexistente y la resistencia adquirida durante la terapia.

1.3 Mecanismos de quimioresistencia en cáncer colorrectal

La resistencia a fármacos es uno de los mayores obstáculos en el éxito de la terapia oncológica y representa uno de los principales desafíos en la lucha contra el cáncer a largo plazo. Aunque varios tipos de cáncer presentan resistencia innata a agentes citotóxicos debido a sus características genéticas y epigenéticas, en muchos otros casos, los pacientes muestran una respuesta inicial al tratamiento farmacológico. Sin embargo, después de un tratamiento prolongado o interrupción del mismo, las células residuales tienen la capacidad de reconstituir los tumores, dando lugar a la progresión y/o recurrencia de la enfermedad.

Entre los principales mecanismos de resistencia a la quimioterapia se incluye la expresión aumentada de bombas transportadoras de membrana del tipo ABC, las cuales reducen la acumulación intracelular de los fármacos, la inducción de mecanismos de reparación de DNA, la inhibición de la apoptosis, la modulación de la autofagia, la transición epitelio-mesénquima (EMT) y la presencia de células con fenotipo troncal. Estas últimas se han caracterizado por ser la causa principal de la resistencia a la terapia convencional debido a sus características intrínsecas, las cuales se describen más adelante, junto con otros mecanismos de resistencia al 5FU en el CRC.

1.3.1 Metabolismo del 5FU

El 5-Fluorouracilo (5FU) está clasificado como un antimetabolito al ser un análogo estructural del uracilo que se diferencia por tener un átomo de flúor en el C5 del anillo heterocíclico. Su principal mecanismo de acción radica en la inhibición de la proteína timidilato sintasa (TS), lo que resulta en la inhibición de la replicación del DNA por un desbalance en la cantidad de nucleótidos. Además, la incorporación de sus metabolitos activos durante la síntesis de DNA y RNA induce daño en estos ácidos nucleicos e interfiere con la correcta síntesis de proteínas (Figura 3) [20]. La amplificación del gen *TYMS* resulta en un aumento de la expresión de TS y de su actividad, lo que permite superar el efecto inhibitorio del 5FU en la síntesis de timidina monofosfato (dTMP) [20].

La expresión alterada de enzimas implicadas en el metabolismo del 5FU ha sido directamente asociada con una baja respuesta terapéutica. La supresión de la timidina fosforilasa (TP), uridina fosforilasa (UP) y la enzima orotato fosforibosiltransferasa (OPRT), claves para la conversión del 5FU a sus metabolitos activos, se correlaciona con una baja sensibilidad al efecto citotóxico del 5FU. Por otro lado, altos niveles de la proteína dihidropirimidina deshidrogenasa (DPD), enzima limitante del catabolismo del 5FU a su forma inactiva DHFU (5,6-dihidro-5-fluorouracilo), confieren resistencia [21]. Asimismo, una alta expresión de esta enzima en el hígado disminuye la biodisponibilidad y concentración en plasma del 5FU; y la expresión de algunas de sus variantes con reducida actividad podría limitar el uso del fármaco debido a la citotoxicidad general que compromete la vida de los pacientes [22].

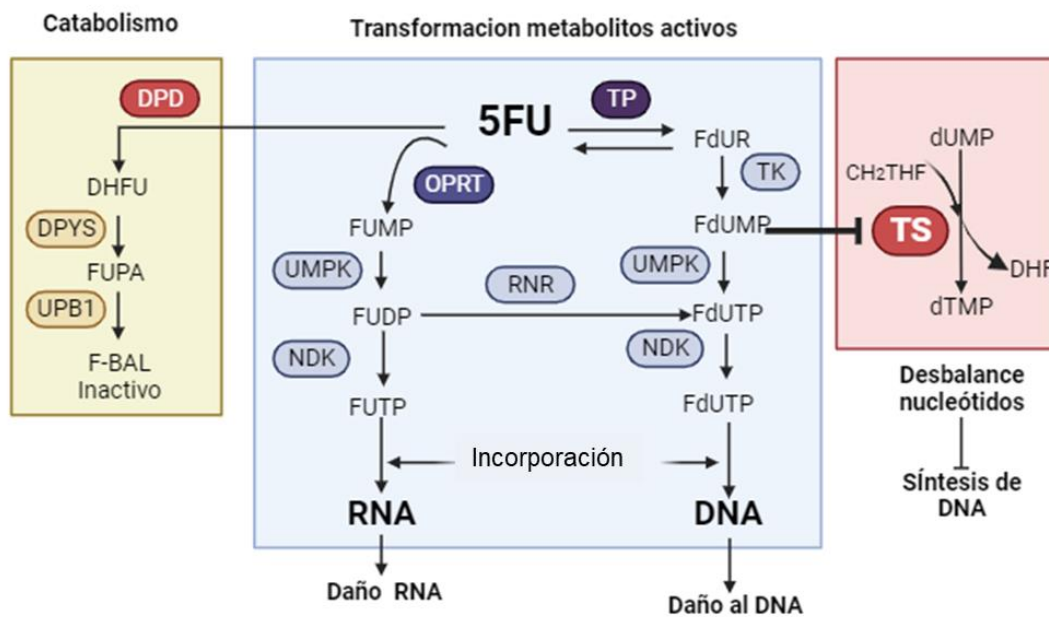


Figura 3. Metabolismo del 5FU en las células tumorales. El 5FU es fácilmente incorporado al DNA y al RNA debido a su homología estructural con las pirimidinas, mediante su transformación en FUTP (5-fluorouridina trifosfato) y FdUTP (5-fluorodeoxiuridina trifosfato) según las rutas metabólicas que se presentan en la figura. El metabolito 5-fluorodeoxiuridina monofosfato (FdUMP) inhibe la enzima timidilato sintasa (TS) mediante la formación de un complejo ternario junto con 5,10-metilenetetrahydrofolato (CH₂-THF), lo cual impide su unión con deoxiuridina monofosfato (dUMP) y su posterior transformación en deoxitimidina monofosfato (dTMP). La inhibición de la TS resulta en un desbalance de la cantidad de deoxinucleótidos y perturbación de la síntesis de DNA. Además el aumento de la relación FdUTP/dTTP favorece la incorporación errada de FdUTP al DNA. Además, la degradación del 5FU es facilitado por la enzima dihidropirimidina deshidrogenada (DPD) que cataliza su conversión a 5,6-dihidro-fluorouracilo (DHFU) y continua con la ruta de degradación indicada en la figura hasta la formación de F-BAL (α -fluoro- β -alanina). La regulación positiva de las enzimas resaltadas en rojo están involucradas directamente con resistencia al 5FU, mientras que las resaltadas en azul oscuro han sido asociadas con una mejor respuesta a este fármaco. FUPA: ácido α -fluoro- β -ureidopropionico DPYS; dihidropirimidinas; UPB1: β -ureidopropionasa. DHF: dihidroxifolato; FdUR: 5-fluorodeoxiuridina; FdUDP: 5-fluorodeoxiuridina difosfato; FUMP: 5-fluorouridina monofosfato; FUDP: 5-fluorouridina difosfato; TP: timidina fosforilasa; TK: timidina cinasa UMPK: uridin-monofosfato cinasa, NDK: nucleósido difosfato cinasa; OPRT: orotato-fosforibosil-transferasa; RNR: ribonucleótido difosfato reductasa. Creado con Biorender.com

1.3.2 Reparación de daño en el DNA

El 5FU, como un agente inductor de daño en el DNA en células altamente proliferantes, ocasiona arresto celular en las fases G1 y S del ciclo celular debido a la activación de los puntos de control en G1/S y G2. Estos puntos de control tienen la función de evitar la transmisión de alteraciones en el genoma a las células hijas. Una

vez el material genético es reparado y se completa la replicación del DNA, las células pueden retomar el proceso de división celular; de lo contrario, si el daño persiste, las células inician el proceso de apoptosis. En células resistentes al 5FU, este fármaco induce bajos niveles de apoptosis y puede ocasionar un bloqueo transitorio del ciclo celular o una prolongación de las fases G1 y/o G2 para reparar el daño en el DNA ocasionado por la quimioterapia [23]. Las células tumorales con tiempos de duplicación mayores pueden beneficiarse de la desaceleración del ciclo celular para evitar la incorporación de metabolitos activos del 5FU y proporcionar el tiempo suficiente para la reparación del DNA [23-25].

Por lo general, ante la introducción errónea de FdUTP (5-fluorodeoxiuridina trifosfato) en el DNA, las células pueden reparar este error mediante la activación de sistemas de reparación como la escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés) [26] y la reparación de discordancias (MMR, por sus siglas en inglés) [27, 28]. Sin embargo, la prolongación del estancamiento de las horquillas de replicación debido a la acumulación de DNA monocatenario (SSB), puede desencadenar un colapso de las horquillas de replicación, la formación de roturas en la doble cadena de DNA (DSB) y la inducción de apoptosis ante la no resolución de los focos de daño [29, 30]. Los tumores caracterizados por la deficiencia del sistema MMR (MMR-D), debido a la hipermetilación de los genes *MSH2*, *MLH1* y *MSH6*, no reconocen los sitios de incorporación de FdUTP, lo que contribuye a la resistencia al 5FU. Aunque la MMR-D se ha empleado como criterio de clasificación entre pacientes que se pueden o no beneficiar de la terapia con 5FU, un sistema MMR eficiente no es determinante en la respuesta al 5FU [31, 32].

Las células tumorales ante la inducción de DSB por el 5FU, pueden beneficiarse de otros sistemas de reparación de daño en el DNA, inducidos por la activación de los puntos de control a lo largo del ciclo celular, dependientes de las cinasas ATM (Ataxia telangiectasia mutada) y ATR (Ataxia telangiectasia relacionada a Rad3) [33, 34]. ATM soporta la eficiente reparación del DNA mediante la activación de mecanismos de recombinación homóloga (HR, por sus siglas en inglés) y reparación de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés) [35]. La inhibición del mecanismo HR mediante la supresión de mediadores como Rad51, potencia el daño en el DNA inducido por el 5FU [36]. Además, según lo reportado por Liu *et al.* (2019), líneas celulares de CRC resistentes al 5FU exhiben una mayor activación del sistema de reparación NHEJ ante daño en el DNA, lo cual fue directamente asociado con la regulación positiva del mediador XLF (Factor 1 de extremos no homólogos) [37]; ya que una reducción en sus niveles de expresión sensibiliza a las células tumorales al 5FU y al oxaliplatino.

Por otro lado, uno de los eventos clave durante la respuesta al daño en el DNA es la remodelación de la cromatina mediante la acetilación de histonas por la proteína CBP/p300 en los sitios DSB, lo que facilita el acceso y reclutamiento de factores NHEJ [38]. La inducción de daño en el DNA con agentes quimioterapéuticos como cisplatino, doxorubicina y 5FU induce un aumento de los niveles de DICER, que independientemente de su función en el procesamiento de RNAs no codificantes,

interactúa con SIRT7 en el citoplasma, reduciendo la relocalización de esta desacetilasa hacia la cromatina, lo que resulta en un aumento de los niveles de H3K18Ac [39]. Esto facilita el reclutamiento de componentes del complejo NHEJ como Ku70 y Ku80 a los sitios DSB. Consistente con esto, el silenciamiento de *DICER1* incrementó el daño en el DNA inducido por 5FU y doxorubicina en las líneas celulares HCT116 y RKO de CRC en ensayos *in vitro*, y disminuyó el crecimiento de tumores en ratones atímicos desnudos tratados con 5FU en un modelo de xenotransplante subcutáneo [39].

Además, como parte de la respuesta al daño en el DNA, las cinasas ATM y ATR inducen un retraso o arresto de la progresión del ciclo celular mediante la activación de las cinasas CHK1 y CHK2, que inhiben la acumulación de cinasas dependientes de ciclina [33] y favorecen la reparación del DNA antes de la división celular. Su fosforilación por ATM/ATR ha sido directamente asociada con la inducción de mecanismos de reparación del DNA, arresto celular y apoptosis durante la radioterapia y quimioterapia en varios tipos de cáncer [40-43]. Algunos investigadores han observado que células resistentes al 5FU exhiben una disminuida activación de estas proteínas y una baja tasa de apoptosis, lo cual parece estar directamente asociado con el estatus de p53 (expresión de *TP53* silvestre) [44, 45]. En contraste, otros autores han reportado que las células tumorales con el punto de control en G1/S inhabilitado, debido a alteraciones en la señalización mediada por p53, dependen de su habilidad de extender la fase G2 para reparar el daño en el DNA [40, 41 y 46]. La supresión del punto de control en G2/M con inhibidores de CHK1, más que de CHK2 en CRC, conduce a la acumulación de focos de daño en el DNA seguido de apoptosis ante estrés citotóxico [47-50], por lo que estos inhibidores se han considerado como una potencial estrategia para sensibilizar a las células de CRC a la quimioterapia.

1.3.3 Alteración de apoptosis y autofagia

Durante el proceso de tumorigénesis, las células tumorales se exponen a varios tipos de estrés que inducen muerte celular, como la sobreactivación de señales oncogénicas y el daño al DNA asociado con hiperproliferación. La capacidad de evadir la apoptosis mediante la regulación positiva de proteínas antiapoptóticas y regulación negativa de mediadores de estímulos de muerte, le permite a la célula tumoral resistir condiciones microambientales adversas y la terapia antineoplásica [51-53].

La resistencia al tratamiento con 5FU se ha vinculado directamente con una alta expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2, Bcl-X y Mcl-1, que suprimen la oligomerización de Bax y Bak, evitando así la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la liberación de factores proapoptóticos que inducen la activación de caspasas [51]. Además, se ha reportado una baja expresión del receptor de muerte Fas, mediador de la apoptosis extrínseca en respuesta al tratamiento con 5FU, en células resistentes a este fármaco [52, 53]. Entre los principales reguladores positivos de la expresión de proteínas antiapoptóticas se encuentran los factores de transcripción STAT3 [54-56], NFκB [56-58], y la vía de señalización PI3K/AKT [59,60], cuya activación, está directamente relacionada con la resistencia al 5FU.

Por otra parte, la inducción de la autofagia como mecanismo de supervivencia celular se ha relacionado con la resistencia farmacológica, y varios estudios sugieren que su inhibición podría ser una efectiva estrategia terapéutica contra el CRC. En este contexto, se ha informado que la inhibición de la autofagia con 3-metiladenina y cloroquina previene la formación de autofagosomas y el flujo autofágico en líneas celulares de CRC, lo cual potencia el efecto antineoplásico del 5FU y otros agentes citotóxicos [61-64]. Sin embargo, estudios alternativos han sugerido que la activación de la autofagia podría sensibilizar a las células tumorales al 5FU de manera dependiente o independiente de la activación de apoptosis [65-68], indicando un papel dual de la autofagia que dependerá del contexto celular e intensidad del estímulo. Aunque actualmente la contribución de la autofagia durante la quimioterapia no está claramente establecida, los tumores que muestran una particular dependencia de este proceso, podrían responder al efecto sinérgico entre agentes quimioterapéuticos e inhibidores farmacológicos de la autofagia. La identificación de marcadores de la dependencia de la autofagia permitirá seleccionar pacientes que podrían beneficiarse de la inhibición de la autofagia como estrategia terapéutica [69].

1.3.4 Transición epitelio-mesénquima

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso mediante el cual las células epiteliales adquieren características propias de células mesenquimales. Este fenómeno se caracteriza por la desestabilización de las interacciones intercelulares de la célula epitelial, pérdida de su polaridad apico-basal y la adquisición de una morfología fusiforme (en forma de huso) [70]. Además, las células aumentan su capacidad migratoria e invasiva mediante la remodelación de su citoesqueleto y el establecimiento de asociaciones dinámicas con la matriz extracelular [70]. La regulación de estos eventos ocurre principalmente a nivel transcripcional y es mediado por la acción conjunta de diferentes factores de transcripción como SNAI1, TWIST1 y ZEB1/2, los cuales también influyen en características adicionales como la supervivencia celular y la resistencia farmacológica [71].

En modelos *in vitro* de adquisición de quimioresistencia, el tratamiento crónico con 5FU en líneas celulares de CRC conduce a una pérdida de la morfología epitelial y la adquisición de una morfología fusiforme, típica de las células mesenquimales. Este fenómeno se correlaciona con la disminución de E-cadherina en la membrana citoplasmática, un aumento de fibronectina y un incremento de la expresión de los factores de transcripción TWIST, SNAI1 y ZEB1/2, mediadores del programa EMT [72, 73]. Las células que activan este programa se han caracterizado por exhibir una expresión incrementada de transportadores ABC, resistencia a la apoptosis, crecimiento independiente de anclaje (resistencia a *anoikis*), y una reducción en la tasa de proliferación; mecanismos que contribuyen a la tolerancia a la quimioterapia [74-78]. En concordancia con estos hallazgos, estudios en células resistentes al 5FU han informado que el silenciamiento individual de *TWIST1* y *SNAI1* en CRC anula la inducción de la EMT y sensibiliza a las células tumorales a este fármaco, en parte

mediante la reducción de la transcripción de genes que codifican transportadores de tipo ABC, entre ellos *ABCB1* [79-81].

Por otro lado, la interacción de las células tumorales y la matriz extracelular es esencial durante el proceso EMT, migración e invasión celular. Las integrinas, al ser proteínas transmembranales de adhesión celular, son fundamentales en la respuesta celular ante estímulos externos provenientes de la matriz extracelular (ECM) y otras células no tumorales del microambiente tumoral. La activación de diferentes complejos de integrinas mediante la unión a sus ligandos puede promover la activación de diversas cascadas de señalización implicadas en migración, proliferación, angiogénesis y supervivencia celular [82]. En varios tipos de cáncer, se ha reportado que la activación de integrinas coordina una respuesta adaptativa que promueve la reparación del DNA e inhibe la apoptosis durante la quimioterapia y radioterapia [71]. Un ejemplo de ello en CRC fue reportado por Liu *et al.* (2013), quienes demostraron que la sobreexpresión de *ITGB6* ($\beta 6$ -integrina) suprime la inducción de apoptosis por el 5FU mediante la activación del eje ERK/Bcl-2-Bax [83].

Esta evidencia sugiere que las células que transicionan hacia un estado mesenquimal sufren un proceso de reprogramación, que más allá de conferirles una mayor capacidad de migración e invasión celular, induce programas transcripcionales asociados con evasión de apoptosis, mecanismos de reparación del DNA e incluso adaptación metabólica y adquisición de características troncales [71]. Esto les permite sobrevivir a diferentes tipos de estrés durante la diseminación a sitios distantes y resistir la terapia antineoplásica.

1.3.5 Poblaciones celulares con fenotipo troncal

Las células tumorales con fenotipo troncal (CSCs, por sus siglas en inglés) constituyen una subpoblación celular en los tumores, que comparten propiedades similares a las células troncales normales en los tejidos adultos, como la capacidad de autorrenovación y diferenciación celular. Mientras que en los tejidos adultos, las células troncales desempeñan un papel crucial en la homeostasis tisular y la regeneración después de una lesión, en el contexto del cáncer, las CSCs representan una población dinámica con la capacidad de iniciar tumores y resistir a la terapia convencional [84].

Con el propósito de estudiar esta subpoblación celular, se han utilizado diferentes estrategias para su identificación y aislamiento, siendo el uso de marcadores de superficie celular como CD133 y CD44 una de las más populares [85]. A pesar de su valor funcional, la expresión de estos marcadores ha mostrado ser altamente heterogénea y dinámica, lo que sugiere una considerable plasticidad fenotípica [86-89]. Por lo tanto, la expresión de estos marcadores no constituye un criterio suficiente para definir a una célula como CSC; resulta necesario llevar a cabo ensayos funcionales que permitan evaluar sus características troncales.

Los ensayos por excelencia para evaluar el potencial de las CSCs incluyen el trasplante serial de células tumorales (en bajas proporciones) en ratones inmunocomprometidos y ensayos de rastreo de linaje en tumores generados en ratones genéticamente modificados [84]. Debido a los requerimientos metodológicos de estos ensayos, los modelos *in vitro*, como el cultivo de esferoides, se han consolidado como alternativas para el estudio de las CSCs. El cultivo de esferoides es uno de los métodos más comunes, dada la evidencia experimental sobre la predisposición de las células troncales de crecer en cultivo en condiciones de baja adherencia y en ausencia de suero fetal bovino, formando estructuras esféricas, lo que pone de manifiesto su capacidad clonogénica y resistencia a *anoikis* [90-92]. Por esta razón, la formación de esferoides (o esferas) se ha considerado como una característica asociada a la troncalidad [93].

En el siguiente apartado se detallan las especificaciones técnicas del cultivo de esferoides como modelo de estudio de las CSCs.

1.3.5.1 Esferoides como modelo de estudio de células tumorales con fenotipo troncal

El ensayo de formación de esferoides se basa en la capacidad de una célula única para formar estructuras esféricas por expansión clonal (Figura 4). En este contexto, garantizar el crecimiento clonal es un punto crucial en el enriquecimiento de las CSCs. Para ello, es necesario obtener una suspensión de células únicas mediante disociación mecánica y enzimática; además, las células se deben sembrar a una baja densidad celular para prevenir la formación de esferoides por agregación celular [93]. Aunque lo más recomendable es sembrar una célula por pozo en condiciones de baja adherencia, frecuentemente se describe un rango entre 0.2 y 20 células por μL para el crecimiento en condiciones clonales; sin embargo, esto dependerá del tipo celular, y el manejo del cultivo [93].

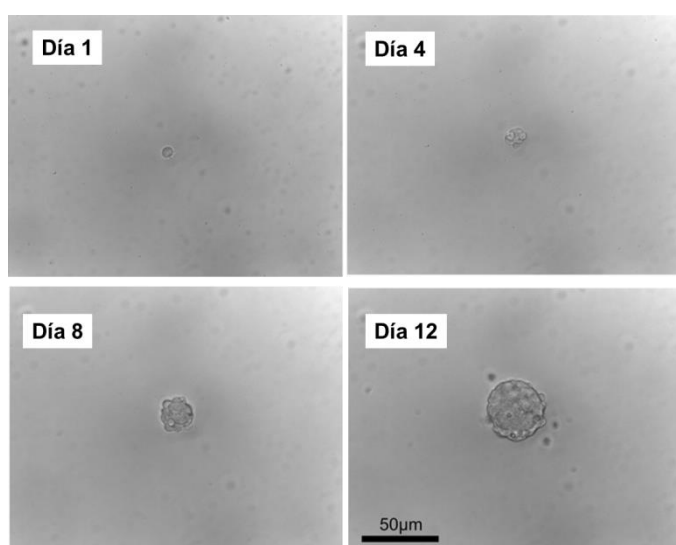


Figura 4. Formación de un esferoide de cáncer de próstata por expansión clonal. Se muestran fotografías de la formación de un esferoide a partir de una única célula (1 célula/pozo) de la línea celular DU145 de cáncer de próstata. La célula fue cultivada en condiciones de baja adherencia, en un medio de crecimiento sin suero fetal bovino y suplementado con EGF (10ng/mL). Tomado y modificado de Rybak *et al.* 2011[92].

Por otro lado, las células troncales dependen de su nicho para preservar su capacidad de autorrenovación y diferenciación. En los cultivos *in vitro*, la suplementación del

medio con factores específicos permite simular parcialmente este nicho. En comparación con los cultivos en monocapa, se prescinde del suero fetal bovino para evitar adhesión y diferenciación celular [88]; y el medio de cultivo se suplementa con los factores de crecimiento epidérmico (EGF) y/o de fibroblastos (bFGF) para favorecer la expansión de las células troncales [88, 93]. Dependiendo del tejido de origen, se pueden utilizar otros factores, como el ligando Wnt3a en CRC, el cual promueve la proliferación celular y puede favorecer el mantenimiento del estado indiferenciado de las células que conforman los esferoides [94, 95].

Una de las limitantes de este tipo de cultivos es la ausencia de matriz extracelular, la cual ha emergido como un constituyente clave del nicho de las CSCs, que puede afectar sus propiedades funcionales; no obstante, las mismas células de los esferoides producen componentes de la matriz, entre los que se incluye tenascina-C, periostina, colágeno, entre otros [96], lo que sugiere que las células de los esferoides pueden generar y modificar su propio nicho.

Es importante señalar que la formación de esferoides bajo las condiciones descritas, tiene como objetivo el enriquecimiento de células con características troncales, en lugar de reproducir la heterogeneidad de los tumores y la complejidad del microambiente tumoral. También es necesario enfatizar que los esferoides no son estructuras homogéneas constituidas únicamente por células no diferenciadas, sino que presentan una alta heterogeneidad entre esferoides e intra-esferoides [97], lo cual podría explicar la expresión variable de marcadores asociados a troncalidad y diferenciación [88].

En el caso específico de CRC, se ha demostrado que este método de cultivo permite la expansión selectiva de células en un estado indiferenciado con la capacidad de propagarse por largos periodos de tiempo mediante pasaje serial de los esferoides [98]. Asimismo, se ha reportado que las células de esferoides exhiben una alta capacidad tumorigénica y las CSCs enriquecidas en estos cultivos conservan su capacidad de generar células de diferente linaje en condiciones *in vitro* [88]. Dada esta evidencia, el cultivo de esferoides se ha utilizado para evaluar el potencial troncal, la quimioresistencia y llevar a cabo el cribado de compuestos que puedan eliminar la población de CSCs en los tumores [99].

1.3.5.2 Las células tumorales con fenotipo troncal y su participación en la resistencia a fármacos

Las CSCs son consideradas la principal causa de la resistencia a la terapia antineoplásica debido a su mayor capacidad de supervivencia y adaptabilidad en comparación con las células tumorales con mayor grado de diferenciación (no-CSCs) que constituyen los tumores. La base molecular de la resistencia de las CSCs a la quimioterapia radica, en parte, en la sobreexpresión de bombas transportadoras de membrana de tipo ABC, una mayor capacidad de reparación del DNA, adaptación metabólica y evasión de la apoptosis (Figura 5). Además, su gran plasticidad y capacidad para entrar en un estado de quiescencia/dormancia bajo condiciones de

estrés, son características cruciales que contribuyen a la resistencia tanto a la quimioterapia como a la radioterapia. Teniendo en cuenta que la terapia convencional está dirigida a eliminar a las células tumorales en activa proliferación, al entrar en quiescencia las CSCs escapan a los agentes tóxicos y, adicionalmente, pueden evadir el sistema inmune mediante la regulación negativa de proteínas que hacen parte del complejo de histocompatibilidad tipo I, y ligandos de reconocimiento por parte de las células NK (células asesinas naturales) [100-102].

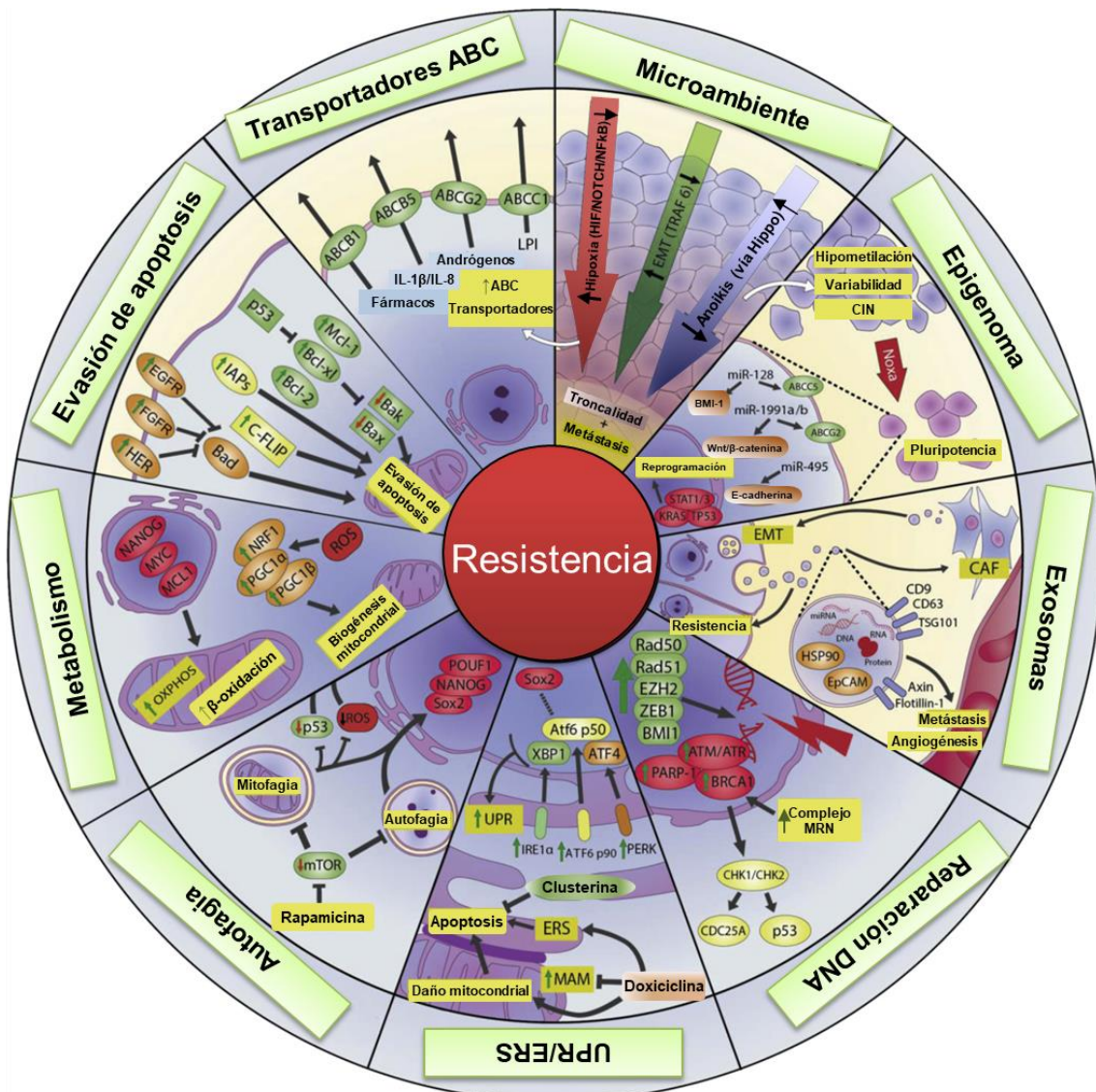


Figura 5. Mecanismos de resistencia de las células CSCs. i) La sobreexpresión de transportadores ABC confiere una resiliencia natural a la quimioterapia al disminuir la concentración de fármacos citoplasmáticos y además contribuye a la exportación de otras moléculas de señalización, incluidas las citocinas IL-1, IL-8, andrógenos y lisofosfatidilinositol (LPI) que les proporciona una ventaja a nivel de supervivencia; ii) Microambiente: la hipoxia, la resistencia a *anóikis* o la inhibición de la vía de señalización Hippo contribuyen al mantenimiento del fenotipo troncal y a la adquisición de rasgos metastásicos en diferentes subpoblaciones de CSCs; iii) Epigenoma: la inestabilidad cromosómica (CIN), la alteración de moduladores epigenéticos (KRAS, TP53, STAT1, STAT3), la hipometilación y/o la inestabilidad de la estructura de la cromatina promueven diferentes fenotipos de CSCs; iv) los exosomas

modifican nichos distantes para su posterior colonización y promover supervivencia a través de la remodelación de la matriz extracelular y coaptar células del nicho (ej: transformación a fibroblastos asociados al tumor, CAF); v) Las CSCs exhiben una mayor respuesta ante daño al DNA debido a una alta expresión de proteínas involucradas en la reparación del DNA, como PARP-1, ATM, ATR, BRCA1, RAD50, RAD51, EZH2, ZEB1 y BMI1, entre otros; vi) Las CSCs presentan una mayor respuesta a proteínas desplegadas (UPR) y son particularmente susceptibles al estrés del retículo endoplásmico (ERS) y al daño mitocondrial; vii) Desregulación de la autofagia: la autofagia ayuda al mantenimiento de las poblaciones CSCs para facilitar la supervivencia tumoral y la adquisición de resistencia durante la quimioterapia y la radioterapia; viii) Metabolismo: las CSCs pueden proliferar rápidamente o entrar en un estado de quiescencia (o dormancia). ix) Evasión de apoptosis mediante la activación de vías de señalización que promueven la expresión de proteínas antiapoptóticas y la inhibición de proteínas proapoptóticas. Todos estos mecanismos interrelacionados cooperan estrechamente para lograr la supervivencia de las células tumorales. Tomado y modificado de García-Mayea *et al.* (2020) [103].

En el contexto del CRC, las células resistentes a la quimioterapia se han caracterizado por expresar marcadores de superficie como LGR5, CD133 y CD44, ampliamente utilizados en la identificación y aislamiento de células con características troncales en varios tipos de cáncer [85, 104]. Aunque se ha asociado una mayor resistencia farmacológica a diferentes subpoblaciones celulares identificadas con estos marcadores, pocos estudios han explorado su contribución específica durante la terapia oncológica. Dada la prevalencia de estos marcadores en la investigación de las CSCs, a continuación se aborda brevemente cómo estas proteínas podrían estar implicadas en la respuesta adaptativa durante la quimioterapia.

CD133 (Prominina-1) es una glicoproteína transmembranal que potencia la activación de la vía de señalización PI3K/AKT, la cual modula la expresión de proteínas antiapoptóticas y proteínas transportadoras de tipo ABC, en parte mediante la translocación nuclear de NFκB [105, 106]. Asimismo, la activación de AKT podría inhibir la señalización río abajo de JNK y p38, involucradas en la inducción de apoptosis, y promover la degradación de p53 mediante la estabilización de MDM2 [107].

CD44, al interactuar con moléculas de ácido hialurónico de la matriz extracelular, puede amplificar la vía PI3K/AKT de manera dependiente o independiente de la estabilización de receptores tirosina-cinasa (RTKs) [108]. Un estudio reciente de Najafi *et al.* (2023) informaron que la reducción en un 50% de la expresión de CD44 en la línea celular HT29, aumentó la muerte celular inducida por 5FU e impactó negativamente la capacidad clonogénica y migratoria de estas células, probablemente mediante la supresión de AKT, SOX2 y NANOG [109]. Además, variantes de CD44 pueden contribuir a la resistencia a la radioterapia y quimioterapia mediante la estabilización de la subunidad xCT del transportador cistina-glutamato, regulando así la síntesis de glutatión, crucial en la respuesta antioxidante frente a la generación de ROS causada por la terapia [110, 111]. Específicamente, la alta expresión de CD44v6 se ha asociado con una menor supervivencia global y recurrencia de CRC después de la quimioterapia adyuvante [112], induciendo resistencia mediante diversos

mecanismos. La sobreexpresión de CD44v6 puede inducir resistencia al 5FU mediante la señalización LRP6/ β -catenina/ABCB1 [113], regulación del factor de transcripción YB-1 [114], el bloqueo de la unión del ligando FasL a su receptor Fas [115] y favoreciendo la formación de autofagosomas mediante la regulación positiva de Beclina-1 durante el tratamiento farmacológico [112].

En relación con el marcador LGR5, al ser un potenciador de la vía Wnt/ β -catenina, su contribución a la quimioresistencia se asocia con la activación de esta vía y la expresión de sus genes blanco, como *ABCB1* [116]. Sin embargo, varios autores han reportado que la pérdida de LGR5 favorece la supervivencia celular ante el tratamiento con irinotecan, ya que un aumento transitorio de los niveles de esta proteína sensibiliza a las células a la terapia con este fármaco [117, 118]. Kobayashi *et al.* (2013) demostraron que la población LGR5+ altamente proliferante, puede transicionar a un estado de baja proliferación/quiescencia marcado por la pérdida de esta proteína (LGR5- negativa) para evadir la acción citotóxica de la quimioterapia [117]. A nivel mecanístico, la pérdida de LGR5 contribuye a la activación de la vía MET/STAT3, la cual ha sido implicada en la supervivencia celular [119]. El tratamiento combinado con inhibidores de MET y STAT3 permitió superar la resistencia a irinotecan y retrasar el crecimiento de tumores en modelos de xenotransplante [118]. Una tendencia similar fue observada por Álvarez-Varela *et al.* (2022), quienes determinaron que las células Lgr5+ en respuesta al tratamiento con FOLFIRI disminuyen la expresión de Lgr5 y entran en un estado de baja proliferación celular marcado por la expresión de genes blanco de YAP [120].

Por otra parte, considerando la relevancia del microambiente en el mantenimiento de la población troncal, el crecimiento del tumor y la supervivencia celular, su alteración puede ser crucial en la respuesta global de la terapia. El estudio de Ghatak *et al.* (2022) demostró que la terapia basada en 5FU estimula a los fibroblastos asociados al tumor (CAFs) en CRC. Estos CAFs secretan IL17A, Wnt3a y periostina, proteínas que contribuyen a la viabilidad y el potencial tumorigénico de las CSCs durante la quimioterapia [113]. De manera similar, la secreción de otras citocinas como CCL21 [121] e IL8 [122] por parte de células endoteliales y estromales asociadas al tumor pueden promover la expansión y el mantenimiento de las CSCs. El bloqueo de la interacción de estas citocinas con sus receptores, sensibiliza a las células tumorales al 5FU, destacando así la importancia de esta subpoblación celular durante el tratamiento farmacológico y el papel del microambiente en la conservación de sus propiedades.

Adicionalmente, se ha observado una mayor infiltración de macrófagos asociados al tumor (TAM) M2 después de la terapia estándar, lo cual se ha vinculado con la recurrencia del cáncer [123, 124]. Los TAM pueden inducir una respuesta antiapoptótica en las CSCs y suprimir la respuesta antitumoral de los linfocitos T [125-127]. Por lo tanto, la reducción de la población de TAM M2 mejora la eficacia del tratamiento con agentes citotóxicos y potencia la respuesta inmunológica [124,127]. La evidencia experimental recopilada en diferentes tipos de cáncer demuestra que el microambiente tumoral puede generar un nicho que protege a las CSCs, sostiene su

expansión y, además, puede inducir un ambiente inmunosupresor que contribuye a la resistencia a la terapia antineoplásica [128].

1.4 La vía de señalización Wnt en cáncer colorrectal

1.4.1 Epitelio Intestinal

El epitelio intestinal constituye una capa simple de células estrechamente unidas, que desempeña diversas funciones críticas en el organismo, destacándose entre ellas la digestión, la absorción de nutrientes y la prevención del ingreso de agentes infecciosos e inmunogénicos al organismo. Este epitelio se organiza en unidades de criptas-vellosidades, las cuales experimentan una renovación constante debido a la persistente agresión mecánica y química a la que están expuestas [129]. El recambio celular depende de la proliferación de las células troncales intestinales (ISCs) en la base de las criptas y de la diferenciación de su progenie a medida que migran hacia las vellosidades en el intestino delgado o hacia la parte superior de las criptas en el colon.

La renovación del epitelio intestinal está principalmente regulada por el gradiente opuesto de activación de las vías de señalización Wnt/ β -catenina y BMP (proteínas morfogénicas), establecido por la expresión diferencial entre agonistas y antagonistas a lo largo del eje cripta-vellosidad (Figura 6). En la base de las criptas, la vía Wnt regula el mantenimiento de la troncalidad, la integridad genómica y la proliferación de las células ISCs [130]. Conforme las células hijas de las ISCs migran lejos de la base de las criptas, los niveles de ligandos Wnt disminuyen y, simultáneamente, aumenta el nivel de proteínas BMP, lo que contribuye a definir los bordes de la zona troncal. La activación de la vía BMP restringe la expansión de las ISCs y promueve su diferenciación, al mismo tiempo que regula el tamaño de las poblaciones estromales y del sistema inmune en el intestino [131, 132].

Esta compleja regulación de las vías de señalización es crucial, ya que su perturbación puede desencadenar enfermedades como el CRC. Estudios moleculares han revelado que el 85% de los tumores de CRC presentan alteraciones en la vía Wnt/ β -catenina y la desregulación de la vía BMP, lo que subraya su importancia en la carcinogénesis colorrectal [133]. En particular, la vía Wnt ha sido objeto de estudio en CRC debido a su sobreactivación y su papel en la regulación de características troncales en las CSCs, de gran relevancia por su participación en el fracaso de la terapia antineoplásica. En este trabajo, el interés está enfocado en la participación de esta vía de señalización en la resistencia al 5FU, por lo que en las siguientes secciones se describe brevemente la vía de señalización Wnt, las principales alteraciones de esta vía en CRC y los antecedentes de su papel en la resistencia a la quimioterapia.

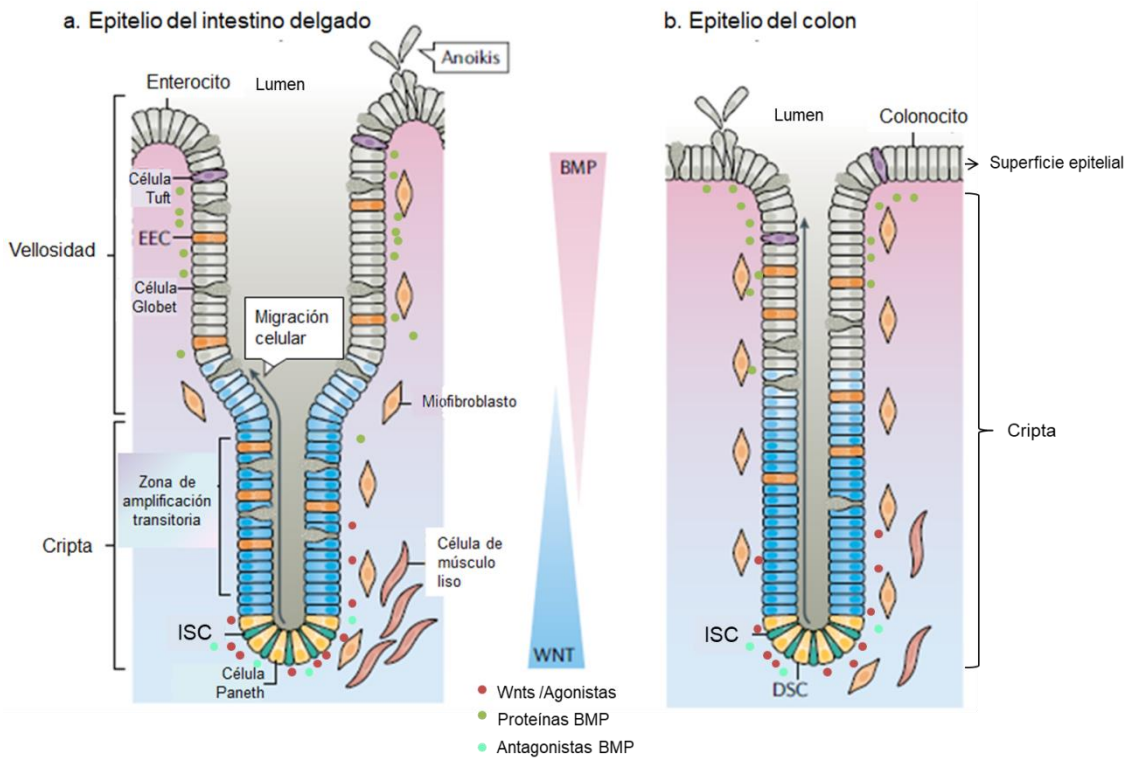


Figura 6. Estructura del epitelio intestinal y señales regulatorias. a) Epitelio del Intestino delgado y b) Epitelio del colon, que se caracteriza por la ausencia de vellosidades. Las ISC identificadas con el marcador LGR5 están localizadas en la base de las criptas, las cuales generan células de amplificación transitoria, que se diferencian a medida que migran hacia la cara luminal del epitelio. Las células epiteliales y estromales proporcionan de manera colaborativa agonistas y antagonistas de las vías Wnt y BMP para establecer gradientes de morfógenos. Las células estromales cercanas a la base de las criptas secretan inhibidores BMP, ligandos Wnt y R-spondinas (RSPO), que potencian la activación de la vía Wnt/ β -catenina, regulando así el mantenimiento de la población troncal. Adicionalmente, las células Paneth en el intestino delgado y las células DSC (células secretoras de la cripta profunda) en el colon secretan el factor de crecimiento epidérmico (EGF) para promover la proliferación celular de las ISCs. La disminución de ligandos Wnt, el aumento de proteínas BMP y la disminución de antagonistas BMP a medida que las células se alejan de la base de las criptas, favorecen su compromiso celular hacia diferentes linajes. Las proteínas BMP inhiben la transcripción de varios genes asociados a troncalidad, para evitar la expansión de las ISCs más allá de la zona troncal y prevenir la hiperproliferación epitelial. Al final de su tiempo de vida, las células diferenciadas son expulsadas hacia el lumen lo que induce su muerte por *anoikis*. Tomado y modificado de Beumer J. y Clever H. (2021)[134].

1.4.2 La señalización Wnt

La vía de señalización Wnt desempeña un papel crucial en la autorrenovación, diferenciación celular, polaridad y migración celular en diversos tejidos adultos y durante el desarrollo. Los ligandos Wnt se unen a los receptores Frizzled (FDZ) y a sus correceptores (LRP5/6 o ROR1/2) localizados en la superficie celular, desencadenando así una o varias cascadas de señalización. Estas cascadas se han clasificado comúnmente en dos categorías: la vía canónica, que depende de la

actividad co-transcripcional de β -catenina, y las vías no canónicas, que son independientes de esta proteína.

Dado que los ligandos Wnt conforman una familia de 19 miembros en mamíferos y pueden interactuar con varios receptores FDZ y correceptores, resulta poco claro qué determina el mecanismo específico que un ligando Wnt elige para activar una señalización en particular. La preferencia de activación parece depender de la disponibilidad de los diferentes tipos de correceptores asociados a los receptores FDZ en la membrana plasmática [135]. A pesar de los intentos de clasificar los ligandos Wnt en función de su capacidad para activar la señalización canónica o no canónica en un tipo celular específico, la evidencia experimental ha demostrado que esta clasificación no es rígida y dependerá del contexto celular. Un ligando Wnt puede simultáneamente promover la estabilización de β -catenina y activar las vías no canónicas, induciendo la formación de complejos de señalización celular que integran ambas cascadas de señalización [136].

Por lo tanto, comprender los mecanismos activados en respuesta a la estimulación con ligandos Wnt permitiría regular los procesos en los que participan y comprender el alcance de su alteración en CRC.

1.4.2.1 Vía de señalización Wnt/ β -catenina (canónica)

La vía Wnt canónica regula el nivel intracelular de β -catenina y su localización celular. En ausencia de ligandos Wnt, un complejo multiproteico conformado por las proteínas de anclaje APC y AXIN1, y las cinasas GSK-3 β y CK1, se une a β -catenina y la fosforila. Esto permite el reconocimiento de β -catenina por el complejo de ubiquitina-ligasa β -TrCP, que mediante poliubiquitinación la marca para su degradación vía proteosoma [137]. En contraste, la unión del ligando Wnt a su receptor FDZ y correceptor LRP5/6 forma un complejo que induce el reclutamiento de proteínas Dishevelled (DVL) a la membrana citoplasmática, lo que conlleva a la translocación de proteínas del complejo de destrucción al dominio intracelular del correceptor LRP5/6. El desensamblaje de este complejo evita la fosforilación de β -catenina, favoreciendo su acumulación en citoplasma y su posterior translocación nuclear [138, 139]. En el núcleo, β -catenina desplaza a la proteína represora TLE de los factores de transcripción TCF/LEF, y recluta coactivadores transcripcionales y modificadores de histonas para iniciar la transcripción de genes [140, 141].

Además, la vía Wnt canónica puede modular sus niveles de activación mediante la inducción transcripcional de reguladores negativos como *AXIN2* y las ubiquitina-ligasas *RNF43* y *ZNRF3*. La proteína de anclaje Axin2 ayuda a la formación del complejo de destrucción y a controlar los niveles de β -catenina, mientras que *RNF43* y *ZNRF3* controlan la disponibilidad de los receptores FDZ en la membrana citoplasmática mediante su ubiquitinación, internalización y posterior degradación vía lisosoma [142, 143]. Por otro lado, para mantener niveles altos de activación de la vía Wnt, por ejemplo, en la base de las criptas intestinales, las células estromales del nicho troncal pueden secretar R-spondinas (RSPO), que al interactuar con el marcador

de células troncales LGR5 promueve la internalización de RNF43/ZNRF3 [144] (Figura 7). Esto permite la acumulación de receptores FDZ en membrana y potencia la vía Wnt/ β -catenina en las ISCs.

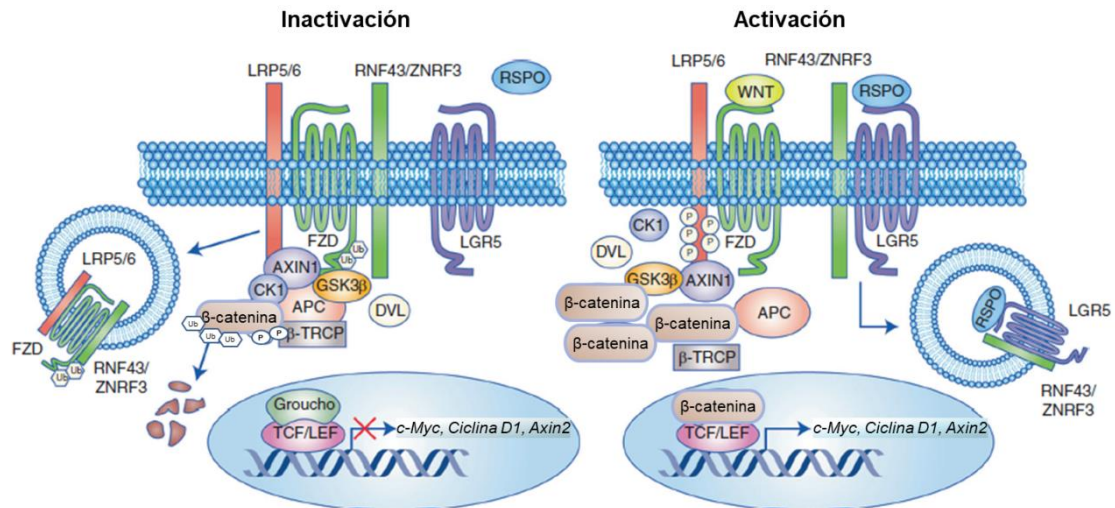


Figura 7. Vía de señalización Wnt canónica. La activación de la vía Wnt se mantiene en niveles bajos a través de la acción de las ubiquitina-ligasas transmembranales RNF43 y ZNRF3, que internalizan y promueven la degradación de los receptores FDZ y el co-receptor LRP5/6. En ausencia de ligandos Wnt, β -catenina es constantemente degradada en el citoplasma, y los factores de transcripción TCF en interacción con la proteína TLE (Groucho) reprimen la transcripción de genes. Ante la unión de proteínas RSPO a su receptor LGR5, las proteínas RNF43 y ZNF3 son neutralizadas y los receptores FZD y LRP5/6 ya no son removidos de la membrana citoplasmática, lo que permite su unión a los ligandos Wnt disponibles y la activación de la vía de señalización. Tomado y modificado de Morgan *et al.* 2018 [145].

1.4.2.2 Las vías Wnt no canónicas.

A diferencia de la vía Wnt/ β -catenina, la señalización independiente de β -catenina es más diversa y menos caracterizada. Aunque no se conoce con precisión qué determina que un ligando se comporte como prototipo canónico o no canónico, los ligandos Wnt5a y Wnt11 han sido los más estudiados en cuanto a sus funciones no canónicas. Estos ligandos pueden unirse a diferentes receptores FDZ y receptores tirosina-cinasa como ROR1/2 y RYK, desencadenando la activación de múltiples cascadas de señalización. Entre las más estudiadas se encuentran la vía de polaridad celular planar (PCP) y la de regulación de calcio intracelular (Wnt/ Ca^{2+}) (Figura 8). La unión de los ligandos Wnt al complejo de receptores puede activar efectores dependientes de calcio como calcineurina y CAMKII, proteínas GTPasas RHO y la cinasa c-Jun (JNK), las cuales están implicadas en la reorganización del citoesqueleto, la polaridad celular y la migración celular [146]. En particular, la vía Wnt/ Ca^{2+} , mediante la activación de calcineurina, regula la localización celular de las proteínas NFAT (NFAT1, NFAT2, NFAT3 y NFAT4). Un incremento de la concentración de calcio intracelular activa a calcineurina, que desfosforila a los NFAT exponiendo su

secuencia de localización nuclear y favoreciendo su translocación nuclear [147]. Una vez en el núcleo, los NFATs pueden regular la expresión de varios genes involucrados en ciclo celular, apoptosis, respuesta inflamatoria y respuesta inmune [147, 148].

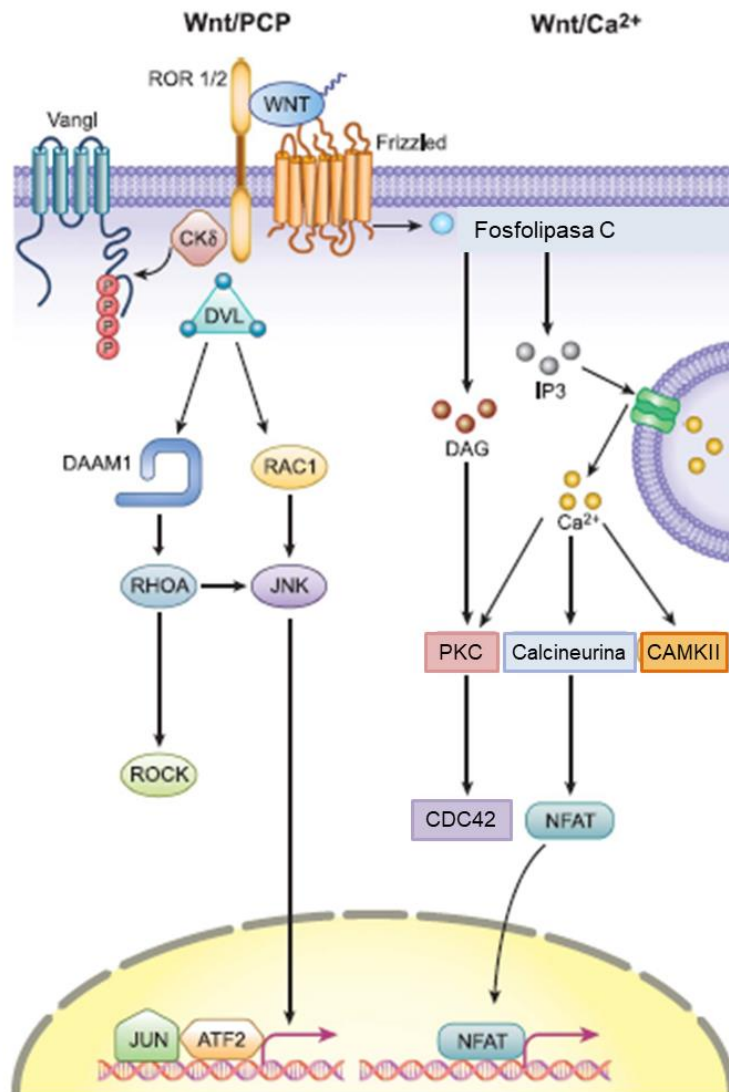


Figura 8. Vías Wnt no canónicas (Ca^{2+} y PCP). *Señalización Wnt/PCP:* Los ligandos Wnt se unen al complejo receptor ROR-FDZ para reclutar y activar a proteínas DVL que actúan como proteínas de andamiaje para la coordinación de la respuesta río abajo. DVL puede formar un complejo con la proteína DAAM1 (activador de morfogénesis 1 asociado a Dvl) para la activación de RHO/ROCK, probablemente mediante el reclutamiento de un intercambiador de nucleótidos de guanina. DVL también puede activar a RAC1 independientemente de DAAM1, lo que promueve la activación de JNK (c-Jun N-terminal cinasa). La activación de estas cascadas de señalización han sido implicadas en el rearrreglo del citoesqueleto y/o inducción de la transcripción de genes, por ejemplo, mediante la formación del complejo transcripcional JUN/ATF2. Además, VANGL como proteína de andamiaje, puede contribuir a la respuesta río abajo de los ligandos Wnt y a su modulación [149, 150]. *Señalización Wnt/ Ca^{2+} :* La unión de ligandos Wnt al complejo de receptores activa a la fosfolipasa C, la cual genera IP3 (inositol 1,4,5-trifosfato) y DAG (diacilglicerol) a partir de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. IP3 promueve la liberación de calcio del retículo endoplásmico al citoplasma, y posteriormente, sensores de

calcio como calmodulina activan a CAMKII (cinasa II dependiente de calmodulina) y calcineurina. Los iones de Ca^{2+} , junto con DGA, activan a PKC, que mediante la activación de CDC42 regula procesos como la polimerización de actina. Calcineurina promueve la translocación nuclear de NFAT (1-4), y tanto CAMKII como PKC pueden activar otros efectores como NF κ B y CREB para inducir la transcripción de genes. Tomado y modificado de Zhan *et al.* 2017 [151].

A diferencia de la vía Wnt canónica, ampliamente reconocida por su papel en la regulación de la población troncal en el intestino, se conoce poco sobre la contribución de las vías Wnt no canónicas en la homeostasis intestinal. En el año 2021, Böttcher *et al.* demostraron la importancia de la vía Wnt/PCP durante el compromiso celular hacia el linaje secretor enteroendocrino y células Paneth, donde JNK parece tener una función clave [152]. Además, ensayos *in vitro* con células epiteliales intestinales diferenciadas sugieren que la activación de las vías Wnt/ Ca^{2+} podrían favorecer la migración celular a lo largo del eje cripta-vellosidad durante el recambio celular [153].

Teniendo en cuenta la relevancia de la vía canónica y, más recientemente, de las vías no canónicas en el mantenimiento del epitelio intestinal al regular procesos como autorrenovación y diferenciación celular, su alteración puede ocasionar un desequilibrio en los diferentes tipos celulares presentes en el intestino y conducir al desarrollo de tumores.

1.4.3 Las vías Wnt y su desregulación en cáncer colorrectal.

1.4.3.1 La vía Wnt canónica y cáncer colorrectal

La aberrante activación de la vía Wnt canónica en CRC se debe principalmente a mutaciones de pérdida de función de reguladores negativos de la vía, como *APC* (65%) y *AXIN1/2* (3-5%), y a mutaciones de ganancia de función en *CTNNB1* (que codifica para la proteína β -catenina, 5.7%) [154]. Aunque estas mutaciones ocasionan la estabilización de los niveles de β -catenina de manera independiente de los ligandos Wnt, se ha demostrado que la vía puede aún ser susceptible de regulación. Un ejemplo de ello es la alta frecuencia de mutaciones que generan proteínas APC truncadas con una capacidad parcial de unirse a β -catenina y regular su disponibilidad, consistente con la teoría de “justo lo necesario” de la vía de señalización Wnt canónica para promover tumorigénesis [154, 155].

La interacción con otras vías de señalización puede potenciar la activación de la vía Wnt/ β -catenina en células con mutaciones en *APC*. La expresión de mutantes de *KRAS* y *TP53* promueve la hiperactivación de esta vía mediante la activación de ERK y AKT, respectivamente; lo cual conlleva a un aumento de los niveles de β -catenina y a su translocación nuclear [156, 157]. Por otro lado, la secreción autócrina o parácrina de ligandos Wnt incrementa la actividad co-transcripcional de β -catenina en células tumorales que presentan mutaciones en *CTNNB1* o *APC* [155, 158, 159]. Esta evidencia sugiere que, aunque las células tumorales con mutaciones en *APC* o

CTNNB1 exhiben altos niveles de activación de la vía Wnt canónica de manera constitutiva, los niveles de activación pueden aumentar o disminuir en respuesta a cambios intracelulares o estímulos externos.

Por otra parte, entre el 8 y 19% de los pacientes con CRC exhiben mutaciones en *RNF43*, las cuales han sido asociadas a una vía carcinogénica diferente a la de los tumores con mutaciones en *APC* o *CTNNB1* [154]. Las mutaciones *RNF43* p.R117fs y *RNF43* p.G659fs son las más frecuentes en CRC [154,160]; la primera conlleva a una proteína truncada con pérdida de función [161], mientras que la segunda se ha asociado con una baja abundancia de la proteína [162]. Las células tumorales que presentan estas mutaciones muestran un incremento de los receptores FDZ en la membrana citoplasmática y una mayor sensibilidad a los ligandos Wnt [161,162]. Además, estos tumores presentan con frecuencia mutaciones en *ZNRF3* y el silenciamiento epigenético de reguladores negativos de la vía, entre los que se incluye *AXIN2*, *NKD1* y *NOTUM* [163]. En conjunto, estas alteraciones podrían aumentar la intensidad y la duración de la señalización inducida por los ligandos Wnt en las células tumorales con mutaciones en *RNF43* y *ZNRF4* [154].

Debido a esta diversidad de alteraciones en la vía Wnt canónica y a la cooperación con otras vías de señalización, es plausible esperar una considerable variabilidad en la activación de la vía Wnt canónica y en la transcripción de sus genes blancos. La desregulación de esta vía confiere una alta capacidad proliferativa y supervivencia celular durante el desarrollo del cáncer [164-166]. Además, dada su participación en el mantenimiento de poblaciones con fenotipo troncal y la regulación de procesos como migración celular, invasión e inmunoevasión, esta vía ha sido implicada en la progresión del cáncer a fenotipos más agresivos [167,168].

1.4.3.1 Las vías Wnt no canónicas y cáncer colorrectal

En comparación con la vía Wnt canónica, la activación de las vías Wnt no canónicas en el CRC no ha sido asociada con mutaciones puntuales; su desregulación se debe principalmente a una expresión incrementada de sus componentes, posiblemente debido a la reactivación de programas de desarrollo latentes en las células tumorales [169].

De acuerdo con esta premisa, los efectos tumorigénicos de los ligandos Wnt no canónicos están relacionados con procesos de migración e invasión celular. Las células de CRC se han caracterizado por presentar una alta expresión de ligandos Wnt y receptores FDZ (FDZ 1 y FDZ 2), especialmente en el frente de invasión de tumores pobremente diferenciados [170]. Consistente con esto, Gujral *et al.* (2014) encontraron que la expresión de Wnt5a/b y FDZ2 correlaciona positivamente con marcadores de EMT en líneas de CRC pobremente diferenciadas [171]. Los ligandos Wnt5a y Wnt3a inducen la migración celular mediante la activación de las vías Wnt/Ca²⁺ y Wnt/RhoA/ROCK, independientemente de su efecto sobre la actividad transcripcional de β-catenina/TCF [136]. Por su parte, el ligando Wnt11 induce proliferación, migración

e invasividad celular en CRC, posiblemente mediante la activación de JNK y c-Jun, lo cual sugiere la activación de vías no canónicas [172].

La activación de las vías Wnt no canónicas, además de desempeñar un papel activo durante la migración e invasión celular en el cáncer, ha sido recientemente asociada con la diferenciación celular en el epitelio intestinal [152], así como con la inducción de características troncales en el CRC [173]. Según lo evidenciado por *Colozza et al.* (2023), la sobreactivación de la vía Wnt/PCP en el epitelio intestinal conduce a la hiperplasia de las células Paneth, que, a través de un aumento en la secreción de Wnt3 y EGF, pueden fomentar la formación de un nicho protumorigénico que soporta el crecimiento de las células tumorales [174]. Por otro lado, *Sarabia et al.* (2023) demostraron que los ligandos Wnt3a y Wnt5a desempeñan un papel relevante en la inducción de características troncales, como la capacidad de formación de esferoides, independientemente de su efecto sobre la vía Wnt canónica [173]. A través de ensayos *in vitro* con inhibidores de fosfolipasa C y NFAT, estos autores evidenciaron que la vía Wnt/Ca²⁺ contribuye al mantenimiento de la capacidad de autorrenovación de la población de CSCs de líneas celulares de CRC [173]

1.4.4 Antecedentes de las vías Wnt en quimioresistencia en cáncer colorrectal

1.4.4.1 Vía Wnt/ β -catenina (canónica)

Debido a la desregulación y la importancia de la vía Wnt en la progresión del CRC, se ha considerado como una posible fuente de blancos terapéuticos para erradicar tanto la masa tumoral como las poblaciones de CSCs presentes en los tumores. La creciente evidencia experimental respalda la idea de que la inhibición de esta vía podría superar la resistencia observada durante la quimioterapia [175, 176]. La activación de β -catenina/TCF, ya sea mediante ligandos o mutaciones, puede conferir resistencia a la terapia convencional al inducir la transcripción de genes como *SNAI1*, *BIRC5* (que codifica para la survivina), genes que codifican transportadores ABC, proteínas involucradas en la reparación del ADN y progresión del ciclo celular [175, 177] (Tabla 2). Además de promover la supervivencia de células tumorales no troncales, la vía Wnt canónica ha sido reconocida por su papel en el mantenimiento de las CSCs, consideradas la causa principal de la resistencia a la terapia convencional y la recurrencia del cáncer.

Tabla 2. Quimioresistencia mediada por la vía Wnt/ β -catenina en CRC.

Modelo	Fármaco	Efecto en quimioresistencia	REF
HCT116 SW620	5FU	Inhibición de MASTL: \uparrow GSK-3 β , \downarrow β -catenina y de su localización nuclear y actividad transcripcional, lo que conduce a la sensibilización al tratamiento. \downarrow Survivina y Bcl-XL.	178
SW1463	5FU Radioterapia 4Gy	-Tratamiento prolongado: \uparrow Respuesta mediada por PARP (reparación del DNA) ante la re-exposición al tratamiento. -siRNA contra β -catenina sensibiliza a las células al 5FU.	179
SW480 LS174T	TMZ	-Silenciamiento de β -catenina aumenta la citotoxicidad del fármaco mediante la regulación negativa de MGMT. -La sobre-expresión de <i>MGMT</i> anula el efecto observado por el silenciamiento de β -catenina.	180
HCT-8	VCR	-Silenciamiento de <i>DVL1-3</i> : quimio-sensibilización. Sobre-expresión de <i>DVL</i> : \uparrow ABCB1, \uparrow MRP2, \uparrow Survivina, \uparrow Bcl-2. -Silenciamiento de β -catenina inhibió el efecto de la sobreexpresión de <i>DVL</i> .	181
SW620 RKO HCT116	5FU	-Células resistentes: \uparrow HMGA2/DVL2/señalización Wnt/ β -catenina. -Silenciamiento de <i>HMGA2</i> : \downarrow β -catenina debido a una menor expresión de <i>DVL2</i>	182
HCT-8 Población lateral (SP)	VCR y OXA	-Tratamiento crónico induce la adquisición de resistencia: \uparrow FOXM1/DVL2/SNAI1. -Silenciamiento <i>DVL2</i> : Inhibe la actividad β -catenina/TCF mediada por FOXM1 y la expresión de SNAI1 (<i>DVL2</i> actúa como coactivador transcripcional)	183
SW480	IRI y PCX	siRNA de β -catenina: \downarrow ABCB1 y ABCG2, y conduce a la sensibilización a la terapia	184
HCT-8	5FU	-Tratamiento crónico promueve la adquisición de resistencia: \uparrow β -catenina/TCF \rightarrow \downarrow CHK1/ p53 (wt) -Tratamiento con Wnt3a: \uparrow resistencia debido a \downarrow p-CHK1. IWP-2 inhibidor de porcupina: sensibilización al 5FU y ocasiona un \uparrow p-CHK1/P53	185

MASTL: cinasa serina/treonina asociada a microtúbulos; PARP: poli (ADP-ribosa) polimerasa; MGMT: metil-guanina metiltransferasa; HMGA2: grupo A2 de alta movilidad; ABCB1: miembro 1 de la subfamilia B con un casete de unión a ATP; MRP2: proteína 2 asociada a resistencia a multifármacos; FOXM1: proteína M1 FOX; CHK1: cinasa 1 de punto de control. TMZ: temozolamida; OXA: oxaliplatino; VCR: vincristina; IRI: irinotecan; PCX: paclitaxel.

La evidencia experimental presentada por varios autores demuestra que la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina retrasa el crecimiento de tumores, reduce la capacidad de formación de esferoides y disminuye la expresión de marcadores asociados a troncalidad, como CD44 y CD133 [186-188]. A nivel molecular, el complejo transcripcional de β -catenina/TCF induce la transcripción de *MYC*, el cual, además de regular diversos procesos celulares como la proliferación, supervivencia y apoptosis, está implicado en el mantenimiento del fenotipo troncal en CRC mediante la inducción transcripcional de *SOX2* [187]. La pérdida de características troncales, debido a la inhibición o reducción de los niveles de activación de la vía Wnt canónica mediante el restablecimiento de reguladores negativos como AXIN2, se ha asociado con la sensibilización a la quimioterapia y la ausencia de recurrencia del tumor después de la resección quirúrgica en ensayos de xenotransplante [186]. Además, la inhibición de la secreción de Wnt3a a través del uso de inhibidores de porcupina retrasa el crecimiento de tumores después de la terapia con 5FU, debido a la supresión de la vía Wnt/ β -catenina en las células residuales [158].

En contraste con el modelo general de la vía Wnt canónica, como una de las principales vías de señalización que promueven la progresión del cáncer y la tolerancia a la terapia en el CRC, varios estudios han sugerido que una baja activación de esta vía podría estar relacionada con la adquisición de un fenotipo más agresivo [189, 190]. Entre estos estudios, Guiney *et al.* (2018) informaron que los pacientes con tumores de CRC que exhiben un mayor enriquecimiento de genes blancos de la vía Wnt canónica muestran una mejor respuesta clínica (supervivencia global y supervivencia libre de recaída) en comparación con aquellos pacientes con una menor expresión de los blancos de esta vía [191]. Resultados similares fueron reportados por Isella *et al.* (2018), quienes, en un esfuerzo por categorizar tumores de CRC desprovistos de células estromales, identificaron 5 subtipos (referenciados como CRIS). De estos subtipos, aquellos con una mayor actividad de la vía Wnt canónica (CRIS-C, D, E) mostraron un mejor pronóstico después de la terapia adyuvante con 5FU y oxaliplatino, en comparación con los subtipos caracterizados por una baja actividad de la vía (CRIS-A, B) [192]. Un estudio posterior en líneas celulares de CRC demostró una clara diferencia en la respuesta a la terapia con 5FU y oxaliplatino entre las líneas celulares que exhiben un mayor y menor enriquecimiento de genes asociados con la activación de la vía Wnt canónica. Ensayos *in vitro* e *in vivo* revelaron que las células con una baja expresión de los blancos de esta vía fueron más resistentes al tratamiento [193].

Aunque estos estudios correlativos sugieren que subtipos de CRC con niveles moderados o bajos de actividad de la vía Wnt canónica tienden a presentar mayor recurrencia después de la terapia oncológica, esto se contrapone a los antecedentes descritos durante la primera parte de esta sección, en los cuales se sugiere que la inhibición de esta vía de señalización podría mejorar la respuesta al régimen quimioterapéutico. Dada esta evidencia contrastante, no es claro si la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina podría contribuir a una mejor respuesta a la terapia y a disminuir la recurrencia del cáncer.

1.4.4.2 Vías Wnt no canónicas.

A diferencia de la creciente información sobre los mecanismos de regulación de la vía Wnt canónica y su contribución a la supervivencia celular en CRC, se sabe muy poco acerca de la contribución de las vías Wnt no canónicas en la quimioresistencia. Estudios previos han revelado que el promotor del gen *WNT5A* se encuentra frecuentemente metilado en etapas tempranas del desarrollo del CRC. Sin embargo, en tumores de CRC avanzados, la expresión autócrina y parácrina de Wnt5a promueve migración e invasión celular independientemente de la actividad co-transcripcional de β -catenina [194]. Jiang *et al.* (2017) encontraron que el estado de metilación del promotor de *WNT5A* correlaciona con una mejor respuesta a la terapia con 5FU. Además, la restauración de la expresión de *WNT5A* mediante el agente desmetilante 5-Aza-2'-deoxicitidina incrementa la supervivencia de líneas celulares de CRC que se caracterizaron por exhibir bajos niveles de Wnt5a [195].

Estudios sobre el papel de Wnt5a en la resistencia farmacológica en otros tipos de cáncer han mostrado que el estímulo con este ligando incrementa los niveles de ciclina D1, proteínas antiapoptóticas Bcl2, bombas de eflujo y además induce la transición epitelio mesénquima; mecanismos que las células utilizan para persistir durante el tratamiento quimioterapéutico. El ligando Wnt5a puede desencadenar estos cambios mediante la inducción de múltiples cascadas de señalización, que conducen a la activación de AKT, ERK, STAT3, PKC, NFAT1 y YAP, dependiendo del contexto celular [195-199], lo cual puede promover tolerancia a múltiples fármacos.

En el contexto de CRC, Fuertes *et al.* (2023) demostraron que la señalización inducida por Wnt5/ROR2 es clave en el mantenimiento del fenotipo troncal, la capacidad tumorigénica, invasiva y metastásica de células tumorales de CRC. Asimismo, estos autores demostraron que la resistencia al tratamiento con cisplatino y oxaliplatino fue mediado por este eje de señalización a través de la modulación río abajo de los niveles de SNAI1. La inhibición de este eje de señalización, ya sea mediante el silenciamiento de *ROR2* o la inhibición de la secreción de ligandos Wnt, anuló el aumento de SNAI1 inducido en respuesta a la quimioterapia y mejoró el efecto citotóxico de esta [200].

Por otro lado, recientemente se demostró que la vía Wnt/ Ca^{2+} contribuye a la inducción y mantenimiento de la capacidad de autorrenovación *in vitro* de las CSCs de CRC [173], pero se desconoce si su activación contribuye a la quimioresistencia de esta población celular. En particular, los factores de transcripción NFAT, efectores de la vía Wnt/ Ca^{2+} , han sido implicados en la regulación de diversos procesos celulares, como apoptosis y ciclo celular, cruciales durante la terapia [147]. Se ha informado una alta expresión de los NFAT (1-4) en varias líneas celulares de CRC, lo que sugiere un papel activo de estas proteínas [173, 201]. Sin embargo, la función específica de cada NFAT en las CSCs permanece por elucidar.

En conclusión, esta evidencia sugiere que tanto la vía Wnt canónica como las vías Wnt no canónicas podrían desempeñar un papel significativo en la supervivencia celular

durante la quimioterapia en CRC. Para someter a prueba esta hipótesis, se necesitan realizar estudios que investiguen los mecanismos de regulación de estas vías y su implicación durante la terapia farmacológica.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presencia de subpoblaciones celulares con fenotipo troncal desempeña un papel esencial en la promoción de resistencia al tratamiento, debido a su alta adaptabilidad y capacidad de supervivencia frente a alteraciones en el microambiente tumoral y diferentes tipos de estrés. La búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que permitan erradicar esta subpoblación celular es de vital importancia y demanda la comprensión precisa de los mecanismos celulares y moleculares mediante los cuales esta subpoblación celular tolera y persiste durante y después de la terapia oncológica.

La vía Wnt/ β -catenina es clave en el mantenimiento de las CSCs dentro del tumor y en la promoción de resistencia al tratamiento antineoplásico en células tumorales no troncales. Sin embargo, un peor pronóstico y una mayor probabilidad de recurrencia se ha correlacionado con una baja expresión de genes blanco de esta vía. Además, aunque las vías Wnt no canónicas han mostrado ser cruciales en migración e invasión celular, los estudios sobre su implicación en la resistencia a la terapia en CRC son limitados, especialmente en la vía Wnt/ Ca^{2+} .

Por lo tanto, en el presente trabajo, se plantea la siguiente pregunta de investigación:
¿Cómo participan las vías Wnt/ β -catenina y Wnt/ Ca^{2+} en la resistencia al 5FU en las células tumorales con fenotipo troncal?

3. HIPÓTESIS

La vías de señalización Wnt/ β -catenina (vía canónica) y la variante no canónica Wnt/ Ca^{2+} /NFAT promueven mecanismos de supervivencia en las células tumorales con fenotipo troncal de CRC, generando resistencia al agente citotóxico 5-FU.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel de la vía Wnt en la quimioresistencia de células cancerosas con fenotipo troncal mediante el uso de esferoides de líneas celulares de CRC, que exhiben diferentes contextos de la vía Wnt/ β -catenina.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar el cultivo de esferoides de líneas celulares de CRC como modelo de enriquecimiento de células con fenotipo troncal.
2. Determinar el efecto del 5FU en la viabilidad, clonogenicidad y ciclo celular de esferoides de líneas celulares de CRC que presentan diferentes grados de resistencia/sensibilidad al 5FU.
3. Analizar el estado de activación de la vía de señalización Wnt canónica en esferoides que presentan resistencia o sensibilidad al 5FU.
4. Evaluar el efecto de la activación/inhibición de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en la inducción de mecanismos de supervivencia frente al 5FU.
5. Determinar si la vía Wnt/ Ca^{2+} /NFAT contribuye a la supervivencia de esferoides ante la muerte inducida por 5FU.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Reactivos y anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios que se utilizaron durante la realización de este estudio se especifican en la tabla 3. El reactivo AquaZombie se obtuvo de *Biolegend* (San Diego, CA, EUA). El 5-fluorouracilo (5FU) y el reactivo hidroxicloroquina (HCQ) se adquirieron de *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA). Los ligandos Wnt3a y Wnt5a se obtuvieron de *R&D Systems* (Minneapolis, MN, EUA). El reactivo Adavivint (SM04690) se adquirió de *Selleckchem* (Houston, TX, EUA). El reactivo 11R-VIVIT se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania).

Tabla 3. Anticuerpos

Anticuerpos	Compañía
anti-fosfo- γ H2AX de conejo	Cell Signaling Technology
anti-PARP escindida (o cortada) de conejo	Cell Signaling Technology
anti-fosfo-CDK2 de conejo	Cell Signaling Technology
anti-p21 de conejo	Cell Signaling Technology
anti-Ki67 de ratón	ThermoFisher Scientific
anti- β -catenina no fosforilada (Ser33/37/Thr41) de conejo	Cell Signaling Technology
anti- β -catenina total de ratón	Santa Cruz Biotechnology
anti-TCF4 de conejo	Santa Cruz Biotechnology
anti-TCF1 de conejo	Cell Signaling Technology
anti-cMyc de ratón	Santa Cruz Biotechnology
anti-Axin2 de conejo	Cell Signaling Technology
anti-Ciclina D1 de ratón	Santa Cruz Biotechnology
anti-Bcl2 de ratón	Santa Cruz Biotechnology
anti-survivina de conejo	Cell Signaling Technology
anti-NFAT1 de ratón	BD Biosciences
anti-NFAT2 de ratón	BD Biosciences
anti-CD44 de ratón conjugado a APC (Aloficocianina)	BD Biosciences
anti-CD133 de ratón conjugado a PE (ficoeritrina)	ThermoFisher Scientific
anti-Lgr5 de ratón conjugado a APC-Vio770	Miltenyic Biotec
anti-CD44v6 de ratón	ThermoFisher Scientific
anti-Lgr5 de ratón	ThermoFisher Scientific
anti-CD133 de conejo	Abcam
anti-Sox2 de ratón	Santa Cruz Biotechnology
anti-Oct4 de ratón	Santa Cruz Biotechnology
anti-CK20 de conejo	Cell Signaling Technology
anti-LC3B de conejo	Novus Biologicals
anti-SQSTM1/p62 de conejo	Cell Signaling Technology
anti-GAPDH de ratón	Santa Cruz Biotechnology
anti- α -tubulina de ratón	MilliporeSigma
anti-mouse de cabra acoplado a FITC	Jackson ImmunoResearch
anti-mouse de cabra acoplado a la peroxidasa de rábano	Pierce
anti-conejo de cabra acoplada a la peroxidasa de rábano	Pierce

5.2 Plásmidos

El plásmido reportero TOP-GFP-mCherry fue donado por Ramesh Shivdasani (Addgene 35491). El plásmido que codifica para la dominante negativa TCF4 (DNTCF4) [pPGS dnTcf-4(deltaN41)] fue donado por Eric Fearon (Addgene 19284). Los plásmidos reporteros M50 Super8x TOPFlash y M51 Super 8x FOPFlash fueron donados por Randall Moon (Addgene 12456 and 12457).

5.3 Líneas celulares

Las líneas celulares de CRC que se utilizaron en este trabajo fueron las siguientes: RKO, SW480, HT29 y HCT-116, establecidas a partir de células aisladas de tumores primarios, y la línea celular SW620 establecida a partir de células aisladas de metástasis a nódulos linfáticos. En particular, la línea celular SW620 proviene del mismo paciente de donde se derivó la línea celular SW480. Todas las líneas celulares se obtuvieron de la compañía *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, VA, USA). La línea celular RKO representa el prototipo de CRC caracterizada por mutaciones en *BRAF*, que expresan la forma silvestre de *TP53* y no exhiben activación basal de la vía Wnt/ β -catenina. Las líneas celulares SW (SW480 y SW620), HT29 y HCT-116 presentan mutaciones activadoras de la vía Wnt/ β -catenina (Tabla 4) y mutaciones en *TP53* (Tabla 4). También se utilizaron células de un cultivo primario (VCL16) derivado de una biopsia rectal de un paciente con adenoma veloso con displasia de alto grado, que presenta una mutación en el gen *CTNNB1* (pdel Ser45). La muestra de tumor fue proporcionada por el Hospital General de México “Eduardo Liceaga”. La genotipificación se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en México.

Tabla 4. Perfil de mutaciones en las líneas celulares de CRC utilizadas en el presente proyecto.

Líneas celulares	Perfil de mutaciones (cambio en la secuencia de la proteína)
RKO	BRAF (V600E); TP53 (silvestre); RNF43 (X659fs) ¹ ; ZNRF3 (X249fs, G481W) ¹ ; PIK3CA (p.H1047R)
SW480	KRAS (pG12V); TP53 (R273H); APC(pQ1338*)
SW620	KRAS (pG12V); TP53 (R273H); APC(pQ1338*)
HC-T116	KRAS (pG13D); TP53 (silvestre); β -catenina (pdelSer45); PIK3CA (p.H1047R)
HT-29	BRAF (V600E); TP53 (R273H); APC (pT1556fs*3); PIK3CA (p.P449T)

Información suministrada por ATCC; ¹Bond *et al.* 2016 [202].

5.4 Cultivo celular

Cultivos en monocapa (cultivos 2D): Las líneas celulares RKO y HCT116 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina, antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomycin) y 0.25 μ g/mL de anfotericina. La células SW480, SW620 y VCL16 se cultivaron en medio

DMEM-F12 suplementado con 5% de SFB, 2 mM de L-glutamina, antibióticos y anfotericina. Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 95% de humedad y 5% de CO₂.

Cultivos de esferoides (cultivos 3D): Las células de los cultivos en monocapa se disociaron con tripsina y se sembraron a una densidad de 1x10³ células/mL en placas de baja adherencia con medio DMEM-F12 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 2% (v/v) de B27 (1X), 20 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés), antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 10 µg/mL de gentamicina) y 0.25 µg/mL de anfotericina. Las células se incubaron entre 11 y 14 días para la formación de esferoides. Para análisis posteriores y cultivos secuenciales, los esferoides se disociaron a célula única con Tryple™Express (Gibco, Waltham, MA, USA) según las indicaciones del fabricante. La eficiencia de formación de esferoides (EFS) se determinó mediante el conteo de esferoides al séptimo día de cultivo, y se utilizó la siguiente fórmula para su cuantificación:

$$EFS: \left[\frac{\text{Número de esferoides}}{\text{Número de células sembradas}} \right] * 100$$

Los tratamientos experimentales con los diferentes compuestos se realizaron en esferoides de segunda generación o segundo pasaje, los cuales se obtuvieron a partir de los esferoides de primera generación, derivados de células disociadas de cultivos en monocapa.

5.5 Detección de proteínas en superficie celular

Para la detección de proteínas en la superficie celular, las células se disociaron con Tryple™Express, se lavaron con PBS 1X y se colectaron por centrifugación a 2000 rpm. Posteriormente, las células se resuspendieron en una solución del reactivo Aqua Zombie en PBS 1X (tinción de células no viables) y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con los anticuerpos anti-CD44 acoplado a APC, anti-CD133 acoplado a PE o anti-Lgr5 acoplado a APC-Vio770 por 20 min a 4 °C en oscuridad. Para la detección de CD44v6 en la superficie celular, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-CD44v6 por 30 min a 4 °C. Posteriormente, se lavaron y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-FITC por 30 min a 4 °C en oscuridad. Todas las muestras se lavaron, se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en una solución de PBS 1X para su adquisición en un citómetro Attune NxT. Los datos obtenidos se analizaron con el software FlowJo v10 (BD, Ashland, OR, EUA).

5.6 Western blot

Las células se incubaron con la solución de lisis RIPA IX (50 mM Tris-HCl pH = 7,4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0,1% SDS, 1% NP-40, 0,5 % desoxicolato de sodio, inhibidores de proteasas y fosfatasa) por al menos 1 h a 4 °C; y las muestras se agitaron en vortex cada 10 min. El extracto de proteínas se obtuvo mediante

centrifugación a 13000 rpm por 10 min a 4 °C, y la concentración de proteína se determinó por el método de Bradford.

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con concentraciones entre el 8.5 y 13.5% bajo condiciones desnaturalizantes. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hércules, CA, USA) en una cámara de transferencia húmeda. Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% o albúmina sérica bovina al 3% en una solución amortiguadora de TBS (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6) durante 1 h. Las membranas se incubaron a 4 °C con el correspondiente anticuerpo primario durante un período que varió entre 16 y 48 h, dependiendo del anticuerpo utilizado. Después, las membranas se lavaron varias veces con el amortiguador TBS-Tween y se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano picante durante 2 h en agitación constante. Tras varios lavados con el amortiguador TBS-Tween, la detección de proteínas se realizó mediante incubación con el kit Pierce™ ECL SuperSignal de *ThermoFisher Scientific* (Waltham, MA, EUA) en el fotodocumentador C-DiGit Blot (LICOR-Biosciences, Lincoln, NE, EUA). El análisis de imágenes se llevó a cabo con el software Image Studio™ Lite v5.2 (LI-COR Biosciences). Para corregir las diferencias en la cantidad de proteína cargada en cada carril, se midieron los niveles de GAPDH, α -tubulina, o se utilizó la tinción con rojo de ponceau como indicador de los niveles de proteína total.

5.7 Viabilidad celular

Se realizaron curvas dosis-respuesta del compuesto 5FU (0.2 μ M- 5000 μ M) para evaluar su eficacia a las 72h de tratamiento en las líneas celulares RKO, SW480 y SW620 cultivadas en monocapa y esferoides. La viabilidad celular se determinó inicialmente por el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio). Al término del tratamiento, las células se incubaron en una solución de 0.5 mg/mL de MTT y se incubaron a 37°C durante 3h en cultivos en monocapa y durante 24h en cultivos de esferoides. Para solubilizar los cristales de formazan precipitados se adicionaron 100 μ L de SDS al 10% en 0.01N de HCl y se incubó por 24h. La absorbancia se midió a 570 nm y los datos se expresaron como el porcentaje de reducción de MTT generado por las células tratadas con 5FU, en comparación con las células tratadas con el vehículo (control). Los datos se analizaron con el software GraphPad, y el ajuste de las curvas se realizó por regresión no lineal de acuerdo con el modelo de pendiente variable (log [5FU] vs respuesta normalizada [pendiente variable]).

Para determinar el efecto del 5FU en la viabilidad celular de esferoides de líneas celulares de CRC, se utilizaron esferoides de segunda generación (o segundo pasaje). En el undécimo día de la formación de esferoides, estos se trataron con diferentes concentraciones de 5FU (10 μ M-5000 μ M) por 72 h. La viabilidad celular se determinó con el Kit CellTiter-Glo 3D de Promega (Madison, WI, USA), que se basa en la cuantificación de los niveles de ATP como marcador de células metabólicamente

activas. Este kit permite determinar cambios en los niveles de ATP entre el control y los cultivos tratados con 5FU como una medida de la viabilidad celular. La luminiscencia (RLU, unidades relativas de luz) se midió en un lector multimodal de microplacas.

5.8 Análisis de ciclo celular

Para determinar la distribución celular entre las diferentes fases del ciclo celular, se realizó un análisis simultáneo de los niveles de Ki67 y el contenido de DNA con yoduro de propidio (PI). Las células disociadas se fijaron y permeabilizaron con etanol frío al 70 % a -20 °C durante al menos 2 h. El día del análisis, las células se colectaron por centrifugación a 2500 rpm por 5 min y se lavaron 2 veces con una solución amortiguadora FACS (BSA al 0.5% con 1 mM de EDTA en PBS 1X). Las células se incubaron con el anticuerpo anti-Ki-67 de ratón por 30 min a temperatura ambiente, se lavaron con la solución FACS y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado al fluoróforo FITC por 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Después, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con una solución de PI (100 µg/mL RNAsa, 20µg/mL PI, 2mM MgCl₂ en PBS 1X) por 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Se utilizaron como control negativo células teñidas únicamente con el anticuerpo secundario. Las muestras se analizaron en un citómetro Attune NXT y los datos obtenidos se procesaron con el software FlowJo v10. La discriminación entre células en fase Go y G1, que presentan el mismo contenido de DNA (2n), se determinó por la ausencia del marcador de proliferación Ki67 en células en fase Go.

5.9 Proliferación celular dependiente e independiente de anclaje

Los esferoides tratados se disociaron a célula única, se contaron con azul de tripano y se sembraron a una densidad de 5000 células (viables)/mL en placas TC- tratadas (para adherencia celular) y placas de baja adherencia para determinar la capacidad de proliferar después del tratamiento farmacológico en condiciones dependientes e independientes de anclaje, respectivamente.

Proliferación dependiente de anclaje: las células cultivadas en placas TC- tratadas se mantuvieron hasta por 21 días en medio DMEM o DMEM-F12 suplementado con SFB al 10% o 5%, según las indicaciones de crecimiento de cada línea celular en cultivos en monocapa descritas anteriormente. Los cultivos de 7, 14 y 21 días de crecimiento se fijaron con metanol frío a -20 °C, y posteriormente las células se tiñeron con una solución de cristal violeta al 0.5% para su visualización. La eficiencia de formación de colonias (EFC) se determinó por conteo de colonias con el analizador de partículas del software Image J (Institute of Health website, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

Proliferación independiente de anclaje: las células cultivadas en placas de baja adherencia se mantuvieron por 21 días en medio de crecimiento de esferoides descrito anteriormente. Se tomaron fotografías de los cultivos a los 7, 14 y 21 días de incubación para el registro de colonias emergentes; a los 21 días, las células se

colectaron y se determinó la proporción de células viables mediante tinción con el reactivo AquaZombie (no permeable en células viables) y se realizó el análisis de las muestras por citometría de flujo. Los cultivos de células derivadas de esferoides de SW620 tratados con 5FU y con o sin Adavivint se mantuvieron por 40d, se tomaron fotografías de cada pozo y el número de esferoides se determinó por cada campo visual fotografiado.

5.10 Ensayo de gen reportero TOP

Las células se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad celular de 2.5×10^4 células por pozo. Después de 24 h de crecimiento, las células se transfectaron con 200 ng del plásmido reportero (M50 Super 8xTOPFlash) o del plásmido control (Super 8x FOPFlash), junto con 20 ng del plásmido pRL Luciferasa (control de transfección), en medio de cultivo sin SFB, ni antibióticos. A las 24h de transfección, se realizó un recambio de medio y, después de 6 h, las células se lisaron. La actividad del reportero se midió con el kit de ensayo de luciferasa dual de Promega (Madison, WI, USA) y la luminiscencia fue detectada en un lector de placas multimodal. Los valores de luminiscencia se normalizaron respecto a la actividad luciferasa de *Renilla*.

Para determinar la actividad co-transcripcional de β -catenina en esferoides, las células RKO y SW480 fueron transducidas con el plásmido TOP-GFP-m.Cherry. Las células transducidas positivas para mCherry, se aislaron en placas de 96 pozos (una célula por pozo) mediante el separador celular FACS ARIA. El porcentaje de positividad a mCherry se confirmó en el citómetro de adquisición Attune NxT. Las células RKO y SW480 positivas para mCherry (RKO^{TOP-GFP}, SW480^{TOP-GFP}) se sembraron en placas de baja adherencia para formar esferoides. Los esferoides RKO^{TOP-GFP} de 10 días de formación se trataron con o sin ligandos Wnt (300 ng/mL) por 24h, y los esferoides SW480^{TOP-GFP} de 9 días de crecimiento se trataron con Adavivint por 72h. Al término del tratamiento, los esferoides se disociaron y la actividad del reportero TOP-GFP se determinó por citometría de flujo.

5.11 Inhibición de la vía de señalización Wnt canónica

Expresión de una dominante negativa para TCF4 (dnTCF4): las células SW480 y SW620 se sembraron en una placa de 24 pozos a una densidad de 1.5×10^5 células por pozo. A las 24h de la siembra, las células se transfectaron con 1.5 μ g del plásmido pPGS dnTcf-4(deltaN41) o del plásmido vacío (plásmido pCDNA 3.1 sin la secuencia codificante para la proteína dnTCF4). Las células transfectadas se mantuvieron en medio de crecimiento suplementado con geneticina (G418) durante 15 días para la selección de células resistentes. Posteriormente, para confirmar la inhibición de la actividad transcripcional de β -catenina/TCF en las colonias establecidas, se midió la actividad co-transcripcional de β -catenina mediante el ensayo del reportero TOP. Este ensayo se realizó durante varios pasajes para determinar la estabilidad de la inhibición de la actividad del complejo transcripcional β -catenina/TCF.

Inhibición farmacológica con Adavivint: para evaluar la eficacia del inhibidor Adavivint, los cultivos en monocapa y esferoides de segunda generación (de 9 días de crecimiento) se trataron con diferentes concentraciones del compuesto (0.03, 0.1 y 1 μ M) por 48 h y 72 h, respectivamente. Al término del tratamiento, las células se lisaron y se determinaron los niveles de proteína de β -catenina, TCF1, TCF4, Axin2 y c-Myc mediante *Western blot*.

5.12 Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media (EEM) de al menos 3 experimentos independientes, a menos de que se indique lo contrario. Para el análisis de todos los datos, se utilizó el software GraphPad Prism 5.0. El análisis comparativo entre dos grupos se llevó a cabo mediante la prueba t de Student. El análisis comparativo entre 3 o más grupos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

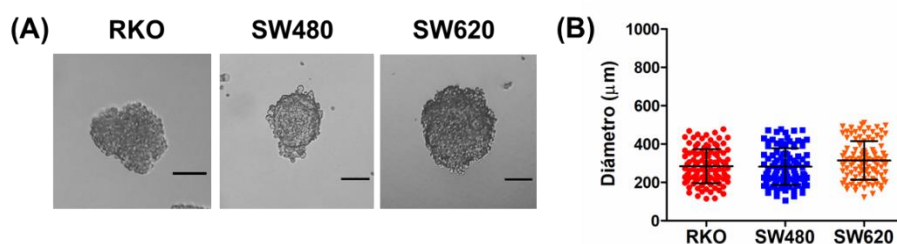
6. RESULTADOS

Con el objetivo de evaluar cómo las vías Wnt participan en la quimioresistencia de las CSCs, se utilizó el modelo *in vitro* de formación de esferoides para enriquecer células con fenotipo troncal de las líneas celulares RKO, SW480 y SW620 de CRC. En cultivos en monocapa, estas líneas celulares se han caracterizado por exhibir diferentes niveles basales de activación de la vía Wnt/ β -catenina. La línea celular RKO depende de ligandos Wnt para la estabilización de β -catenina [136], mientras que las líneas celulares SW480 y SW620 presentan una mutación en APC. Esta mutación resulta en la producción de una proteína truncada y la activación basal del complejo transcripcional β -catenina/TCF independiente de la estimulación con ligandos Wnt [155].

Para validar el modelo de trabajo empleado durante este estudio, se llevaron a cabo ensayos con el fin de verificar que el cultivo de esferoides favorece el mantenimiento/enriquecimiento de células con características troncales de las líneas celulares mencionadas anteriormente. Estos ensayos y los resultados obtenidos se describen en detalle en la siguiente sección.

6.1 Los cultivos de esferoides de líneas de cancer colorrectal se enriquecen de células con fenotipo troncal

El cultivo de esferoides se ha utilizado ampliamente en la investigación de CSCs [93, 203, 204]. Para determinar si las líneas celulares RKO, SW480 y SW620 tienen la capacidad de sobrevivir y proliferar en las condiciones de este cultivo, las células se sembraron a baja densidad clonal en placas no adherentes y en ausencia de SFB, tal como se describe en la metodología. En la Figura 9A se muestra una fotografía representativa de los esferoides que forma cada línea celular, donde se pueden distinguir diferencias morfológicas entre los esferoides de estas líneas celulares. Mientras que los esferoides de RKO y SW620 son menos compactos y muestran bordes menos definidos, los esferoides de SW480 se caracterizan por su mayor compactación y mejor definición de sus bordes. En relación a su tamaño, no se observaron diferencias entre las líneas celulares, e independientemente de su origen, el diámetro de los esferoides fue heterogéneo (Figura 9B), lo cual puede estar relacionado con el estado proliferativo de las células que conforman cada esferoide [93].



(desviación estándar) de 100 esferoides por cada línea celular. Diámetro promedio de los esferoides de RKO: $283 \pm 88.34 \mu\text{m}$, esferoides de SW480: $281 \pm 96.03 \mu\text{m}$, y esferoides SW620: $314 \pm 101 \mu\text{m}$.

Con el objetivo de determinar si el cultivo de formación de esferoides de las líneas celulares anteriormente mencionadas favorece el enriquecimiento de células con características troncales, se compararon los niveles de expresión de diversos marcadores de superficie asociados a la troncalidad entre los cultivos de esferoides de segunda generación y los cultivos en monocapa (también conocidos como cultivos 2D). Los marcadores evaluados fueron: LGR5, CD44, CD44v6 y CD133, comúnmente utilizados para caracterizar poblaciones de CSCs en el CRC tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* [88, 98, 205-207]

La evaluación de los niveles de expresión de LGR5 y CD44 en la membrana citoplasmática se llevó a cabo mediante tinción doble con anticuerpos acoplados para estas dos proteínas (Figura 10A-7D). Este análisis reveló que los niveles totales de CD44 no cambian entre los dos tipos de cultivos en todas las líneas celulares evaluadas (Figura 10B). Sin embargo, se observó un aumento en la proporción de células positivas para LGR5 en los esferoides de RKO y SW480, mientras que en SW620 no se observaron cambios en comparación con los cultivos en monocapa (Figura 10C).

El análisis de las poblaciones doble positivas para CD44 y LGR5 reveló que la mayoría de las células LGR5+ presentes en los esferoides de RKO y SW480 también expresan CD44 (LGR5+CD44+). En contraste, los cultivos de esferoides de SW620 mostraron una proporción similar de células LGR5+CD44+ y LGR5+CD44- en comparación con los cultivos en monocapa, que exhiben una mayor proporción de células LGR5+CD44+ (Figura 10A y 10D). La utilización de múltiples marcadores, como LGR5 y CD44, podría mejorar la especificidad en la identificación de células con fenotipo troncal, según lo reportado por Leng *et al.* (2018). Estos autores demostraron que las células con un inmunofenotipo CD44+LGR5+ exhiben una mayor capacidad para formar esferoides y una mayor tasa de proliferación *in vivo*, en comparación con las células LGR5+CD44- en un modelo de xenotransplante subcutáneo [208]. Una mayor proporción de células LGR5+CD44- en los esferoides podría indicar la presencia de una subpoblación celular con diferente grado de troncalidad.

En cuanto a los otros marcadores, se observó un aumento en la proporción de células positivas para CD133 en los esferoides de las tres líneas celulares (Figura 10F y 10G), mientras que la población de células CD44v6+ no mostró alteraciones en comparación con los cultivos en monocapa (Figura 10E). En resumen, los resultados obtenidos del análisis de la expresión de marcadores de superficie reflejan la heterogeneidad celular dentro del cultivo de esferoides de una misma línea celular y entre cultivos de esferoides de diferentes líneas celulares; lo cual podría estar influenciado por factores genéticos y epigenéticos de cada línea celular, así como del microambiente celular establecido [86, 209, 210].

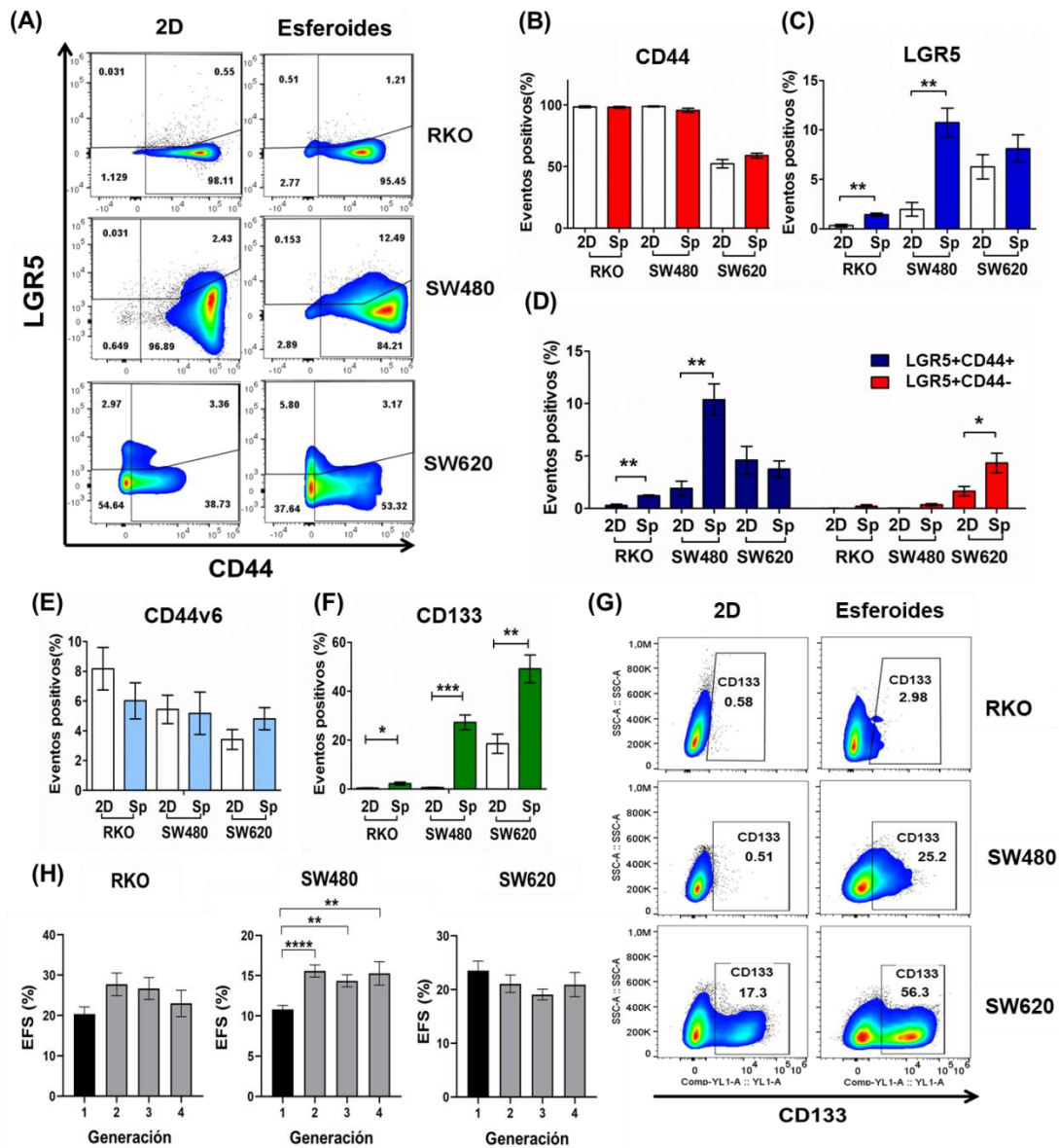


Figura 10. Caracterización de esferoides de líneas celulares de CRC como modelo de enriquecimiento de células con fenotipo troncal. Expresión comparativa de marcadores de superficie asociados con la troncalidad entre cultivos en monocapa (2D) y esferoides de segunda generación, de 11 días de crecimiento, de las líneas celulares de cáncer de colon RKO, SW480 y SW620. La proporción de células positivas para CD44 (A, B), Lgr5 (A, C), CD133 (F, G) y CD44v6 (E) se determinó por citometría de flujo. Eficiencia de formación de esferoides (EFS) de las líneas celulares RKO, SW480 y SW620 a lo largo de 4 generaciones (H). Los datos se representan por la media \pm EEM (error estándar de la media) de al menos 3 ensayos independientes. Prueba t de Student (A-D); ANOVA de una sola vía y posterior prueba Bonferroni de comparaciones múltiples (F); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. **** $p < 0.0001$.

Por otro lado, otra de las propiedades troncales evaluadas para determinar si los esferoides se enriquecen de CSCs fue la capacidad de autorrenovación, la cual determina la capacidad de las células troncales de duplicarse por largos periodos de tiempo, y de mantener su potencial proliferativo y de diferenciación. El análisis de autorrenovación de las células que formaron esferoides se realizó mediante cultivos

secuenciales. Para llevar a cabo este análisis, los esferoides formados a partir de células de cultivos en monocapa se consideraron como la primera generación; posteriormente, estos esferoides fueron disociados a células individuales y se sembraron a densidad clonal para la formación nuevamente de esferoides, denominados de segunda generación. Siguiendo esta metodología, se obtuvieron esferoides de tercera generación y, posteriormente, de cuarta generación.

En cada generación, se cuantificó la eficiencia de formación de esferoides (EFS), determinada mediante la relación entre el número de esferoides formados y el número de células sembradas por pozo. Esta relación indica la proporción de células dentro de un cultivo que son capaces de formar un esferoide por expansión clonal. En términos generales, la EFS se mantuvo constante durante los cultivos secuenciales, observándose un aumento estadísticamente significativo únicamente en la segunda generación de esferoides de SW480, que se mantuvo constante en las posteriores generaciones (Figura 10H). Estos resultados indican que una subpoblación celular dentro de estos cultivos retiene la capacidad de formar esferoides, lo que sugiere un proceso de autorrenovación celular.

El cultivo de esferoides como modelo de enriquecimiento de CSCs hace referencia a dos aspectos: primero, un aumento de la proporción relativa de CSCs en los cultivos de esferoides en comparación con los cultivos en monocapa; segundo, un aumento de la proporción relativa de CSCs a través de los cultivos secuenciales, lo que pone de manifiesto su expansión mediante división simétrica. Sin embargo, las CSCs también pueden dividirse de manera asimétrica, lo que mantiene constante el número de CSCs en el cultivo celular [211, 212]. Esto explicaría que la EFS de las tres líneas celulares se mantuviera constante y no se haya observado un incremento durante los cultivos secuenciales.

Estos resultados indican que el cultivo de esferoides permite el mantenimiento de una subpoblación de CSCs que se autorrenuevan y generan células con una expresión heterogénea de los marcadores LGR5, CD133, CD44 y CD44v6, dependiendo de la línea celular. Además, el uso de este tipo de cultivo como modelo de enriquecimiento de CSCs es respaldado por datos complementarios obtenidos en nuestro laboratorio y publicados por Sarabia *et al.* 2023. En este estudio se informó que los esferoides de RKO y SW480 contienen CSCs identificadas por una alta actividad del complejo transcripcional SOX2-OCT4 [173], asociado con el mantenimiento de la potencialidad de las células troncales embrionarias y el fenotipo troncal en varios tipos de cáncer.

6.2 El 5FU induce muerte y arresto del ciclo celular en esferoides de líneas celulares de cáncer colorrectal

Para evaluar la citotoxicidad del 5FU en las líneas celulares RKO, SW480 y SW620, se trataron tanto los cultivos en monocapa como los esferoides con concentraciones crecientes de 5FU durante 72 horas. Al término del tratamiento, se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT en los cultivos en monocapa y la detección de ATP (Kit CellTiter-Glo 3D) en los esferoides. Debido a la utilización de

dos métodos distintos para evaluar la viabilidad celular en cada tipo de cultivo, no es posible comparar directamente la eficacia del 5FU. No obstante, se demostró que los esferoides reproducen el mismo patrón de resistencia/sensibilidad observado en los cultivos en monocapa entre estas líneas celulares. Las células SW480 y SW620 exhiben resistencia al 5FU, mientras que las células RKO muestran una mayor sensibilidad, según estos ensayos de viabilidad celular (Figura 11). En el rango de concentraciones utilizadas, el 5FU tuvo una eficacia menor al 35% en los esferoides de SW480 y SW620, en contraste a los esferoides de RKO, donde se observó una eficacia del 84%.

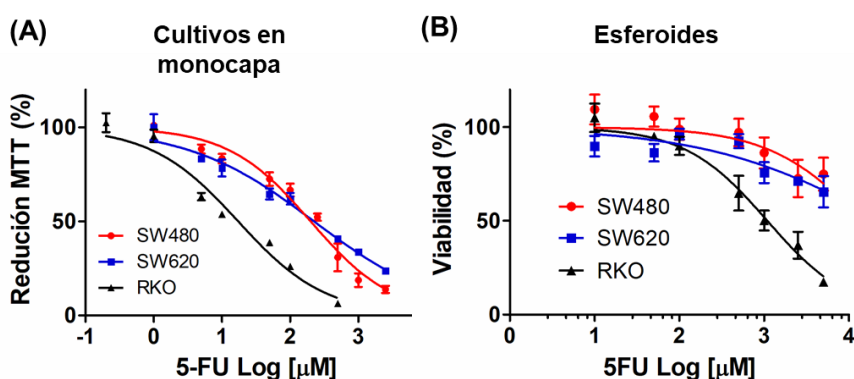


Figura 11. Citotoxicidad del 5FU en esferoides y cultivos en monocapa de las líneas de CRC (RKO, SW480, SW620). Disminución de la viabilidad celular a las 72 h de tratamiento con diferentes concentraciones de 5FU (0-5000 μ M). La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de MTT en cultivos en monocapa (A) y mediante el kit CellTiter-Glo 3D de Promega en cultivos de esferoides (B). Cada punto de las curvas se representa por la media \pm EEM de al menos tres ensayos independientes.

Para evaluar el efecto del 5FU en la inducción de apoptosis y daño en el DNA en los cultivos de esferoides, se analizaron los niveles de PARP escindida (cPARP o PARP cortada) y la fosforilación de γ H2AX (Ser139), respectivamente (Figura 12A). El tratamiento con 5FU ocasionó muerte celular y daño en el DNA en los esferoides de todas las líneas celulares evaluadas, aunque en diferentes proporciones. Los esferoides de RKO exhibieron los niveles más elevados de cPARP y de p- γ H2AX, seguidos por los esferoides de SW480 y SW620, lo cual es consistente con el patrón de resistencia/sensibilidad observado en los ensayos de viabilidad celular.

Además, independientemente del perfil mutacional de cada línea celular, el 5FU aumentó la proporción de células en quiescencia (fase G0 del ciclo celular) (Figura 12B), identificadas por la ausencia del marcador de proliferación Ki67. Asimismo, el tratamiento con 5FU disminuyó significativamente la proporción de células en G1 ($p < 0.05$) en todas las líneas celulares y la proporción de células en G2/M en los esferoides de RKO ($p < 0.001$), como resultado del arresto celular en G0.

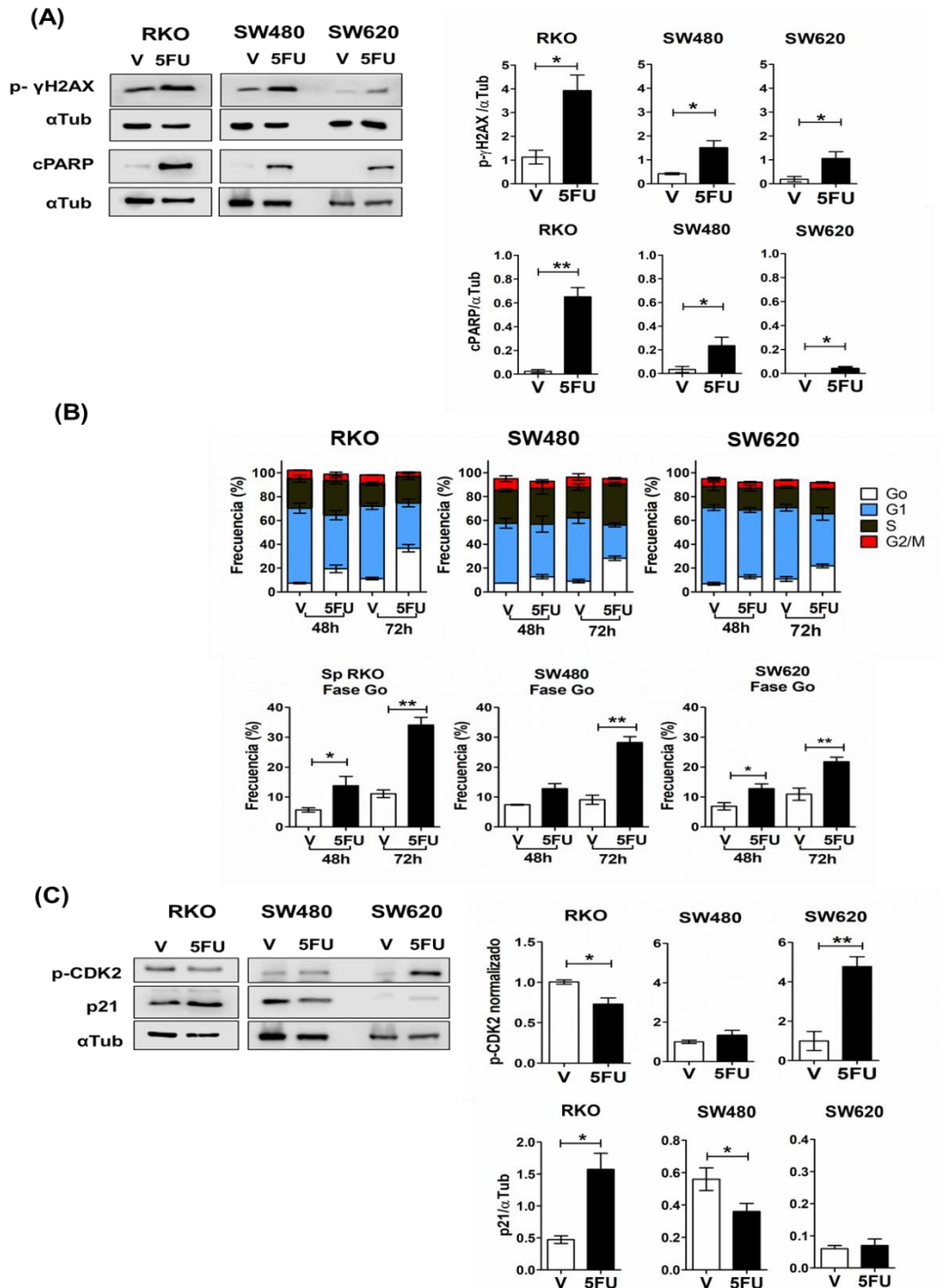


Figura 12. El 5FU induce muerte y arresto del ciclo celular en células de esferoides de líneas de CRC. (A) Niveles relativos de PARP escindida (cPARP) y p- γ H2AX (fosforilación Ser139) en esferoides tratados con o sin 5FU por 72h. En el panel izquierdo se muestran imágenes representativas del *Western blot* y en el panel derecho se muestra la gráfica del análisis densitométrico. (B) Análisis del ciclo celular de células de esferoides tratados con o sin 5FU por 48h y 72h. La gráfica superior muestra la distribución en todas las fases del ciclo celular, identificadas mediante la tinción con yoduro de propidio (PI) y la detección de los niveles de Ki67 por citometría de flujo. La gráfica inferior presenta el análisis comparativo de la proporción de células en fase Go a las 48h y 72h. (C) Niveles relativos de p21 y p-CDK2 (fosforilación en Thr160) en esferoides tratados con o sin 5FU por 72h. En el panel izquierdo se

muestran imágenes representativas del Western blot y en el panel derecho se muestra la gráfica del análisis densitométrico. La proteína α -tubulina (α Tub) se utilizó como control de carga. Los datos se representan por la media \pm EEM de al menos 3 ensayos independientes. Prueba t de Student, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. V, vehículo; 5FU, 5-fluorouracilo.

Debido al impacto del 5FU en la distribución del ciclo celular de los esferoides de las líneas de CRC, se evaluó la expresión de proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular, como p21 y CDK2, específicamente la fosforilación en el residuo Thr160, esencial para la activación de esta cinasa dependiente de ciclina (p-CDK2). Los esferoides de RKO exhibieron una disminución en los niveles de p-CDK2 y un aumento de p21, consistente con el arresto celular detectado después del tratamiento con 5FU (Figura 12C). En contraste, los esferoides de SW480 no mostraron cambios en los niveles de p-CDK2, pero se observó una reducción del 35.7% en los niveles de p21 en comparación con los esferoides control. En relación a los esferoides de SW620, no se evidenciaron cambios en los niveles de p21, pero se registró un aumento en los niveles de p-CDK2. Estas variaciones en los niveles de p21 y p-CDK2 observadas en los esferoides de SW480 y SW620 no explican el arresto en la fase G0 inducido por el 5FU, indicando la necesidad de un estudio más exhaustivo para identificar reguladores del ciclo celular que puedan estar diferencialmente regulados en respuesta al 5FU, en las células que constituyen estos esferoides. Por otro lado, variaciones en los niveles de p-CDK2 podrían ser determinantes en la decisión de la salida del estado de quiescencia y progresión del ciclo celular durante el post-tratamiento [213].

Dado que el 5FU promovió la entrada a quiescencia de una subpoblación celular presente en los esferoides, se procedió a evaluar el impacto del tratamiento con 5FU en la capacidad proliferativa de las células de los esferoides después del tratamiento farmacológico. Para ello, los esferoides establecidos al undécimo día de crecimiento se trataron por 72 horas con o sin 5FU. Posteriormente, se disociaron y se resembraron a una densidad de 5000 células/mL en condiciones dependientes e independientes de anclaje, en ausencia del fármaco. Los cultivos se observaron en diferentes momentos, a los días 7, 14 y 21 de incubación durante el post-tratamiento. Al término del periodo de observación (21 días), los cultivos en condiciones adherentes se tiñeron con cristal violeta para facilitar el conteo de las colonias formadas. Además, las células de los cultivos en suspensión (independientes de anclaje) fueron colectadas y se determinó su viabilidad celular (Figura 13A).

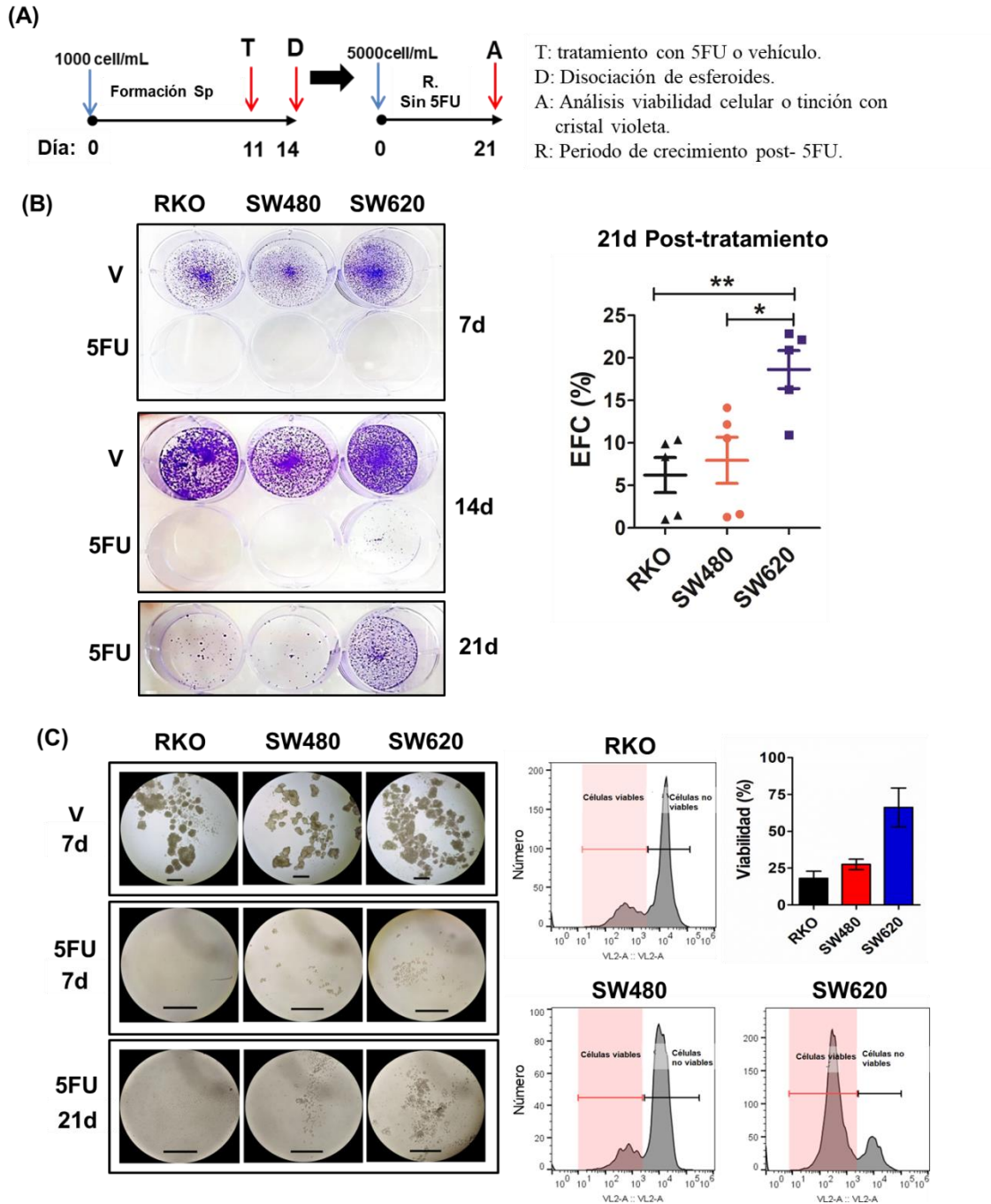


Figura 13. Las células de la línea metastásica SW620 presentan una mayor capacidad de proliferar después del tratamiento con 5FU en comparación con las células RKO y SW480 derivadas de tumor primario. **(A)** Diseño experimental: los esferoides tratados con 5FU o con el vehículo (V) se disociaron y sembraron a una densidad de 5000 células/mL en placas de baja adherencia y superficie adherente para evaluar la capacidad de proliferación independiente de anclaje y dependiente de anclaje, respectivamente. **(B)** Panel izquierdo: fotografías de la formación de colonias en condiciones dependientes de anclaje al día 7, 14 y 21 de incubación. La eficiencia de formación de colonias (EFC) se determinó al día 21 post-tratamiento. **(B)** Panel izquierdo: fotografías de los cultivos celulares en placas de baja adherencia a los días 7, 14 y 21 de incubación (barra de escala: 500 μ m). Panel derecho: viabilidad celular de las células colectadas al día 21 de incubación. Las células se tiñeron con el colorante Aqua-Zombie y la fluorescencia se midió por citometría de flujo. La franja rosada

en los histogramas corresponde a la proporción de células viables. Los datos se representan por la media \pm EEM de al menos tres experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

En la Figura 13B se presentan fotografías representativas de los cultivos en condiciones dependientes de anclaje a los 7, 14 y 21 días de incubación. Como se puede observar en estas fotografías, las células derivadas de esferoides tratados con 5FU no proliferan durante los primeros 7 días de cultivo, en comparación con las células control. Por otra parte, al día 14 únicamente se observa un aumento del número de células en los cultivos de SW620 y al día 21 se observan colonias en los cultivos de las tres líneas celulares. Dado que después de los 14 días de incubación, los cultivos de las células control se saturan, estos no se mantuvieron hasta el día 21, y solo se muestran fotografías de los cultivos de las células tratadas con 5FU. Al comparar, la eficiencia de formación de colonias (EFC) de las células derivadas de los esferoides tratados con 5FU de las 3 líneas celulares a los 21 días de incubación, se encontró que las células SW620 exhibieron una mayor EFC en comparación con las células RKO y SW480, las cuales mostraron una EFC similar (Figura 13B). En contraste, la capacidad de proliferación independiente de anclaje (cultivos en suspensión) fue reducida en todas las líneas celulares después del tratamiento farmacológico. Al finalizar el periodo de observación (21 días), solo se detectó la incipiente generación de colonias en los cultivos de SW620 (Figura 13C).

Además, debido a la baja proliferación observada en ausencia de adherencia celular después del tratamiento con 5FU, se colectaron las células y se evaluó su viabilidad celular mediante el método de exclusión molecular del colorante Aqua-Zombie. Se observó que, en promedio, solo el 18% y el 27% de las células RKO y SW480, respectivamente, eran viables, en contraste con el 66% de las células SW620 (Figura 13C). Este resultado, junto con el tamaño limitado de las colonias de SW480/SW620 y la falta de proliferación en los cultivos en suspensión de RKO, sugiere un arresto en las células RKO sobrevivientes, y una baja proliferación de las células SW480 y SW620 sobrevivientes durante el periodo de post-tratamiento.

En resumen, los resultados indican que los esferoides de la línea RKO exhiben una mayor respuesta al tratamiento con 5FU en comparación con los esferoides de otras líneas celulares. Aunque los esferoides de SW480 y SW620 muestran bajos niveles de daño en el DNA y activación de apoptosis ante el tratamiento con 5FU, las células de SW480 presentan una capacidad de proliferación y supervivencia limitada durante el post-tratamiento, en contraste con las células de los esferoides de SW620, que demuestran la mayor resistencia a este fármaco.

6.3 La estimulación con ligandos Wnt promueve supervivencia celular en esferoides de la línea celular RKO que exhiben sensibilidad al 5FU

Dada la creciente evidencia que sugiere la participación de la vía Wnt canónica en quimio-resistencia en CRC [177], este estudio se centró inicialmente en investigar si la activación de esta vía de señalización por ligandos Wnt favorece la supervivencia celular en esferoides de RKO, los cuales fueron previamente identificados por su mayor sensibilidad al 5FU. Para abordar esta pregunta, los esferoides de RKO, se trataron con el ligando Wnt3a y Wnt5a de manera independiente, con el fin de evaluar su efecto en la citotoxicidad inducida por el 5FU.

Investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio han demostrado que el ligando Wnt3a induce la activación co-transcripcional de β -catenina en células RKO cultivadas en monocapa [136]. En consonancia con esto, se observó que el ligando Wnt3a, y no Wnt5a, induce la actividad transcripcional de β -catenina/TCF a las 24 h del estímulo, en una subpoblación celular presente en los esferoides de RKO derivados de células transducidas con el gen reportero TOP-GFP (Figura 14A). Wnt3a también incrementó los niveles de la forma no fosforilada de β -catenina en los residuos de Ser33/37/Thr41 (sitios de fosforilación de GSK3 β) a las 24 horas de tratamiento, indicando un bloqueo transitorio de su degradación y posterior acumulación. Además, a las 24 y 48 h del estímulo, se detectó un aumento en los niveles de ciclina D1 y c-Myc, cuya expresión está regulada por β -catenina/TCF (Figura 14B). Interesantemente, el ligando Wnt5a también ocasionó un aumento de estas proteínas a las 48 h del estímulo, sugiriendo la posible activación de efectores de las vías Wnt no canónicas, como los factores de transcripción NFAT1 y NFAT2, los cuales se han identificado como reguladores transcripcionales de *MYC* y *CCND1*(gen que codifica para ciclina D1) [147].

Para determinar la implicación de NFAT1 y NFAT2 en la respuesta inducida por Wnt3a y Wnt5a en los esferoides de RKO, se midieron los niveles de estos factores de transcripción por *Western blot*, a las 24 y 48 h después del estímulo con cada uno de los ligandos. Mientras que Wnt5a provocó un aumento en los niveles de NFAT1 que se mantuvo a las 48 horas del estímulo, Wnt3a ocasionó un incremento de ambas proteínas, pero en diferentes tiempos, NFAT1 a las 24 h y de NFAT2 a las 48 h del estímulo (Figura 14C). Aunque en este estudio no se evaluaron cambios en la localización nuclear de estos NFATs en respuesta a los ligandos Wnt, el aumento de los niveles totales podría ser consecuencia de un aumento en la estabilidad de estas proteínas. Respecto a los mecanismos que regulan la degradación de los NFAT, se conoce poco, pero recientemente, Hanaki *et al.* (2023) demostraron que la estabilización de los NFATs (1-4) depende de la activación de calcineurina/calmodulina. La inhibición de calcineurina conduce a la hiperfosforilación de los NFATs, y posterior degradación de manera dependiente de Skp2 [214].

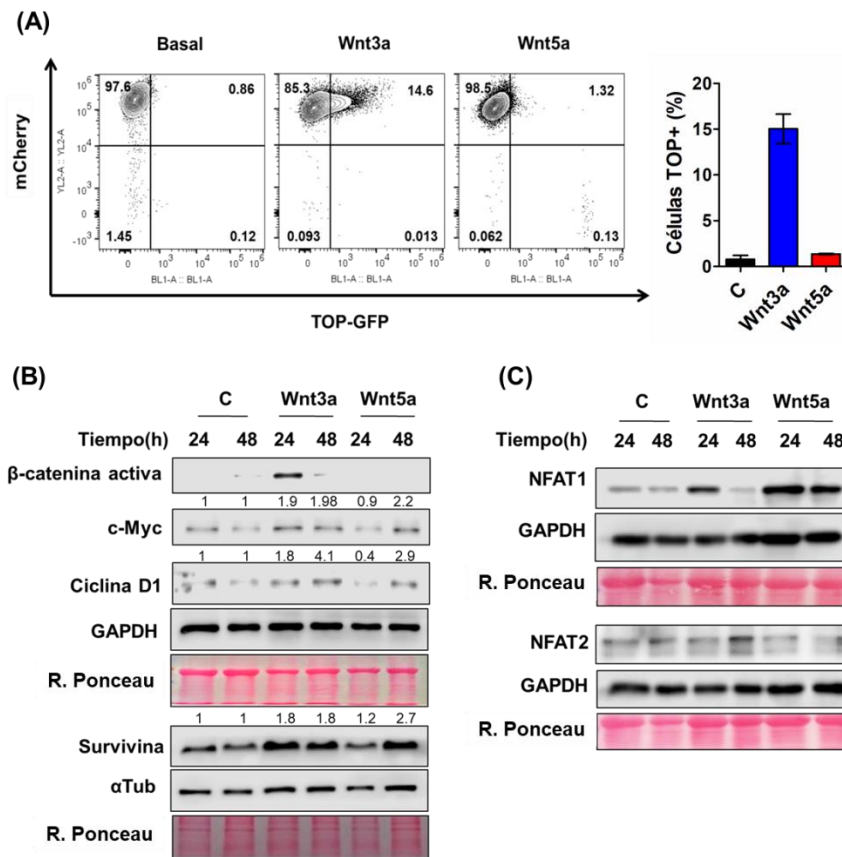


Figura 14. Efecto diferencial de los ligandos Wnt3a y Wnt5a en la activación de la vía Wnt/β-catenina y Wnt/NFAT en esferoides de RKO. (A) Se determinó la actividad transcripcional del complejo β-catenina/TCF en esferoides de la línea RKO^{TOP-GFP.mCherry} a las 24 h de tratamiento con 300 ng/mL de ligando Wnt3a o Wnt5a. (B) Cambios en los niveles de proteína de β-catenina activa (forma no fosforilada en los residuos Ser33/37/Th41), c-Myc, ciclina D1, y survivina en esferoides de RKO tratados con 300 ng/mL de ligando Wnt3a o Wnt5a por 24 y 48 h. El número de veces de cambio respecto al control (C24 h o C48 h) se indica en la parte superior de cada banda. (C) Imágenes representativas del *Western blot* de NFAT1 y NFAT2 en esferoides de RKO tratados de la misma forma como se indica en B. Los datos que se muestran son representativos de al menos 2 ensayos independientes.

Teniendo en cuenta la respuesta diferencial inducida por los ligandos Wnt a los tiempos evaluados, se utilizaron diferentes esquemas de tratamiento para determinar el efecto de cada ligando en la citotoxicidad inducida por el 5FU en los esferoides de RKO. El estímulo agudo con Wnt3a se realizó una hora antes del tratamiento con 5FU (modelo de co-tratamiento), mientras que el ligando Wnt5a se utilizó en un esquema de pre-tratamiento, 48 h antes del estímulo con 5FU. Se observó que Wnt5a no disminuyó significativamente la muerte celular inducida por el 5FU, y el ligando Wnt3a redujo en un 33% los niveles de cPARP (Figura 15A). Sin embargo, se encontró que ambos ligandos incrementaron los niveles de survivina y Bcl-2, en comparación con los esferoides tratados exclusivamente con 5FU (Figura 15 B). Resultados similares fueron encontrados al tratar esferoides de la línea celular HT29 con el ligando Wnt3a y 5FU (Figura 16). Al igual que en los esferoides de RKO, este ligando indujo un aumento de la estabilización de β-catenina en los esferoides de HT29 y de los niveles

de Axin2, lo cual indica la activación de β -catenina/TCF y la expresión de sus genes blanco, entre los que se incluye *AXIN2* (Figura 16)

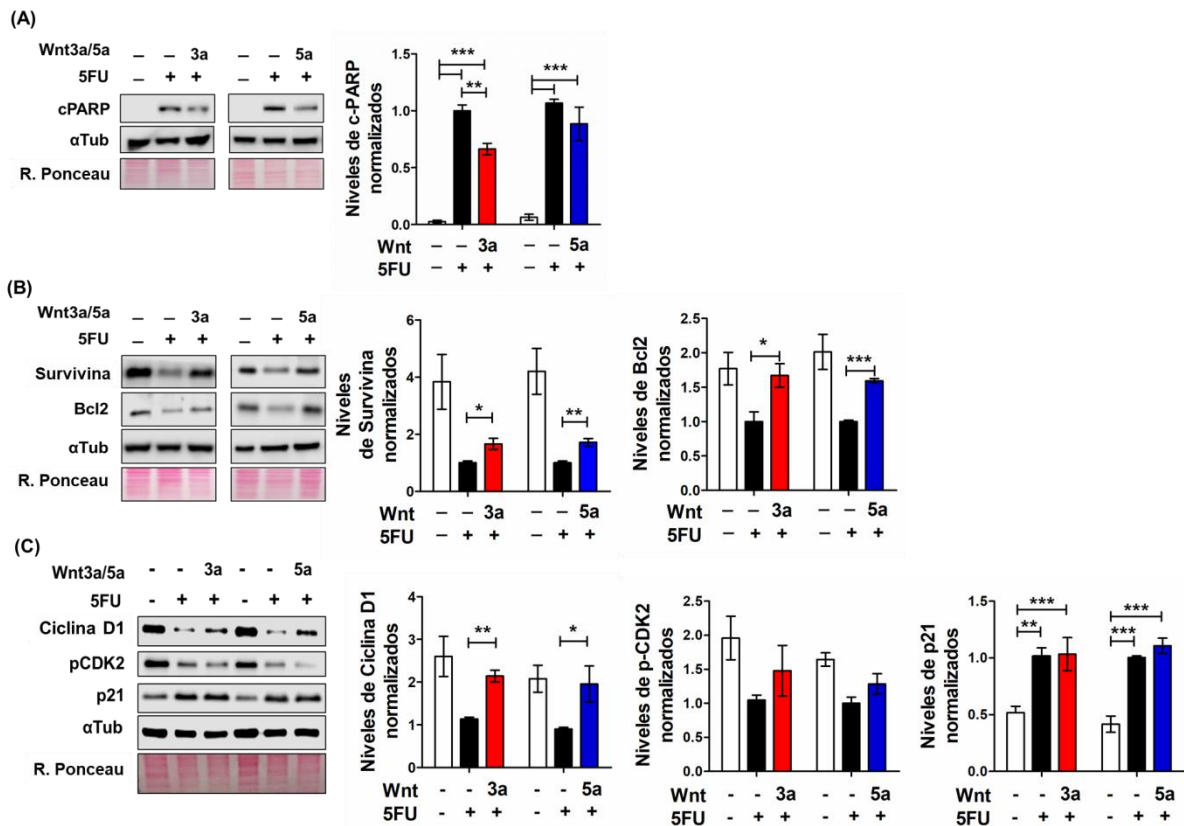


Figura 15. Los ligandos Wnt atenúan la muerte inducida por 5FU en esferoides de la línea celular RKO a través de la inducción de proteínas antiapoptóticas. Análisis por *Western blot* de las proteínas indicadas en esferoides de RKO, lo cuales se trataron siguiendo el esquema de co-tratamiento o pre-tratamiento. Pre-tratamiento: los esferoides se trataron con 300 ng/mL de Wnt5a 48 h antes del tratamiento con 5FU. Co-tratamiento: los esferoides se trataron con Wnt3a (300 ng/mL) 1 h antes de la adición de 5FU. Posteriormente, los esferoides se trataron con 5FU por 72h. La tinción con rojo de ponceau se utilizó como control de carga. En los paneles izquierdos se presentan imágenes representativas del *Western blot* de las proteínas indicadas, mientras que en los paneles derechos se muestran las gráficas del análisis densitométrico. Los niveles de proteína se normalizaron con respecto al tratamiento con 5FU. Los datos se expresan como la media \pm EEM de al menos 3 ensayos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Por otro lado, dado que anteriormente se describió que el 5FU induce arresto celular en los esferoides de RKO, se determinó si los ligandos Wnt pueden contrarrestar este efecto mediante la regulación de los niveles de ciclina D1, p-CDK2 y p21, reguladores de la progresión del ciclo celular. El tratamiento, ya sea con Wnt3a o Wnt5a, evita la disminución de los niveles de ciclina D1, pero no altera los cambios inducidos por el 5FU en las otras proteínas (Figura 15C). Por lo tanto, estos datos sugieren que el ligando Wnt3a promueve la supervivencia celular mediante la inducción de proteínas antiapoptóticas, en parte mediante la activación de la vía Wnt canónica en las CSCs

enriquecidas en los cultivos de esferoides, aunque no anula la actividad citostática del 5FU. Asimismo, se propone que Wnt5a puede promover la supervivencia celular durante el tratamiento con 5FU mediante la activación de vías no canónicas, y se plantea que la vía Wnt/Ca²⁺/NFAT podría mediar este efecto.

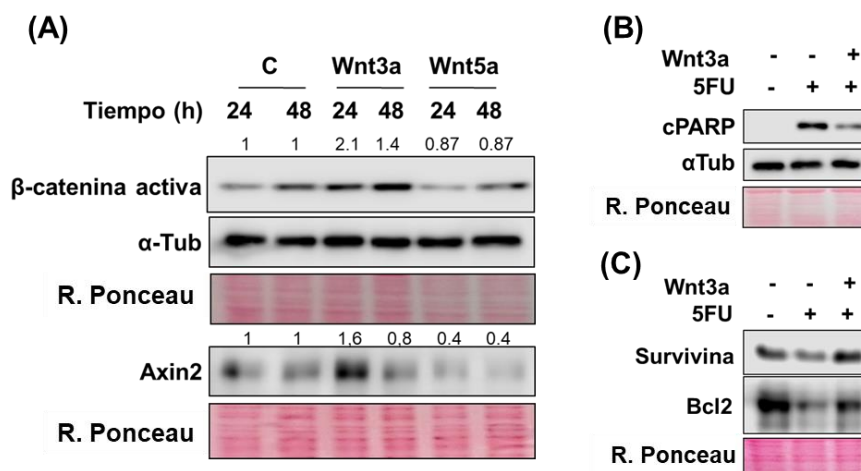


Figura 16. El ligando Wnt3a atenúa la muerte inducida por 5FU en esferoides de la línea celular HT29 a través de la inducción de proteínas antiapoptóticas. (A) Cambios en los niveles de la proteína β -catenina activa (forma no fosforilada en los residuos Ser33/37/Th41) y Axin2 en esferoides de HT29 tratados con 300 ng/mL de ligando Wnt3a o Wnt5a por 24 y 48 h. El número de veces de cambio respecto al control (C24 h o C48 h) se indica en la parte superior de cada banda. (B, C) Análisis por *Western blot* de las proteínas indicadas en esferoides de HT29, que se trataron con o sin Wnt3a (300 ng/mL) 1 h antes de la adición de 5FU. Posteriormente, los esferoides se trataron con 5FU durante 72h. La tinción con rojo de ponceau se utilizó como control de carga.

6.3.1 Los ligandos Wnt disminuyen la muerte por apoptosis independientemente de la activación de NFAT

Para determinar si los NFATs contribuyen río abajo en la respuesta inducida por Wnt3a y Wnt5a en los esferoides de RKO tratados con 5FU, se utilizó el péptido 11R-VIVIT para inhibir la actividad de los NFATs. Este péptido obstaculiza la interacción entre las proteínas NFATs (1-4) y calcineurina, lo que impide la translocación nuclear de los NFATs y su actividad transcripcional [215]. Los esferoides se trataron con Wnt3a o Wnt5a en co-tratamiento con el péptido 11R-VIVIT, siguiendo el esquema de tratamiento descrito para cada ligando en el apartado anterior. Después del tratamiento con 5FU, se determinaron los niveles de PARP escindida (cPARP) como indicador de muerte por apoptosis.

Contrario a lo esperado, el péptido 11R-VIVIT no anuló el efecto de los ligandos Wnt, y, de manera independiente al estímulo con los Wnts, este disminuyó la muerte inducida por el 5FU. El 11R-VIVIT, en co-tratamiento con el ligando Wnt3a, redujo en

mayor proporción los niveles de cPARP, mientras que con Wnt5a no se observó tal efecto (Figura 17).

A pesar de que un estudio previo desarrollado en el laboratorio reportó que ambos ligandos promueven la generación de esferoides y la proliferación celular vía fosfolipasa C y NFAT en varias líneas celulares de CRC, incluida la línea RKO [173], los resultados aquí descritos sugieren que la función citoprotectora de los ligandos Wnt en esferoides de RKO probablemente es independiente de la estabilización y translocación nuclear de las proteínas NFAT (1-4). Además, dado el efecto del 11R-VIVIT en los esferoides de RKO tratados con 5FU, se plantea la posibilidad de que los NFATs estén involucrados en la apoptosis celular desencadenada por el 5FU; no obstante, se requieren análisis adicionales para confirmar esta hipótesis.

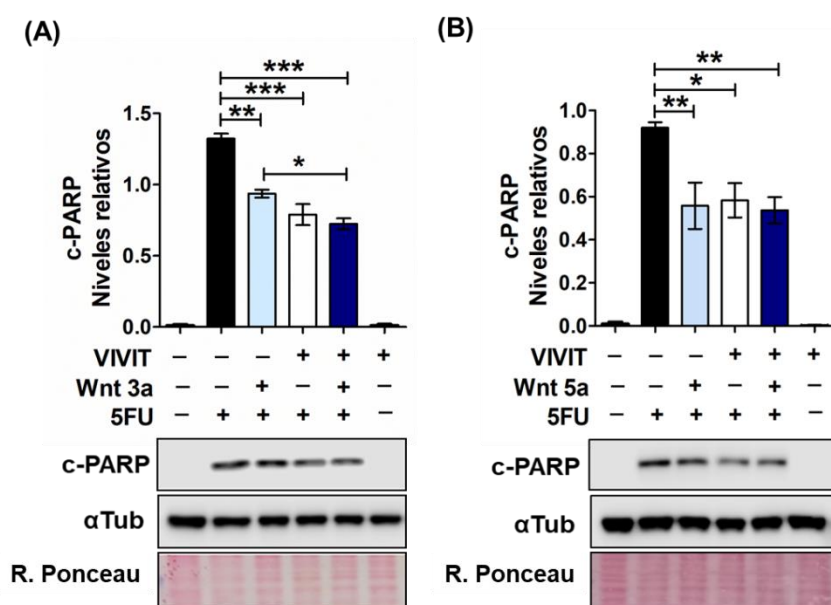


Figura 17. La inhibición de NFAT con el inhibidor VIVIT disminuye la muerte inducida por 5FU. (A) Los esferoides de RKO se trataron con el péptido 11R-VIVIT (1µM) y Wnt3a (300 ng/mL) 1 h antes de la adición de 5FU. **(B)** Los esferoides de RKO se trataron con el péptido 11R-VIVIT (1 µM) y Wnt5a (300 ng/mL) 48 h antes del tratamiento con 5FU. Posteriormente, los esferoides se trataron con 5FU durante 72 h. Al finalizar el tratamiento, los esferoides se se lisaron y se determinó los niveles de cPARP (PARP escindida) por *Western blot*. La tinción con rojo de ponceau se utilizó como control de carga. Los datos se presentan como la media ± EEM de dos ensayos independientes. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

6.4 La inhibición de la vía Wnt canónica favorece la supervivencia celular ante la acción citotóxica del 5FU en esferoides de líneas celulares que presentan activa esta vía de manera constitutiva

Los resultados obtenidos con los esferoides de RKO y HT29 sugieren que la activación de la vía Wnt/ β -catenina por el ligando Wnt3a atenúa la muerte inducida por 5-FU, lo cual apunta a que la inhibición de esta vía en células que presentan activación

constitutiva, podría potenciar la citotoxicidad inducida por la quimioterapia. Para probar esta hipótesis se emplearon dos estrategias metodológicas: 1) la sobreexpresión de una dominante negativa para TCF4 (dnTCF4) mediante la transfección estable con el plásmido pPGS dnTcf-4(deltaN41) en células SW480 y SW620 que poseen la vía Wnt canónica constitutivamente activa; y 2) la inhibición farmacológica de la vía Wnt canónica con el compuesto Adavivint, caracterizado por su mayor potencia en la inhibición de la actividad transcripcional de β -catenina/TCF en comparación con otros inhibidores de esta vía de señalización [217].

6.4.1 La expresión de la dominante negativa para TCF4 disminuye la muerte celular y el daño al DNA inducido por el 5FU

Para evaluar el efecto de la dominante negativa para TCF4 (dnTCF4) en la quimioresistencia de esferoides de SW480 y SW620, primero se determinó si la sobreexpresión de la dnTCF4 suprime la actividad co-transcripcional de β -catenina mediante el ensayo de gen reportero TOP-Luciferasa. Se observó que la actividad del reportero en las células SW480 transfectadas (SW480^{dnTCF4}) se recuperaba a lo largo de los pasajes, posiblemente debido al efecto compensatorio de la expresión de otros miembros de la familia TCF/LEF, como *TCF7* (gen que codifica para TCF1) y *LEF1* [216]. No obstante, este fenómeno fue menos pronunciado en las células SW620, donde se mantuvieron niveles bajos de la actividad del reportero a lo largo de varios pasajes, en comparación con las células transfectadas con el vector vacío, que se referencian como SW620^{Control} (Figura 18A). Por lo tanto, se decidió evaluar exclusivamente el efecto de la dnTCF4 en esferoides de SW620 frente a la citotoxicidad inducida por el 5FU.

La inhibición de la actividad transcripcional de β -catenina/TCF4 mediante la proteína dnTCF4 redujo el impacto negativo del 5FU sobre la viabilidad celular (Figura 18B) y disminuyó en un 37.64% los niveles de p- γ H2AX inducidos por el 5FU (Figura 18C). Además, no se observaron cambios significativos en los niveles de survivina, p-CDK2 y ciclina D1 en comparación con los esferoides de SW620^{Control} tratados con 5FU (Figura 18D-18F). Por otro lado, al analizar la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular, no se encontraron cambios significativos entre los esferoides SW620^{dnTCF4} tratados con 5FU y con el vehículo, excepto por una reducción en la proporción de células en G2/M (Figura 18G). Estos resultados sugieren un efecto discreto del 5FU en la proliferación de los esferoides de SW620^{dnTCF4}; sin embargo, no se puede excluir el posible efecto compensatorio de la expresión de otros miembros de la familia TCF y LEF durante la formación de los esferoides.

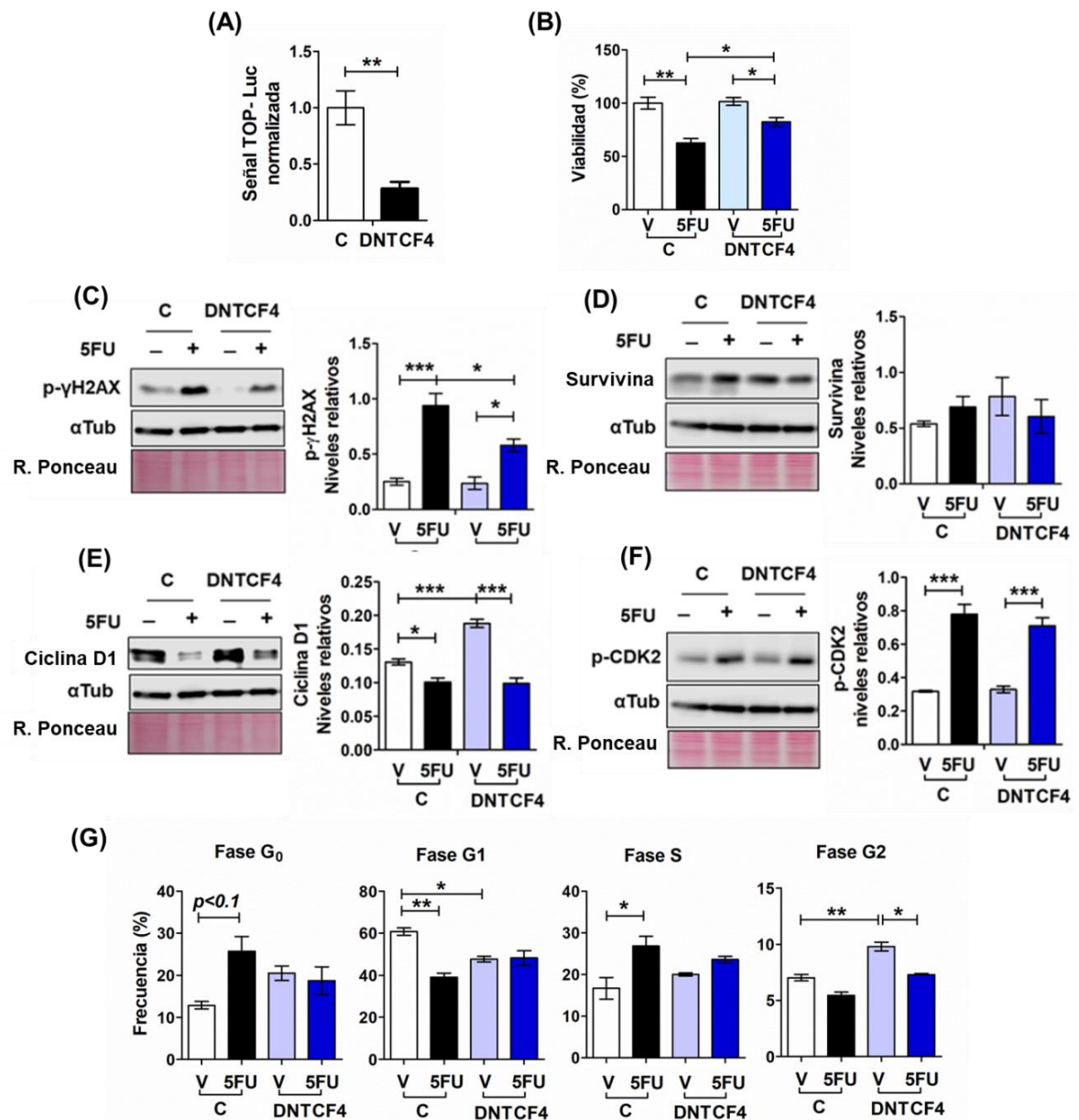


Figura 18. La dominante negativa de TCF4 (DNTCF4) promueve supervivencia en esferoides de SW620 tratados con 5FU mediante la reducción de daño al DNA. (A) Actividad transcripcional de β -catenina/TCF4 medido por el ensayo gen reportero TOP-Luc en células transfectadas con el plásmido pPGS dnTcf-4(deltaN41) en comparación con las células transfectadas con el vector vacío (pCDNA 3.1). (B) Viabilidad celular de los esferoides de la línea celular SW620 (SW620^{Control} vs SW620^{DNTCF4}) tratados con 5FU por 72 h. Niveles relativos de p- γ H2AX (Ser139) (C), survivina (D), ciclina D1 (E) y p-CDK2 (Th160) (F) en esferoides de SW620^{Control} y SW620^{DNTCF4} tratados con el vehículo (V) o 5FU por 72 h. Se muestran imágenes representativas del Western blot para cada proteína y la gráfica del análisis densitométrico. La tinción con rojo de ponceau se utilizó como control de carga. (E) Análisis comparativo de la distribución del ciclo celular de esferoides SW620 (SW620^{Control} vs SW620^{DNTCF4}) tratados con el V o 5FU por 72 h. Los datos se presentan como la media \pm EEM de al menos dos experimentos independientes. Análisis ANOVA de una sola vía, seguido de la prueba Bonferroni de comparaciones múltiples. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

6.4.2 La inhibición farmacológica de la vía Wnt/ β -catenina promueve supervivencia celular frente a la acción citotóxica del 5FU

Para investigar el impacto de la actividad de otros miembros de la familia TCF, como TCF1 en la resistencia al 5FU, se utilizó el inhibidor farmacológico Adavivint (SM04690). Este compuesto ha sido caracterizado por reducir la expresión de genes relacionados con la vía Wnt canónica, tales como *CTNNB1*, *TCF7* (que codifica para TCF1), *TCF7L2*, *LEF1*, *MYC* y *AXIN2* [217]. La acción inhibitoria del Adavivint sobre la vía Wnt canónica se atribuye principalmente a la inhibición de la actividad cinasa de la proteína nuclear CLK2, que participa en el pre-procesamiento de transcritos, lo que conduce a un efecto inhibitorio global de la expresión de genes relacionados con la vía Wnt canónica de manera independiente de la actividad co-transcripcional de β -catenina [218].

Para evaluar la eficacia del Adavivint, los cultivos en monocapa y esferoides de las líneas SW480 y SW620 se trataron con concentraciones crecientes de Adavivint (0.03, 0.1 y 1 μ M) durante 48 h y 72 h, respectivamente. Después del tratamiento, se determinaron los niveles de β -catenina, TCF1, TCF4, c-Myc y Axin2 por *Western blot*. Como se puede observar en la Figura 19, el Adavivint tiene un efecto variable dependiendo de la proteína evaluada. No obstante, a la concentración máxima utilizada (1 μ M), se detectó una reducción superior al 50% en todas las proteínas evaluadas en los cultivos en monocapa de ambas líneas celulares (Figura 19A). Este patrón se replicó en los esferoides, aunque no se observaron cambios en los niveles de TCF4, en comparación con las células tratadas con el vehículo (Figura 19B-19D). Además, la actividad transcripcional de β -catenina/TCF disminuyó en un 86% después de 72 h de tratamiento con 1 μ M de Adavivint en esferoides de SW480 transducidos con el plásmido reportero TOP-GFP.mC (Figura 19E). Por lo tanto, se utilizó la concentración de 1 μ M de Adavivint para inhibir la vía Wnt canónica en los esferoides de SW480 y SW620 en los posteriores ensayos.

Acorde con lo anterior, para investigar el impacto del Adavivint en la citotoxicidad inducida por 5FU en los esferoides de SW480 y SW620, se establecieron los siguientes esquemas de tratamiento: 1) tratamiento control: vehículo (DMSO<0.02%) 72 h + vehículo (DMSO<0.2%) 72 h; 2) tratamiento 5FU: vehículo (DMSO<0.02%) 72 h + 5FU 72h; 3) tratamiento combinado: Adavivint 72 h + 5FU 72 h; 4) tratamiento Adavivint solo: Adavivint 72 h + vehículo (DMSO<0.2%) 72 h. Después del tratamiento, se evaluaron los niveles de PARP escindida (cPARP) y p- γ H2AX, para medir cambios en la muerte celular por apoptosis y daño al DNA, respectivamente. Contrario a lo esperado, el pre-tratamiento con Adavivint contrarrestó el aumento de los niveles de cPARP inducido por 5FU en los esferoides de ambas líneas celulares (Figura 20A). También disminuyó los niveles de p- γ H2AX en esferoides de SW620, pero no se detectaron cambios significativos en esferoides de SW480 (Figura 20B). Como resultado de la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina, los niveles de survivina fueron regulados negativamente, independientemente del tratamiento con 5FU (Figura 20C).

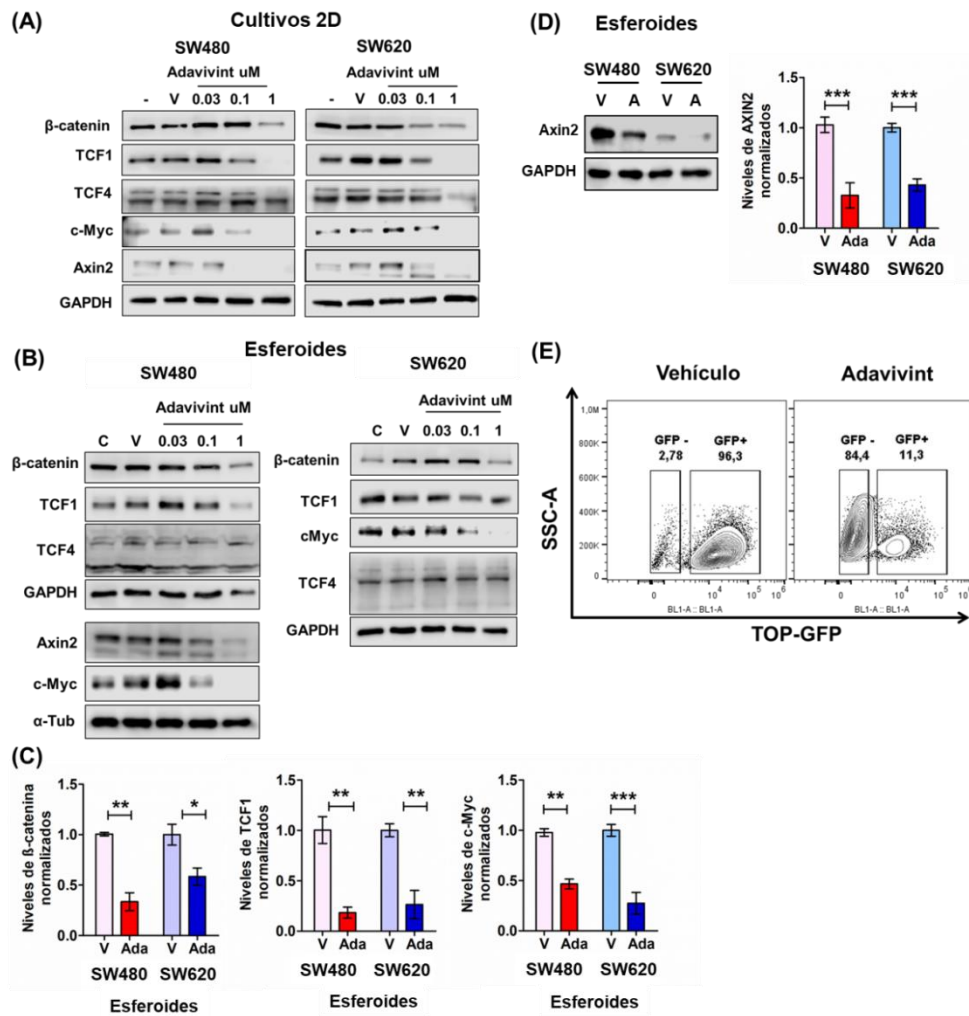


Figura 19. El Adavivint inhibe la vía Wnt/β-catenina en las líneas celulares SW480 y SW620. Las células SW480 y SW620 cultivadas en monocapa se trataron con concentraciones crecientes de Adavivint por 48 h (A). Los esferoides de SW480 y SW620 se trataron con Adavivint por 72 h (B). Al término del tratamiento las células se lisaron y se determinaron los niveles de β-catenina, TCF1, TCF4, c-Myc y Axin2 por *Western blot*. Solo se muestra el análisis cuantitativo del efecto de la concentración de 1 μM de Adavivint en cultivos de esferoides en comparación con los esferoides tratados con el vehículo (C). Cambios en la expresión de Axin2 en esferoides tratados con Adavivint 1 μM por 72 h (D). Actividad transcripcional de β-catenina/TCF en esferoides de células SW480 transducidas con el plásmido TOP-GFP. Los esferoides fueron tratados con o sin Adavivint (1 μM) por 72h y el nivel de fluorescencia se determinó por citometría de flujo en las células de los esferoides disociados (E). Los datos se representan por la media ± EEM de al menos 3 ensayos independientes. * p < 0.05; **p<0.001; *** p < 0.0001.

Resultados similares fueron encontrados en los esferoides de la línea celular HCT116 y esferoides de VCL16 (Figura 20D y 20E), donde el Adavivint disminuyó la muerte celular y daño al DNA inducido por 5FU. Ambos tipos de células presentan una mutación en el gen *CTNFB1*, que codifica para una mutante de β-catenina con una menor susceptibilidad a la degradación vía proteosoma [219, 220]. Estos datos sugieren que la inhibición de la vía Wnt canónica con Adavivint favorece la

supervivencia de los esferoides que presentan una activación constitutiva de la vía Wnt/ β -catenina, ya sea por mutaciones en el gen *APC* o *CTNNB1*.

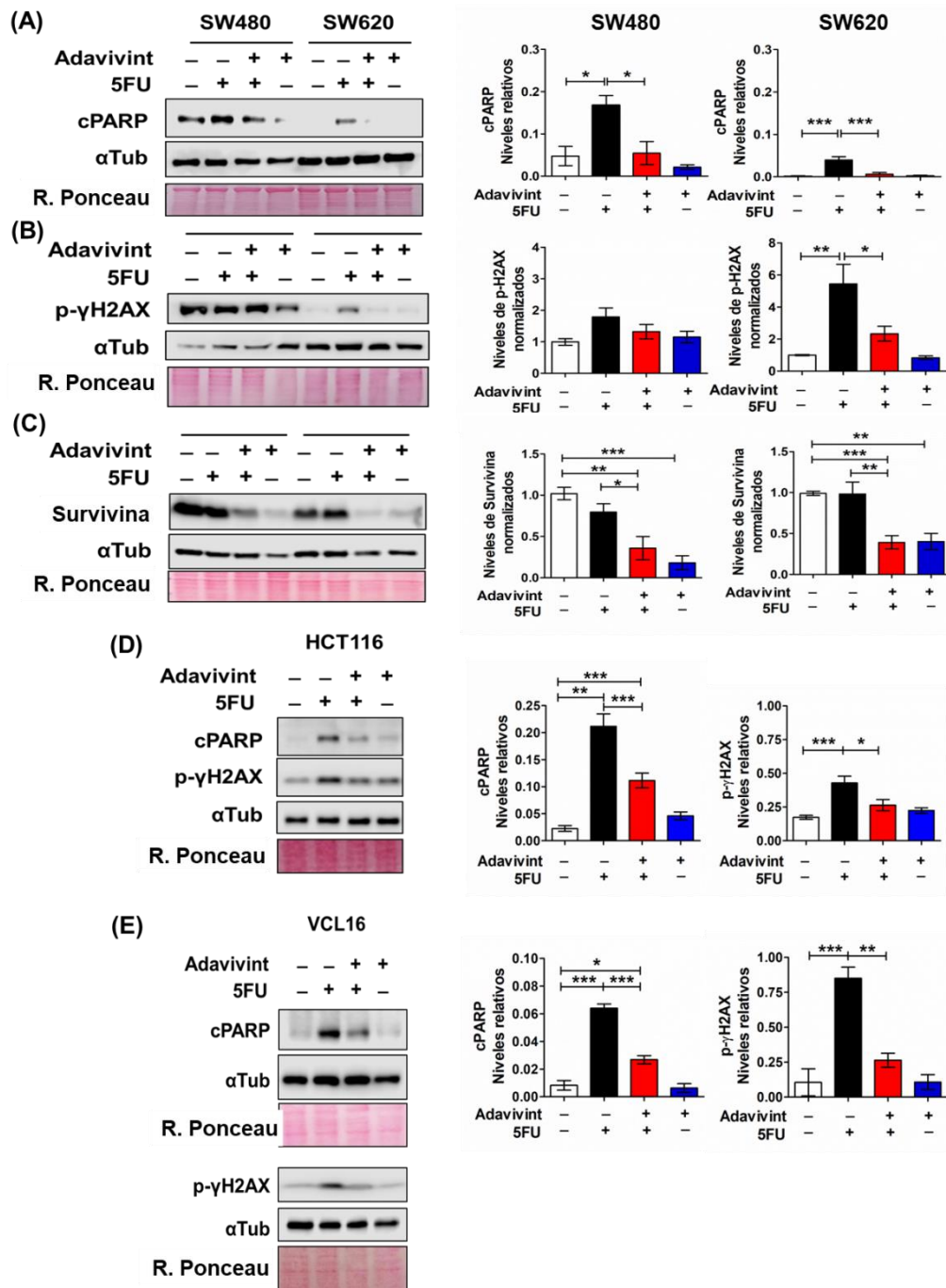


Figura 20. El inhibidor farmacológico Adavivint disminuye la muerte celular y daño al DNA inducido por 5FU en esferoides de CRC. (A-C) Cambios en los niveles de cPARP (PARP escindida) (A), p- γ H2AX (B) y survivina (C) en esferoides de SW480 y SW620 pre-tratados con o sin Adavivint (1 μ M) por 72 h, y posteriormente con o sin 5FU por 72 h. (D, E) Análisis de los niveles de cPARP y p- γ H2AX en esferoides de la línea celular HCT116 (D) y VCL16 derivadas de un cultivo primario (E), que se trataron con o sin Adavivint (1 μ M y 0.5 μ M respectivamente) por 72h, seguido del tratamiento con o sin 5FU por 72 h. La tinción con rojo

de ponceau se utilizó como control de carga. Los datos se representan por la media \pm EEM de al menos 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Teniendo en cuenta que el 5FU también impacta negativamente la progresión del ciclo celular, se determinó el efecto del pre-tratamiento con Adavivint en los niveles de p-CDK2 y p21 después de finalizado el esquema de tratamiento con 5FU. Se observó que el Adavivint anuló el incremento en los niveles de p-CDK2 inducido por 5FU en los esferoides de SW480 y SW620 (Figura 21A), mientras que su efecto en los niveles de p21 entre estas líneas celulares fue opuesto. El tratamiento combinado (Adavivint+5FU) incrementó en 3.5 veces los niveles de p21 en los esferoides de SW620, en comparación con los esferoides control, a diferencia de su efecto en esferoides de SW480, donde este inhibidor acentuó la disminución de los niveles de p21 inducida por el 5FU (Figura 21B). Estos resultados sugieren que la inhibición de la vía Wnt canónica podría alterar el ciclo celular e imponer un estado de baja proliferación en las células que constituyen los esferoides. Por lo tanto, se analizó la distribución de las células en las fases del ciclo celular únicamente en esferoides de SW620, que exhiben una mayor resistencia al 5FU en comparación con los esferoides de las otras líneas celulares, según se describió en apartados anteriores.

El análisis del ciclo celular en los esferoides de SW620 reveló que, contrario a lo esperado, el Adavivint no alteró la proporción de células en estado de quiescencia (fase Go) en comparación con el tratamiento solo con 5FU; en cambio, incrementó la proporción de células en la fase S y G2/M, independientemente del tratamiento con 5FU (Figura 21C, 21D). Estos resultados, junto con los cambios observados en los niveles de p-CDK2 y p21 en los esferoides de SW620, sugieren que el Adavivint probablemente causa un retraso en las fases S y G2 del ciclo celular en lugar de potenciar el arresto celular en la fase Go inducido por el 5FU. Una prolongación del tiempo en la fase G2 del ciclo celular podría favorecer la reparación del DNA antes de entrar en mitosis, contribuyendo a la supervivencia celular frente al daño en el DNA inducido por el 5FU [48].

En resumen, estos hallazgos sugieren que la inhibición farmacológica de la vía Wnt/ β -catenina con Adavivint favorece la supervivencia celular, en parte, mediante la disminución del daño en el DNA inducido por el 5FU, en esferoides de líneas de CRC que presentan activación constitutiva de esta vía. Sin embargo, debido a los cambios observados en los niveles de p-CDK2 y p21, se plantea que este inhibidor podría tener un efecto negativo en la proliferación de las células de los esferoides después del esquema de tratamiento con 5FU.

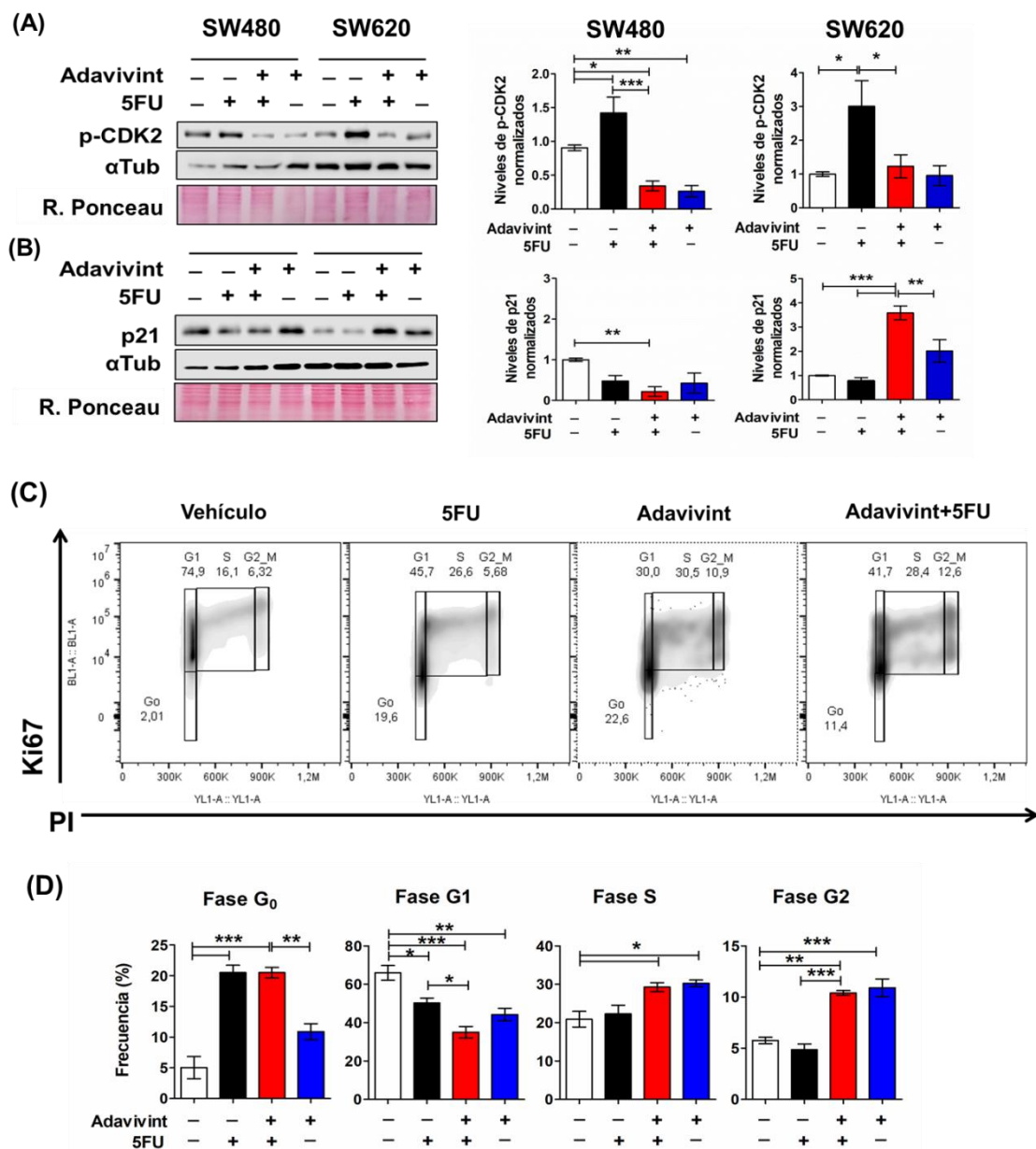


Figura 21. El inhibidor Adavivint altera la progresión del ciclo celular independientemente del tratamiento con 5FU en esferoides de la línea celular SW620. (A, B) Análisis de los niveles de p-CDK2 (A) y p21 (B) en esferoides de SW480 y SW620 pre-tratados con o sin Adavivint (1 μ M) por 72 h, y posteriormente con o sin 5FU por 72 h. La tinción con rojo de ponceau se utilizó como control de carga. Los niveles relativos de las proteínas indicadas se normalizaron respecto al control (esferoides tratados con el vehículo). (C, D) Distribución en las diferentes fases del ciclo celular de células disociadas de esferoides SW620 tratados como se describe en (A). (C) Gráficos de densidad poblacional de un experimento representativo, donde se muestra la distribución de las células según los niveles de Ki67 (marcador de proliferación celular) y la intensidad de fluorescencia del yoduro de propidio (PI). (D) Análisis cuantitativo de la proporción de células en las diferentes fases del ciclo celular de al menos 3 experimentos independientes. Los datos se representan por la media \pm EEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

6.4.3 El tratamiento combinado con 5FU y Adavivint altera el flujo autofágico de esferoides de SW620 tratados con 5FU

La autofagia es un proceso utilizado por las células cancerosas para sobrevivir a diversos tipos de estrés. Este proceso le permite a las células tumorales la eliminación de organelos dañados, y la degradación selectiva de proteínas para mantener la homeostasis celular. Los subproductos de la degradación son utilizados para la biosíntesis de nuevos componentes celulares y la obtención de energía ante estrés nutricional, hipoxia, irradiación y exposición a agentes citotóxicos como el 5FU.

Dada la evidencia acumulativa que respalda la inducción de autofagia como un mecanismo de supervivencia celular en respuesta al tratamiento quimioterapéutico en diversos tipos de cáncer, como el gástrico, cáncer de mama y hepatocarcinoma [221-223], se evaluó si la inhibición de la vía Wnt con Adavivint afecta la inducción de autofagia en respuesta al 5FU en esferoides de SW620. Para determinar cambios en los niveles de autofagia durante el tratamiento, se midieron los niveles de LC3B y p62 mediante *Western blot*, ya que estas proteínas están involucradas en la formación de autofagosomas y en la entrega de proteínas a los fagóforos para su degradación [224].

En la Figura 22A, se observa que tanto el 5FU como el Adavivint aumentan de manera independiente los niveles de LC3B-II (la forma conjugada a fosfatidiletanolamina de LC3B), esencial para la expansión de los fagóforos y la formación de autofagosomas. El tratamiento combinado (Adavivint+5FU) incrementó en mayor proporción los niveles de LC3B-II en comparación con el tratamiento solo con 5FU (incremento de 5.65 y 2.67 veces respecto a los niveles basales, respectivamente). Además, se observó un aumento significativo en el nivel de LC3B-I (la forma no conjugada) únicamente bajo este esquema de tratamiento (Figura 22A). Este aumento de LC3B-I y su conversión a LC3B-II podrían indicar un incremento en la síntesis de autofagosomas. Para determinar si la síntesis de autofagosomas esta asociada con la eficiente degradación de los mismos y su carga, se determinaron los niveles de p62, considerado un indicador del flujo autofágico. A pesar del incremento de LC3B-II inducido por el tratamiento combinado, también se observó un aumento significativo en los niveles de p62 en comparación con los niveles basales detectados en los esferoides control, lo que sugiere que el tratamiento combinado induce un bloqueo del flujo autofágico (Figura 22B).

Para examinar si el aumento de LC3B-II observado es debido a la alteración del flujo autofágico, los esferoides de SW620 fueron tratados con hidroxicloquina (HCQ), un inhibidor de la formación de auto-lisosomas (fusión de autofagosomas con lisosomas), que permite determinar cambios en la síntesis de autofagosomas y su degradación a través de la determinación de cambios en los niveles de LC3B-II [224]. Según lo previsto, el tratamiento exclusivo con HCQ por 72 h incrementó los niveles basales de LC3B-II, lo cual es acorde con una inducción basal de la autofagia. Cada tratamiento (5FU, Adavivint y Adavivint+5FU) en presencia de HCQ aumentó los niveles de LC3B-II, en comparación con el tratamiento solo con HCQ, indicativo de un aumento de la síntesis de autofagosomas [224].

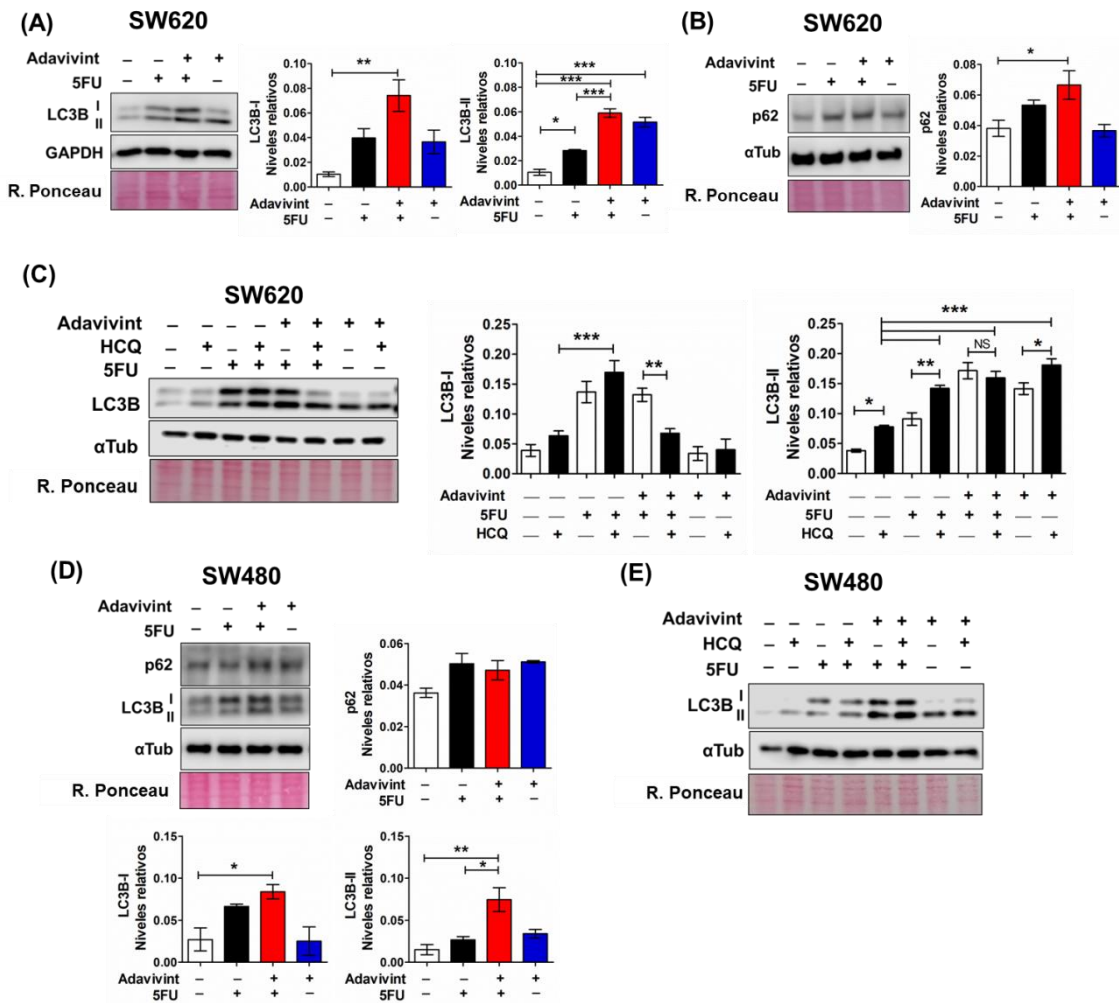


Figura 22. El inhibidor Adavivint altera el flujo autofágico de esferoides de la línea celular SW620. Niveles de LC3B (A) y p62 (B) de esferoides de SW620 tratados con o sin Adavivint (1µM) por 72 h, y posteriormente tratados con o sin 5FU por 72 h. (C) La determinación del efecto del Adavivint en el flujo autofágico se realizó mediante la adición de Hidroxicloroquina (HCQ, 20 µM) durante el tratamiento con 5FU. Después de 72h de tratamiento, los niveles de p62 y LC3B (I y II) se determinaron por *Western blot*. Los datos se representan por la media ± EEM de al menos tres ensayos independientes. (D) Niveles de LC3B y p62 de esferoides de SW480 tratados con o sin Adavivint (1µM) por 72 h, y posteriormente tratados con o sin 5FU por 72 h (n=2). (E) Análisis por *Western blot* de los niveles de LC3B en esferoides de SW480 pre-tratados con o sin Adavivint, y tratados en conjunto con HCQ (20 µM) y 5FU por 72 h (n=1). La tinción con rojo de ponceau se utilizó como control de carga. Los datos se representan por la media ± EEM. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Además, al comparar los tratamientos individuales de los compuestos (5FU o Adavivint) en presencia y ausencia de HCQ, se observó que la HCQ tiene un efecto aditivo en los niveles de LC3B-II, lo que sugiere que el 5FU y el Adavivint de manera independiente promueven el flujo autofágico. Sin embargo, el pre-tratamiento con Adavivint seguido del tratamiento con 5FU y HCQ, no aumentó los niveles de LC3B-II, en comparación con el tratamiento combinado en ausencia de la HCQ, lo cual sugiere un bloqueo del flujo autofágico en la etapa terminal de la autofagia (Figura 22C).

También se observó que el tratamiento combinado (Adavivint+5FU) en conjunto con HCQ, redujo los niveles de LC3B-I, en comparación con el tratamiento combinado sin HCQ, lo que podría implicar un efecto negativo en la síntesis de LC3-I o un aumento de la tasa de conversión a LC3-II. Sin embargo, esto no fue observado bajo otros tratamientos en presencia de HCQ.

En el caso de los esferoides de SW480, solo el tratamiento combinado (Adavivint+5FU) aumentó significativamente los niveles de LC3B-II y LC3B-I en comparación con los esferoides control, mientras que no se observaron cambios en los niveles de p62 bajo ningún tratamiento (Figura 22D). El tratamiento conjunto con HCQ tuvo un efecto similar al observado en los esferoides de SW620. Cada uno de los tratamientos farmacológicos utilizados incrementó la síntesis de autofagosomas. Sin embargo, al igual que en los esferoides de SW620, el tratamiento combinado (Adavivint+5FU) parece inducir un bloqueo del flujo autofágico, evidenciado por la detección de niveles similares de LC3B-II en presencia y ausencia de HCQ (Figura 22E). No obstante, para confirmar estos resultados se sugiere medir los niveles de p62 en presencia y ausencia de HCQ u otro inhibidor del flujo autofágico.

Estos resultados sugieren que el tratamiento combinado con Adavivint y 5FU altera la autofagia, lo cual podría comprometer el mantenimiento y supervivencia de la población troncal en los esferoides. La inhibición de la autofagia se ha asociado directamente con la pérdida de características troncales, como la disminución de marcadores asociados a troncalidad, (LGR5 y CD133), así como una reducción en la capacidad para formar esferoides en CRC [225].

6.4.3 La Inhibición de la vía Wnt canónica con Adavivint disminuye la expresión de marcadores asociados a troncalidad y la capacidad clonogénica de células tumorales en cultivo de esferoides

Finalmente, se exploró si la inhibición de la vía Wnt canónica con Adavivint impacta negativamente el fenotipo troncal de las CSCs presente en los esferoides. Para ello, primero se determinó el efecto del Adavivint y el 5FU en los niveles de LGR5 y CD133, cuya proporción incrementó en los cultivos de esferoides, como se describió anteriormente. Tanto el Adavivint como el 5FU disminuyeron los niveles de CD133 (Figura 23A), pero no ocasionaron cambios significativos en los niveles de LGR5 en los esferoides de SW480 y SW620 (Figura 23B). Al analizar los niveles de CD44v6, cuya expresión ha sido relacionada con resistencia a la terapia [113,114], se encontró que únicamente el 5FU aumentó los niveles de este marcador en las células SW480, mientras que el pre-tratamiento con Adavivint contrarrestó este efecto. En los esferoides de SW620, el Adavivint no alteró los niveles de este marcador (Figura 23C).

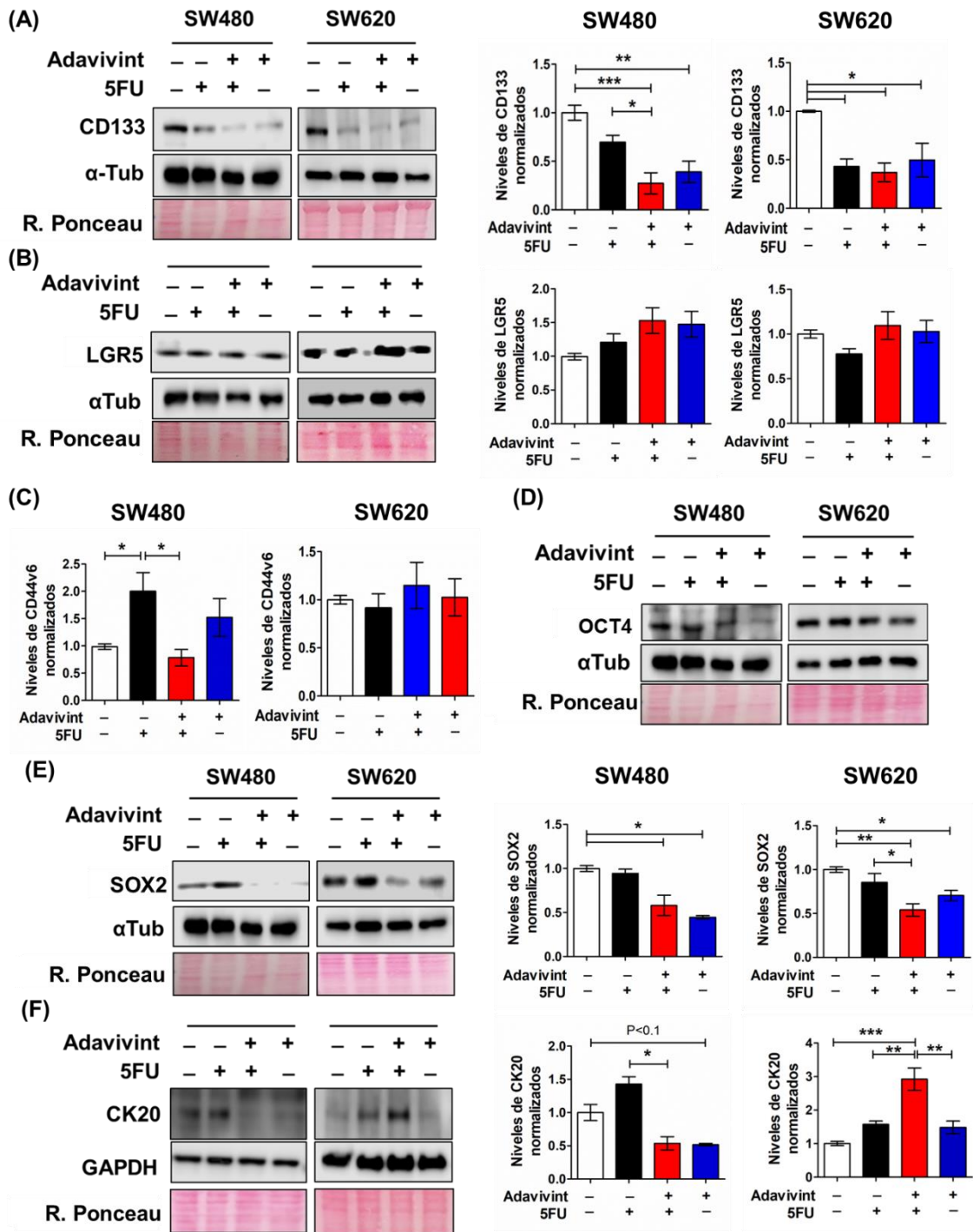


Figura 23. El inhibidor Adavivint reduce la expresión de marcadores asociados con troncalidad en esferoides de las líneas celulares SW620 y SW480. (A-E) Análisis por *Western blot* de CD133 (A), LGR5 (B), CD44v6 (C), OCT4 (D) y SOX2 (E) en esferoides de SW480 y SW620 tratados con o sin Adavivint (1 μ M) por 72 h, y posteriormente con o sin 5FU por 72 h. (F) Niveles de citoqueratina 20 (CK20) de esferoides de SW480 y SW620 tratados como se describió anteriormente. La tinción con rojo de ponceau se utilizó como control de carga. Los niveles relativos de las proteínas indicadas se normalizaron respecto al control (esferoides tratados con el vehículo). Los datos se representan por la media \pm EEM de al menos 3 ensayos independientes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

Además, teniendo en cuenta que los factores de transcripción SOX2 y OCT4 se han asociado con el mantenimiento de la capacidad de autorrenovación, tumorigenicidad y quimioresistencia de las CSCs [168, 226], se determinó el efecto del Adavivint en los niveles de estos factores de transcripción (Figura 23D y 23E). En los esferoides de SW620, el Adavivint disminuyó los niveles de SOX2, y este efecto fue más pronunciado cuando se utilizó en combinación con 5FU. En contraste, ninguno de los fármacos alteró significativamente los niveles de OCT4 en los esferoides de esta línea celular. El Adavivint tuvo un mayor efecto en los esferoides de SW480, donde ocasionó la disminución de los niveles de SOX2 y OCT4, lo cual implica un mayor efecto de este inhibidor en esta línea celular.

Dado que el Adavivint disminuyó la expresión de algunos marcadores de troncalidad, se investigó si este efecto estaba asociado con la expresión de citoqueratina 20 (CK20), un marcador de diferenciación intestinal ampliamente utilizado [88]. Solo se observó un aumento significativo de CK20 en los esferoides de SW620 tratados con Adavivint+5FU, mientras que en los esferoides de SW480 se observó un efecto contrario (Figura 23F). Estos datos en conjunto indican que el Adavivint induce respuestas variables entre los esferoides de ambas líneas celulares, y la intensidad del efecto parece depender del contexto celular.

Por otra parte, para determinar si el Adavivint afecta las propiedades funcionales de las CSCs, se evaluó su impacto en la clonogenicidad de las células en los esferoides de SW480 y SW620. Para ello, los esferoides de ambas líneas celulares fueron tratados con Adavivint durante 6 días; posteriormente, se disociaron y se sembraron a una densidad de 5000 células/mL en condiciones de crecimiento dependientes de anclaje. Después de 8 días de incubación, se procedió a cuantificar la eficiencia de formación de colonias (EFC). Mientras que el tratamiento con Adavivint redujo en un 37.45% la EFC de las células SW620, en las células SW480 se observó una notable disminución del 88.5%, en comparación con la EFC de las células de los esferoides control (Figura 24A).

Debido al marcado impacto del Adavivint en la clonogenicidad de las células SW480, se evaluó exclusivamente el efecto del tratamiento combinado (Adavivint + 5FU) en las células SW620. Aunque este tratamiento redujo en un 25.42%, en promedio la EFC, en comparación con las células de los esferoides tratados únicamente con 5FU, este cambio no alcanzó significancia estadística ($p=0.0589$) (Figura 24B). Además, se examinó la capacidad de formación de esferoides (crecimiento independiente de anclaje) después del tratamiento con 5FU solo o en combinación con Adavivint. Los cultivos de esferoides se mantuvieron hasta por 40 días, tiempo en el que se observaron esferoides establecidos. El tratamiento combinado redujo en un 55.5% el número de esferoides en comparación con el tratamiento exclusivo con 5FU (Figura 24C). Esto sugiere que la terapia combinada afecta adversamente propiedades asociadas a la troncalidad, incluida la capacidad de formación de esferoides evaluada en este estudio. No obstante, una subpoblación celular con capacidad de formación de esferoides, tolerante al tratamiento farmacológico, exhibió un aumento en los niveles de SOX2 en comparación con las células derivadas de los esferoides tratados

exclusivamente con 5FU (Figura 24D), sugiriendo así la activación de otros mecanismos que contribuyen a la resistencia de las CSCs al 5FU.

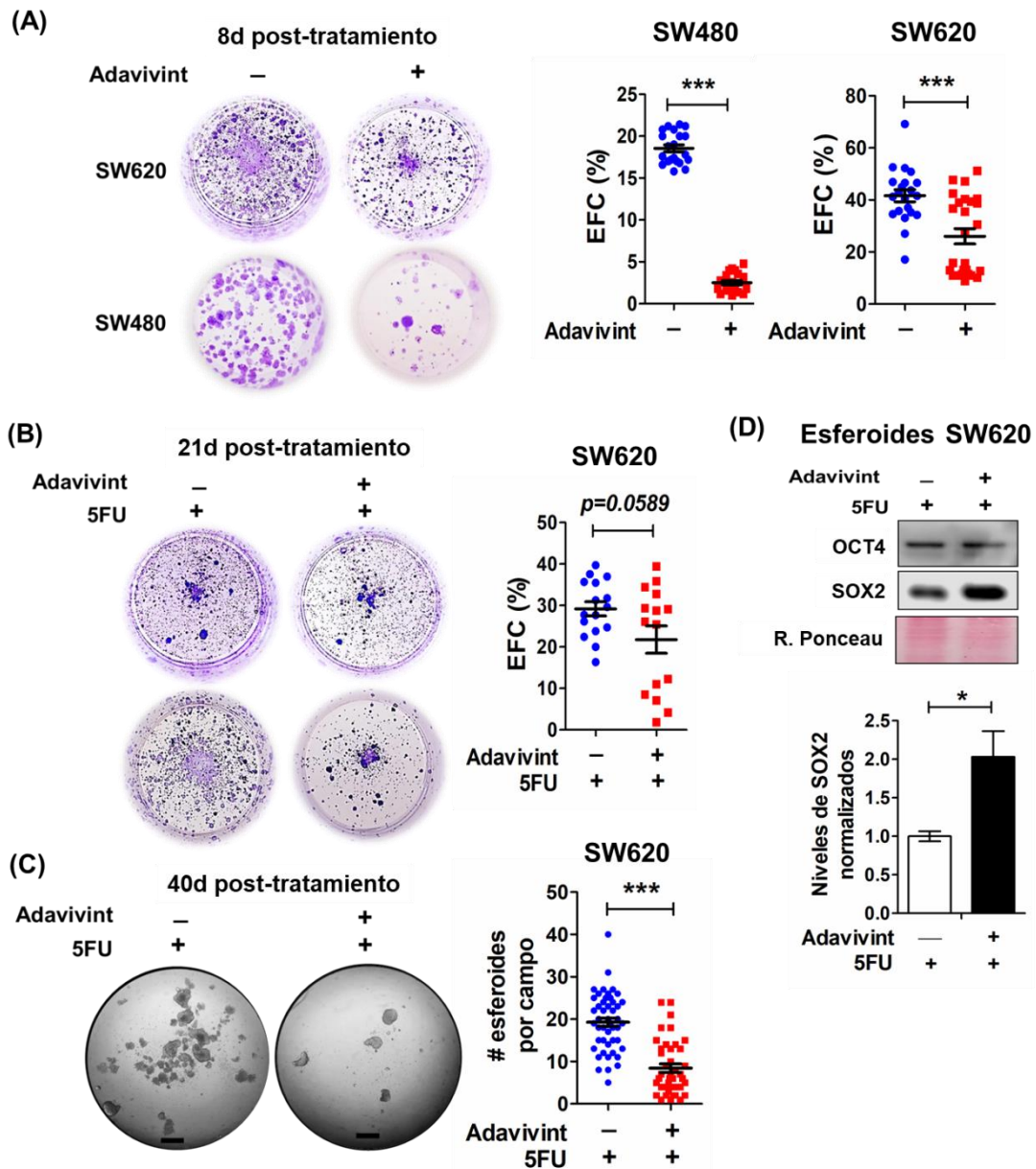


Figura 24. El inhibidor Adavivint reduce la clonogenicidad de esferoides de la línea celular SW480 y SW620. (A) Eficiencia de formación de colonias (EFC) de células derivadas de esferoides de SW480 y SW620 tratados con Adavivint (1 μ M) por 6 días en condiciones dependientes de anclaje. La EFC se determinó a los 8 días de incubación después de la resiembra, en ausencia del inhibidor. **(B, C)** La capacidad de proliferar después del tratamiento con 5FU o con Adavivint+5FU se evaluó en condiciones dependientes de anclaje **(B)** e independiente de anclaje **(C)** de células derivadas de esferoides SW620. **(B)** La EFC se determinó al día 21 del periodo de post-tratamiento (libre de fármacos). **(C)** La capacidad de formación de esferoides se determinó mediante el conteo de esferoides por cada campo visual de los pozos fotografiados en el día 40 del post-tratamiento (Barra de escala: 500 μ m). **(D)** Los esferoides establecidos al día 40 del post-tratamiento se colectaron y los niveles de OCT4 y SOX2 se determinaron por *Western blot*. La tinción con rojo de ponceau se utilizó como control

de carga. Los datos se representan por la media \pm EEM de al menos 3 ensayos independientes. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$.

En resumen, estos resultados sugieren que la inhibición de la vía Wnt canónica con Adavivint impacta negativamente el fenotipo troncal de las CSCs, y la intensidad de este efecto parece depender del contexto celular. Además, el tratamiento combinado con 5FU reduce la proporción de células con capacidad de formación de esferoides, una característica *in vitro* asociada a las CSCs. Este fenómeno, podría tener implicaciones negativas en la reconstitución de la población tumoral después de la suspensión del tratamiento farmacológico. Por lo tanto, sería relevante evaluar el uso de ambos fármacos en ensayos *in vivo* para poner a prueba esta hipótesis.

7. DISCUSIÓN

La vía de señalización Wnt es considerada como una de las principales vías reguladoras de la homeostasis intestinal y del mantenimiento de la población troncal en la base de las criptas intestinales. Consistente con esto, aproximadamente en el 85% de los pacientes con CRC, las células tumorales presentan alteraciones en esta vía. Los ligandos Wnt pueden activar diferentes cascadas de señalización, usualmente clasificadas como la vía canónica dependiente de la estabilización de β -catenina, y las vías no-canónicas, independientes de β -catenina; ambas implicadas en procesos como proliferación, supervivencia, migración e invasión celular en cáncer [164]. Mientras que la vía Wnt canónica ha sido directamente relacionada con el mantenimiento del fenotipo troncal en CRC, el papel de las vías Wnt no canónicas ha sido poco explorado. Aunque el papel citoprotector de la vía Wnt canónica se ha atribuido principalmente a la expresión de sus genes blancos, su contribución en la resistencia/tolerancia de las células CSCs a la terapia no está claramente establecida. En este estudio se investigó el papel de la vía Wnt canónica en la resistencia al 5FU de las células tumorales con fenotipo troncal enriquecidas en cultivos de esferoides. Además, se exploró si la vía Wnt/ Ca^{2+} /NFAT está involucrada en el papel citoprotector inducido por los ligandos Wnt3a y Wnt5a.

En este estudio, se demostró que el 5FU induce apoptosis y daño al DNA en diferentes proporciones en los esferoides de todas las líneas de CRC utilizadas. Los esferoides de la línea RKO mostraron una mayor sensibilidad al 5FU, mientras que los esferoides de la línea metastásica SW620 exhibieron resistencia a este fármaco, de acuerdo con los niveles de daño en el DNA y la muerte celular detectada al término del tratamiento, en comparación con los esferoides de las líneas SW480 y RKO tratados con 5FU. Además, el 5FU indujo la entrada a quiescencia en una subpoblación celular en los esferoides de todas las líneas celulares, independientemente del perfil mutacional de cada línea celular. La entrada a quiescencia se considera un mecanismo de resistencia, que le permite a las células tumorales eludir la acción citotóxica de los quimiofármacos, cuyo principal blanco son las células en proliferación [227]. No obstante, las células pueden entrar en un estado, ya sea de arresto transitorio o profundo, y la capacidad de repoblar los tumores dependerá de su capacidad para salir del estado de quiescencia una vez se suspende el tratamiento. Las señales extrínsecas y el estatus intracelular serán determinantes al momento de retomar el ciclo celular, como, por ejemplo, el nivel de mitógenos, la resolución de focos de daño en el DNA y el balance entre la actividad de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y sus inhibidores (p21, p27 y p57) al final de la mitosis [213, 228].

Para investigar el papel de la vía Wnt en la resistencia al 5FU, se siguieron dos estrategias metodológicas: (1) la estimulación de esferoides RKO con ligandos Wnt (Wnt3a y Wnt5a) para determinar si la activación de la vía Wnt canónica y la vía Wnt/ Ca^{2+} promueve supervivencia celular durante el tratamiento con 5FU. (2) Inhibición de la vía Wnt canónica en esferoides de líneas celulares que exhiben de manera constitutiva la activación de esta vía.

Los ligandos Wnt promueven supervivencia celular frente al 5FU

De acuerdo a los datos obtenidos durante la primera estrategia metodológica, tanto el ligando Wnt3a como Wnt5a favorecen la supervivencia celular en esferoides de RKO que exhibieron sensibilidad al 5FU. Aunque ambos ligandos contrarrestaron parcialmente la disminución de la expresión de ciclina D1, survivina y Bcl2 causada por el tratamiento con 5FU, solo el ligando Wnt3a promovió la estabilización de β -catenina y su actividad co-transcripcional. Esto sugiere que Wnt5a favorece la supervivencia celular mediante la activación de vías Wnt no canónicas. Resultados similares se observaron en los esferoides de la línea celular HT29, las cuales a pesar de presentar una mutación en el gen *APC* requieren de Wnt3a para inducir una alta activación de la vía Wnt canónica [155]. Esto es consistente con el aumento de los niveles de β -catenina (forma no fosforilada) y Axin2 detectados en respuesta al estímulo con Wnt3a en los esferoides de esta línea celular.

En concordancia con estos hallazgos, varios estudios indican que la activación de β -catenina/TCF participa en la quimioresistencia al inducir la transcripción de sus genes blanco, que incluyen genes que codifican transportadores ABC, proteínas involucradas en la reparación del DNA y regulación del ciclo celular [177, 180]. Lo anterior les otorga a las células la capacidad de sobrevivir ante condiciones subóptimas y, posteriormente, proliferar una vez las condiciones sean favorables. En este sentido, Cho *et al.* (2020) demostraron que el 5FU induce la activación de la vía Wnt canónica mediante la inducción transcripcional de *WNT3A* por p53 (wt) en las células tumorales residuales, lo que promueve la adquisición de un fenotipo troncal y la activación de las CSCs después del tratamiento farmacológico [158]. Además, la inhibición de la estabilización de β -catenina mediante el bloqueo de la secreción de Wnt3a con el inhibidor de porcupina LGK-974, suprimió la activación de las CSCs y redujo la tasa de crecimiento de los tumores después de la suspensión del tratamiento farmacológico [158].

Aunque la supresión de la secreción de ligandos Wnt bloquea la activación de la vía Wnt canónica y, por ende, la activación de las CSCs, los inhibidores de porcupina también pueden inhibir la activación de las vías Wnt no canónicas implicadas en proliferación, migración e invasión celular [136, 170, 200]. Además, recientemente un estudio realizado en nuestro laboratorio demostró la importancia de la vía Wnt/ Ca^{2+} /NFAT en la autorrenovación de las CSCs de líneas celulares de CRC [173]. Esto sugiere que la inhibición de esta vía podría obstaculizar el mantenimiento de las CSCs y sensibilizar a las células a la quimioterapia. Sin embargo, a pesar de que nuestros resultados indican que Wnt3a y Wnt5a pueden regular positivamente a NFAT1 y NFAT2 en los esferoides de RKO en ausencia del 5FU, su inhibición con el péptido 11R-VIVIT atenuó la muerte inducida por el 5FU, independientemente del estímulo con los ligandos Wnt. Estos resultados sugieren que la activación de NFAT podría no tener un papel relevante en la supervivencia inducida por los ligandos Wnt durante la quimioterapia, y contrario a lo esperado, su activación puede estar involucrada en la muerte celular inducida por el 5FU.

Estudios previos en CRC y otros tejidos han reportado que los NFATs no contribuyen necesariamente a los mismos procesos celulares, lo cual podría depender de la asociación con otros factores de transcripción y del tipo celular [147]. En relación al papel de los NFATs en la regulación de apoptosis y supervivencia celular, se ha informado que NFAT1/2 regulan positivamente los niveles de TRAIL y FasL, los cuales activan receptores de muerte para promover apoptosis [229, 230]. Esto es acorde a lo reportado por Han S. *et al.* (2017), quienes observaron que el co-tratamiento con temozolamida y litio indujo apoptosis mediante la activación de NFAT1/FasL en células de glioblastoma que expresan la forma silvestre de *TP53* (wt) [231]. Resultados similares fueron observados por Ding W. *et al.* (2016), quienes detectaron que la proteína p53 (wt) indujo la expresión de *NFATC2* (que codifica para NFAT1) en respuesta al daño citotóxico inducido por sulfuro de arsénico y, simultáneamente redujo los niveles de NFAT3 y NFAT4. En contraste, el silenciamiento de *NFATC3* (que codifica para NFAT4) promovió la estabilización de p53, indicando un circuito de regulación negativa entre estos dos factores de transcripción en la línea celular HCT116 de CRC [232]. Asimismo, aparte de controlar los niveles de p53, NFAT4 parece ser esencial para conservar la capacidad clonogénica y la proliferación celular *in vivo* de estas células [232].

Por otro lado, la proteína p53 (wt) también puede regular indirectamente la actividad de NFAT1 mediante la inducción transcripcional de *PRODH* (que codifica para prolina oxidasa). Un estudio previo demostró que la prolina oxidasa promueve la movilización de calcio intracelular y la activación de calcineurina mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, lo que resulta en la activación de NFAT1 y la inducción de apoptosis en células de cáncer de ovario y de CRC tratadas con etopósido [233]. No obstante, se ha informado que la sobreexpresión de *NFATC2*, puede prevenir la respuesta inducida por p53 en respuesta al daño al DNA en cáncer de mama, mediante la inducción transcripcional de *MDM2*, regulador negativo de p53 (wt) [234]. Asimismo, en cáncer de páncreas se ha reportado que la inhibición de NFAT1 y MDM2 sensibiliza a las células a la quimioterapia [235].

En conjunto, estos estudios indican que los NFATs pueden ser regulados de manera diferencial y desempeñar funciones opuestas dependiendo del contexto celular. Aunque en este estudio no se evaluó si el 5FU induce cambios en los niveles de los NFATs, es plausible que p53, en respuesta al daño inducido por 5FU, promueva la activación de NFAT1 en esferoides de RKO. Esto podría explicar la disminución de los niveles de PARP escindida en los esferoides tratados con el péptido 11R-VIVIT.

Debido a que no se hallaron datos que respalden la hipótesis de que la vía Wnt/Ca²⁺/NFAT favorece la supervivencia celular durante el tratamiento con 5FU, el efecto citoprotector inducido por Wnt3a en los esferoides de las líneas celulares RKO y HT29 se podría explicar parcialmente por la activación de la vía Wnt canónica, mientras que Wnt5a podría inducir la activación de otros efectores no canónicos, como SNAI1 [200], AKT [196, 199, 236] y YAP [237]. De igual forma, no se descarta la

posibilidad de que otros efectores dependientes de calcio también contribuyan al efecto citoprotector de Wnt3a y Wnt5a.

Evidencia en otros tipos de cáncer sugieren que la activación de PKC y CAMKII podrían mediar el efecto citoprotector de Wnt5a. Por ejemplo, la activación de PKC y CAMKII se ha asociado con la regulación positiva de ABCB1 en células de cáncer renal [238] y cáncer de ovario [239] resistentes a doxorubicina. Además, Fang *et al.* (2024) demostraron que la secreción de Wnt5a por parte de fibroblastos asociados al tumor, incrementó la resistencia a carboplatino mediante la activación de CREB1 en células de cáncer de ovario [240]. La activación de CREB fue esencial para el mantenimiento de la población de CSCs, caracterizadas por su mayor capacidad de formación de esferoides. En contraste, la inhibición de Wnt5a incrementó la actividad antineoplásica de carboplatino y suprimió el enriquecimiento de células con fenotipo troncal durante el tratamiento farmacológico. Teniendo en cuenta esta evidencia, queda por investigar si los ligandos Wnt pueden activar simultáneamente varios efectores en los esferoides de RKO y si su activación contribuye a la supervivencia celular independientemente de la activación de la vía Wnt canónica.

Inhibición de la vía Wnt canónica promueve supervivencia celular frente al 5FU, pero afecta negativamente el fenotipo troncal de líneas celulares de cáncer colorrectal que muestran activación constitutiva de esta vía

Nuestros resultados sugieren que la activación de β -catenina/TCF por Wnt3a en esferoides de RKO y HT29 podría explicar, al menos en parte, el efecto citoprotector de este ligando en una subpoblación celular presente en los esferoides tratados con 5FU. Además, un estudio previo reportó que la inhibición de la señalización Wnt3a/ β -catenina suprime el enriquecimiento de células con fenotipo troncal durante el tratamiento con 5FU y la posterior reconstitución de los tumores [158]. Esta evidencia respalda la hipótesis de que la inhibición de la vía Wnt canónica podría ser una potencial estrategia terapéutica para aumentar la muerte inducida por la quimioterapia y suprimir la adquisición de un fenotipo troncal durante el tratamiento farmacológico.

Sin embargo, en contraposición a esta hipótesis, en este estudio se encontró que la inhibición de la actividad transcripcional de β -catenina/TCF, ya sea mediante la expresión de una dominante negativa para TCF4 (dnTCF4) o la utilización del inhibidor farmacológico Adavivint en combinación con 5FU, contrarrestó el daño al DNA y la pérdida de la viabilidad celular inducida por 5FU en esferoides de SW620. Asimismo, el inhibidor Adavivint redujo el daño al DNA y la inducción de apoptosis en los esferoides de varias líneas celulares que presentan activación constitutiva de β -catenina/TCF debido a mutaciones en *APC* o *CTNNB1*. Aunque el 5FU promovió la entrada a quiescencia de una subpoblación celular presente en los esferoides, el pretratamiento con Adavivint no anuló este efecto y, adicionalmente, incrementó la proporción de células en G2/M, lo que sugiere un retraso en la progresión del ciclo celular. Un arresto transitorio en la fase Go y G2 podría favorecer la reparación del

daño al DNA, y explicaría la disminución de los niveles de p- γ H2AX observados en los esferoides tratados con Adavivint+5FU. La supresión del punto de control en G2 con inhibidores de las cinasas CHK1/CHK2 podría superar este efecto y conllevar a la acumulación de daño en el DNA seguido de apoptosis [40, 41, 241]. Se requieren estudios adicionales para someter a prueba esta hipótesis y evaluar el efecto de la inhibición de la vía Wnt canónica en la activación de mecanismos de reparación del DNA en la subpoblación de CSCs presente en los esferoides.

Asimismo, la inhibición de la vía Wnt/ β -catenina con Adavivint puede favorecer la acumulación de células en fase G2, posiblemente al ocasionar una disminución de la expresión de *CCNA2*, *CDC25A* y *CDC25C*, genes blancos de β -catenina/TCF/LEF [242, 243]. Las proteínas ciclina A y CDC25C son reguladores positivos de la progresión del ciclo celular durante las fase S y G2/M, y su reducción causa un bloqueo del ciclo celular [243], mientras que CDC25A desempeña un papel crucial durante la transición en G1/S y G2/M al eliminar la fosforilación inhibitoria que controla la actividad de varias cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) a lo largo del ciclo celular. Esto es consistente con la disminución de la forma activa de CDK2 (p-CDK2 Thr160) en los esferoides tratados con Adavivint. En concordancia con esta idea, Ding *et al.* (2014) demostró que la transcripción de genes durante la fase S-G2 es, al menos parcialmente, mediada por el complejo transcripcional β -catenina/TCF, y su inhibición obstaculiza la progresión a través de la fase G2/M de células de CRC [244]. Resultados similares se han reportado en cáncer nasofaríngeo [245], osteosarcoma [246], cáncer de mama [247] y en otros estudios en células de CRC [248, 249], donde la inhibición de la vía Wnt canónica induce arresto en la fase G2, comprometiendo así la progresión del ciclo celular y la supervivencia celular. Sin embargo, en este trabajo, la inhibición con Adavivint disminuyó la muerte y daño al DNA inducidos por 5FU, lo cual probablemente se deba a la eficiente reparación del DNA en poblaciones celulares con fenotipo troncal [48].

Por otro lado, aunque la inhibición de la vía Wnt canónica promovió la supervivencia celular en esferoides tratados con 5FU, su inhibición impactó negativamente características troncales, como la clonogenicidad y el nivel de proteína de varios marcadores asociados con troncalidad como CD133, CD44v6, SOX2 y OCT4 en esferoides de SW480 y SW620, aparentemente en dependencia del grado de malignidad de las células tumorales. Además, la autofagia fue alterada por el tratamiento Adavivint+5FU, lo cual ha sido directamente asociado con la supresión de características troncales en CRC y menos tolerancia al estrés celular [225, 250, 251]. Se necesitarían estudios adicionales para comprender el efecto a largo plazo de la alteración de la autofagia por el tratamiento combinado en comparación con el tratamiento individual con 5FU y Adavivint.

A pesar del efecto negativo del tratamiento Adavivint+5FU en el fenotipo troncal de las células de los esferoides de SW620, una pequeña subpoblación celular tolerante al tratamiento combinado persistió por 40 días y mostró un incremento de la expresión de SOX2, consistente con la reactivación de esta población residual capaz de formar esferoides. Este fenómeno sugiere la activación de un mecanismo alternativo que le

permite a las células sobrevivientes persistir durante y después del tratamiento farmacológico. En ese sentido, Álvarez-Varela *et al.* (2022) revelaron que la regulación negativa de genes blanco de la vía Wnt/ β -catenina forma parte de un mecanismo adaptivo que le permite a las células tumorales sobrevivir durante la quimioterapia. Asimismo, este mecanismo de adaptación se caracterizó por la adopción de un fenotipo de baja proliferación y la inducción de un programa transcripcional regulado por el coactivador transcripcional YAP [120], reconocido por su papel en la inducción de un programa de regeneración en el epitelio intestinal [252]. Hallazgos similares fueron obtenidos por Wu C *et al.* (2022), quienes al estudiar cómo las características de las células iniciadoras de tumores pueden fluctuar ante cambios en el microambiente, durante la diseminación hacia órganos distantes, e incluso durante la quimioterapia, encontraron que un ambiente estresante induce la adquisición de un fenotipo transitorio que le permite a una subpoblación celular tolerar el estrés del aislamiento y formar nuevas colonias mediante la creación de su propio nicho [253]. Aunque las CSCs han sido caracterizadas por poseer inherentemente resistencia a diferentes tipos de estrés, este grupo de investigadores observaron que algunas células no troncales podrían sufrir un proceso de reprogramación adaptativa que les permite sobrevivir ante condiciones subóptimas y contribuir a la reconstitución del tumor.

Respecto a las diferencias observadas entre el uso del Adavivint y la expresión de la dnTCF4 para inhibir la vía Wnt canónica, es necesario tener en cuenta que el Adavivint mediante la inhibición de las cinasas nucleares CLK2 y CLK3, ocasiona la formación de transcritos inestables de genes relacionados con la vía Wnt, entre los que se incluyen genes blanco de β -catenina/TCF como *MYC*, *BIRC5*, *AXIN2*, así como receptores *FDZ*, genes codificantes de las proteínas DVL y los factores de transcripción TCF/LEF [218, 254]. Por lo tanto, el Adavivint puede alterar no solo la expresión de genes regulados por TCF4, sino también de TCF1 y LEF1, evitando así el posible efecto compensatorio de estos factores de transcripción cuando únicamente se bloquea la transcripción de genes regulados por TCF4, mediante la expresión de la dominante negativa. Esto explicaría el efecto discreto de la dnTCF4 en la progresión del ciclo celular, la ausencia de cambios significativos en los niveles de survivina y de p-CDK2 en los esferoides de SW620, en contraste al efecto inducido por Adavivint.

Sin embargo, dado que el Adavivint puede inhibir otras cinasas, y que las cinasas CLK están activamente involucradas en la formación del espliceosoma, no se puede descartar el impacto de este compuesto en otras vías de señalización que podrían explicar el efecto global del tratamiento con Adavivint. Por ejemplo, Deshmukh V *et al.* (2019) demostraron que el Adavivint también altera la actividad de STAT3, NF κ B y FOXO1, lo cual reduce procesos inflamatorios y mejora la función de los condrocitos durante el tratamiento de la osteoartritis [218].

En varios tipos de cáncer, CLK2 correlaciona positivamente con un peor pronóstico de la enfermedad [255]. Específicamente en CRC, Zhou *et al.* (2022) encontraron que la alta expresión de CLK2 está asociada con un fenotipo más agresivo y la activación de la vía Wnt/ β -catenina; mientras que su deficiencia suprime la proliferación, la migración

e invasión celular [256]. Incluso, Funnell *et al.* (2017) reportaron que la inhibición de varias proteínas CLK (CLK1/2/3) con el fármaco T3 ocasiona arresto en la fase G2/M y apoptosis celular, mediante la modificación del empalme alternativo de varios transcritos de genes involucrados en ciclo celular, reparación del DNA, procesamiento del RNA y modificación de la cromatina [257]. En glioblastoma, el silenciamiento de CLK2 induce arresto celular mediante la vía de señalización AKT/FOXO3a/p27 [258]. En consistencia con esta evidencia, en nuestro estudio la inhibición de CLK2 con Adavivint estaría afectando negativamente la proliferación y el fenotipo troncal de las poblaciones celulares en los cultivos de esferoides, en parte mediante la inhibición de la vía Wnt canónica.

En resumen, la activación de la vía Wnt canónica mediante ligandos Wnt o debido a mutaciones en *APC* o *CTNNB1*, promueve resistencia al 5FU en cultivos de esferoides enriquecidos de CSCs. Esto en parte se logra mediante la regulación positiva de proteínas antiapoptóticas y el mantenimiento de características troncales. Sin embargo, dado que también se observó que la inhibición de esta vía disminuyó la muerte por apoptosis y el daño al DNA inducido por el 5FU, se sugiere precaución a la hora de utilizar inhibidores de esta vía como estrategia terapéutica, ya que la activación de mecanismos alternativos puede favorecer la tolerancia a la terapia dirigida. De hecho, según algunos informes en CRC, las células tumorales pueden perder su "adicción" a la vía Wnt/ β -catenina mediante la activación de la vía Hedgehog [189] y la activación de YAP [259], lo que permitiría superar la dependencia de β -catenina/TCF. Además, otros autores han mostrado que aunque la represión de la vía Wnt/ β -catenina podría reducir inicialmente el crecimiento tumoral, también podría conducir a un aumento de la capacidad migratoria, invasiva y metastásica de las células tumorales [190, 260, 261].

Por lo tanto, esta plasticidad celular subraya la necesidad de comprender los mecanismos adaptativos que pueden surgir durante el tratamiento antineoplásico con el fin de desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas y evitar la progresión del cáncer y recurrencia de la enfermedad.

8. CONCLUSIONES

- El 5-FU induce muerte celular, daño al DNA y entrada a quiescencia en esferoides de las líneas celulares de CRC evaluadas, pero en diferentes proporciones para cada una. La línea celular metastásica SW620 presenta mayor resistencia al 5FU y capacidad de proliferar después del tratamiento farmacológico.
- Los ligandos Wnt3a y Wnt5a promueven supervivencia celular en poblaciones celulares con fenotipo troncal/progenitor enriquecidas en los cultivos de esferoides. El efecto del ligando Wnt3a es parcialmente explicado por la activación de la vía Wnt/ β -catenina, mientras que, el ligando Wnt5a estimula vías no canónicas que regulan los niveles de survivina y Bcl2.
- Aunque los ligandos Wnt3a y Wnt5a incrementan los niveles de NFAT1 y NFAT2, su efecto citoprotector ante el 5FU parece ser independiente de la actividad de las proteínas NFAT.
- La inhibición de la vía Wnt/ β -catenina aunque disminuye la muerte inducida por el 5FU en esferoides de líneas celulares de CRC, su inhibición con Adavivint induce un efecto citostático severo que compromete la capacidad clonogénica y disminuye la expresión de marcadores asociados a troncalidad.
- El tratamiento combinado (Adavivint+5FU) seleccionó una subpoblación tolerante en los esferoides de la línea celular SW620, la cual tiene la capacidad de retomar el ciclo celular, recuperar los niveles de SOX2 y formar esferoides después del tratamiento farmacológico.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, en general se puede concluir que la activación de la vía Wnt canónica frente a la acción farmacológica del 5FU, favorece la supervivencia celular de poblaciones con fenotipo troncal/progenitor enriquecidas en cultivos de esferoides mediante la expresión de proteínas antiapoptóticas y mantenimiento de características asociadas con troncalidad. No obstante, mecanismos adaptativos durante la terapia pueden promover tolerancia al tratamiento y la persistencia de una subpoblación celular.

9. PERSPECTIVAS

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo se plantean las siguientes perspectivas:

1. Determinar si el estímulo crónico con ligandos Wnt3a y Wnt5a interfiere con el efecto del 5FU en la progresión del ciclo celular durante y después del tratamiento farmacológico en esferoides de células de CRC (RKO, SW480, SW620).
2. Dado que el uso de 11R-VIVIT inhibe la actividad de los NFATs (1-4), y a que el tratamiento con este inhibidor disminuyó la muerte inducida por 5FU independientemente del estímulo con ligandos Wnt, se recomienda determinar si el 5FU promueve apoptosis mediante la activación de los NFATs, así como evaluar si la inhibición específica de cada miembro de esta familia puede alterar la citotoxicidad del 5FU en esferoides de RKO y esferoides de otras líneas celulares.
3. Determinar si los ligandos Wnt inducen la activación de otros efectores a parte de las proteínas NFATs río abajo de la activación de PLC/Ca²⁺, como PKC y CAMKII, y evaluar si contribuyen a la supervivencia celular durante el tratamiento con 5FU.
4. Teniendo en cuenta que la inhibición de la vía Wnt canónica mediante la expresión de dnTCF4 y el compuesto Adavivint reduce el daño al DNA inducido por 5FU en esferoides de líneas celulares de CRC, que exhiben altos niveles de activación de esta vía de señalización, sería necesario evaluar si la inducción de mecanismos de reparación del DNA, por ejemplo, por la activación de los ejes de señalización ATM/CHK2 y ATM/CHK1, podrían estar mediando esta respuesta.
5. Debido a que el inhibidor Adavivint induce diferentes grados de respuesta entre los esferoides de las líneas celulares SW480 y SW620 que particularmente provienen del mismo paciente, sería plausible determinar a nivel global la respuesta diferencial ante el tratamiento sólo con Adavivint y el tratamiento combinado con 5FU mediante análisis de transcriptoma por RNA-seq, con el objetivo de dilucidar mecanismos adaptativos diferenciales, y la posible alteración de otras vías de señalización independiente de β -catenina/TCF, que pueda explicar el efecto global de este inhibidor.
6. Profundizar en el efecto de la inhibición de la vía Wnt canónica en la autofagia, y particularmente, el impacto del Adavivint en combinación con 5FU en la activación de la autofagia durante el tratamiento a corto plazo, así como su efecto a largo plazo en el mantenimiento de características troncales y supervivencia celular durante el post-tratamiento.

7. Caracterizar la población celular residual en los esferoides de SW620 tratados con Adavivint+5FU, que tienen la capacidad de formar esferoides después de un periodo de latencia. Además, sería importante evaluar si en otras células tumorales metastásicas se reproduce este efecto y determinar su grado de dependencia de la vía Wnt canónica.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Agencia Internacional para el estudio del Cáncer (GLOBOCAN 2020). Cáncer colorectal[Archivo pdf]. https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/10_8_9-Colorectum-fact-sheet.pdf
- 2 Agencia Internacional para el estudio del Cáncer (GLOBOCAN 2020). Cancer Tomorrow.https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/bubbles?types=0&sexes=0&mode=cancer&group_populations=1&multiple_populations=1&multiple_cancers=1&cancers=8_9&populations=903_904_905_908_909_935&apc=cat_ca20v1.5_ca23v-1.5&group_cancers=0
- 3 Siegel, R. L., Wagle, N. S., Cercek, A., Smith, R. A., & Jemal, A. (2023). Colorectal cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(3), 233–254. <https://doi.org/10.3322/caac.21772>
- 4 Leal-Omar, Jaime, Zarate-Guzmán, Jacobo, Peniche-Moguel, Pilar, Gil-Rojas, Nashiely, Briones-Fraga, Sandra, Gómez-García, Thalía, Morones-Navarrete, Gisela, & Mena-Contreras, Alberth Alfonso. (2019). Demografía del cáncer colorrectal en los últimos 5 años de un hospital oncológico. *Endoscopia*, 31(Supl. 2), 363-369. Epub 14 de febrero de 2022. <https://doi.org/10.24875/end.m19000125>
- 5 Keum, N., & Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(12), 713–732. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8>
- 6 O’Connell, M. J., Campbell, M. E., Goldberg, R. M., Grothey, A., Seitz, J.-F., Benedetti, J. K., André, T., Haller, D. G., & Sargent, D. J. (2008). Survival following recurrence in stage II and III colon cancer: findings from the ACCENT data set. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(14), 2336–2341. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.8261>
- 7 de Gramont, A., Hubbard, J., Shi, Q., O’Connell, M. J., Buyse, M., Benedetti, J., Bot, B., O’Callaghan, C., Yothers, G., Goldberg, R. M., Blanke, C. D., Benson, A., Deng, Q., Alberts, S. R., Andre, T., Wolmark, N., Grothey, A., & Sargent, D. (2010). Association between disease-free survival and overall survival when survival is prolonged after recurrence in patients receiving cytotoxic adjuvant therapy for colon cancer: simulations based on the 20,800 patient ACCENT data set. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(3), 460–465. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.1407>
- 8 Sargent, D., Shi, Q., Yothers, G., van Cutsem, E., Cassidy, J., Saltz, L., Wolmark, N., Bot, B., Grothey, A., Buyse, M., de Gramont, A., & Adjuvant Colon Cancer End-points (ACCENT) Group. (2011). Two or three year disease-free survival (DFS) as a primary end-point in stage III adjuvant colon cancer trials with fluoropyrimidines with or without oxaliplatin or irinotecan: data from 12,676 patients from MOSAIC, X-ACT, PETACC-3, C-06, C-07 and C89803. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 47(7), 990–996. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.12.015>

- 9 Hu, T., Li, Z., Gao, C.-Y., & Cho, C. H. (2016). Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World Journal of Gastroenterology*, 22(30), 6876–6889. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i30.6876>
- 10 Sociedad Americana del Cáncer. Etapas del cáncerr colorectal. <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-o-recto/deteccion-diagnostico-clasificacion-por-etapas/clasificacion-de-la-etapa.html>
- 11 Sociedad Americana del Cáncer. Quimioterapia contra el cáncer colorectal. . <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/quimioterapia.html>
- 12 Xie, Y.-H., Chen, Y.-X., & Fang, J.-Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 22. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0116-z>
- 13 Biller, L. H., & Schrag, D. (2021). Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: A Review. *JAMA*, 325(7), 669–685. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.0106>
- 14 Sociedad Americana del Cáncer. Medicamentos de terapia dirigida contra el cáncer colorrectal. <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-colon-o-recto/tratamiento/terapia-dirigida.html>
- 15 Van Cutsem, E., Cervantes, A., Adam, R., Sobrero, A., Van Krieken, J. H., Aderka, D., Aranda Aguilar, E., Bardelli, A., Benson, A., Bodoky, G., Ciardiello, F., D'Hoore, A., Diaz-Rubio, E., Douillard, J. Y., Ducreux, M., Falcone, A., Grothey, A., Gruenberger, T., Haustermans, K., Heinemann, V., ... Arnold, D. (2016). ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 27(8), 1386–1422. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw235>
- 16 Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., Ferrara, N., Fyfe, G., Rogers, B., Ross, R., & Kabbinavar, F. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 350(23), 2335–2342. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa032691>
- 17 Grothey, A., Sugrue, M. M., Purdie, D. M., Dong, W., Sargent, D., Hedrick, E., & Kozloff, M. (2008). Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: results from a large observational cohort study (BRiTE). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(33), 5326–5334. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.3212>
- 18 Tabernero, J., Grothey, A., Van Cutsem, E., Yaeger, R., Wasan, H., Yoshino, T., Desai, J., Ciardiello, F., Loupakis, F., Hong, Y. S., Steeghs, N., Guren, T. K., Arkenau, H. T., Garcia-Alfonso, P., Elez, E., Gollerkeri, A., Maharry, K., Christy-Bittel, J., & Kopetz, S. (2021). Encorafenib Plus Cetuximab as a New Standard of Care for Previously Treated BRAF V600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: Updated Survival Results and Subgroup Analyses from the BEACON Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 39(4), 273–284. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.02088>

- 19 U.S. Food and Drug Federation (19 de enero de 2023). FDA grants accelerated approval to tucatinib with trastuzumab for colorectal cancer. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-tucatinib-trastuzumab-colorectal-cancer>
- 20 Hammond, W. A., Swaika, A., & Mody, K. (2016). Pharmacologic resistance in colorectal cancer: a review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 8(1), 57–84. <https://doi.org/10.1177/1758834015614530>
- 21 Azwar, S., Seow, H. F., Abdullah, M., Faisal Jabar, M., & Mohtarrudin, N. (2021). Recent Updates on Mechanisms of Resistance to 5-Fluorouracil and Reversal Strategies in Colon Cancer Treatment. *Biology*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/biology10090854>
- 22 Amstutz, U., Henricks, L. M., Offer, S. M., Barbarino, J., Schellens, J. H. M., Swen, J. J., Klein, T. E., McLeod, H. L., Caudle, K. E., Diasio, R. B., & Schwab, M. (2018). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 103(2), 210–216. <https://doi.org/10.1002/cpt.911>
- 23 Guo, X., Goessl, E., Jin, G., Collie-Duguid, E. S., Cassidy, J., Wang, W., & O'Brien, V. (2008). Cell cycle perturbation and acquired 5-fluorouracil chemoresistance. *Anticancer research*, 28(1A), 9–14.
- 24 de Angelis, P. M., Fjell, B., Kravik, K. L., Haug, T., Tunheim, S. H., Reichelt, W., Beigi, M., Clausen, O. P., Galteland, E., & Stokke, T. (2004). Molecular characterizations of derivatives of HCT116 colorectal cancer cells that are resistant to the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil. *International journal of oncology*, 24(5), 1279–1288.
- 25 Kim, D. S., Min, K., & Lee, S. K. (2020). Cell Cycle Dysregulation Is Associated With 5-Fluorouracil Resistance in Gastric Cancer Cells. *Anticancer research*, 40(6), 3247–3254. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14306>
- 26 Wyatt, M. D., & Wilson, D. M., 3rd (2009). Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(5), 788–799. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8557-5>
- 27 Meyers, M., Hwang, A., Wagner, M. W., Bruening, A. J., Veigl, M. L., Sedwick, W. D., & Boothman, D. A. (2003). A role for DNA mismatch repair in sensing and responding to fluoropyrimidine damage. *Oncogene*, 22(47), 7376–7388. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206941>
- 28 Matuo, R., Sousa, F. G., Escargueil, A. E., Soares, D. G., Grivicich, I., Saffi, J., Larsen, A. K., & Henriques, J. A. (2010). DNA repair pathways involved in repair of lesions induced by 5-fluorouracil and its active metabolite FdUMP. *Biochemical pharmacology*, 79(2), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.08.016>
- 29 Fujinaka, Y., Matsuoka, K., Iimori, M., Tuul, M., Sakasai, R., Yoshinaga, K., Saeki, H., Morita, M., Kakeji, Y., Gillespie, D. A., Yamamoto, K., Takata, M., Kitao, H., & Maehara, Y. (2012). ATR-Chk1 signaling pathway and homologous recombinational repair protect cells from 5-fluorouracil cytotoxicity. *DNA repair*, 11(3), 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.11.005>
- 30 Nakagawa, Y., Kajihara, A., Takahashi, A., Kondo, N., Mori, E., Kirita, T., & Ohnishi, T. (2014). The BRCA2 gene is a potential molecular target during 5-

- fluorouracil therapy in human oral cancer cells. *Oncology reports*, 31(5), 2001–2006. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3080>
- 31 Roepman, P., Schlicker, A., Tabernero, J., Majewski, I., Tian, S., Moreno, V., Snel, M. H., Chresta, C. M., Rosenberg, R., Nitsche, U., Macarulla, T., Capella, G., Salazar, R., Orphanides, G., Wessels, L. F. A., Bernardis, R., & Simon, I. M. (2014). Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *International Journal of Cancer*, 134(3), 552–562. <https://doi.org/10.1002/ijc.28387>
- 32 Sveen, A., Kopetz, S., & Lothe, R. A. (2020). Biomarker-guided therapy for colorectal cancer: strength in complexity. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 17(1), 11–32. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0241-1>
- 33 Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 74–88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
- 34 Jardim, M. J., Wang, Q., Furumai, R., Wakeman, T., Goodman, B. K., & Wang, X.-F. (2009). Reduced ATR or Chk1 Expression Leads to Chromosome Instability and Chemosensitization of Mismatch Repair–deficient Colorectal Cancer Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 20(17), 3801–3809. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-04-0303>
- 35 Lee, J.-H., & Paull, T. T. (2021). Cellular functions of the protein kinase ATM and their relevance to human disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 22(12), 796–814. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00394-2>
- 36 Srinivas, U. S., Dyczkowski, J., Beißbarth, T., Gaedcke, J., Mansour, W. Y., Borgmann, K., & Dobbstein, M. (2015). 5-Fluorouracil sensitizes colorectal tumor cells towards double stranded DNA breaks by interfering with homologous recombination repair. *Oncotarget*, 6(14), 12574–12586. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3728>
- 37 Liu, Z., Yu, M., Fei, B., Sun, J., & Wang, D. (2019). Nonhomologous end joining key factor XLF enhances both 5-fluorouracil and oxaliplatin resistance in colorectal cancer. *OncoTargets and Therapy*, 12, 2095–2104. <https://doi.org/10.2147/OTT.S192923>
- 38 Ogiwara, H., Ui, A., Otsuka, A., Satoh, H., Yokomi, I., Nakajima, S., Yasui, A., Yokota, J., & Kohno, T. (2011). Histone acetylation by CBP and p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. *Oncogene*, 30(18), 2135–2146. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.592>
- 39 Chen, X., Li, W.-F., Wu, X., Zhang, H.-C., Chen, L., Zhang, P.-Y., Liu, L.-Y., Ma, D., Chen, T., Zhou, L., Xu, Y., Zhou, M.-T., & Tang, K.-F. (2017). Dicer regulates non-homologous end joining and is associated with chemosensitivity in colon cancer patients. *Carcinogenesis*, 38(9), 873–882. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx059>
- 40 Barnaba, N., & LaRocque, J. R. (2021). Targeting cell cycle regulation via the G2-M checkpoint for synthetic lethality in melanoma. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 20(11), 1041–1051. <https://doi.org/10.1080/15384101.2021.1922806>

- 41 Vlatkovic, T., Veldwijk, M. R., Giordano, F. A., & Herskind, C. (2022). Targeting Cell Cycle Checkpoint Kinases to Overcome Intrinsic Radioresistance in Brain Tumor Cells. *Cancers*, 14(3). <https://doi.org/10.3390/cancers14030701>
- 42 Pabla, N., Huang, S., Mi, Q.-S., Daniel, R., & Dong, Z. (2008). ATR-Chk2 Signaling in p53 Activation and DNA Damage Response during Cisplatin-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6572–6583. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707568200>
- 43 Zannini, L., Delia, D., & Buscemi, G. (2014). CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *Journal of Molecular Cell Biology*, 6(6), 442–457. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mju045>
- 44 Yao, J., Huang, A., Zheng, X., Liu, T., Lin, Z., Zhang, S., Yang, Q., Zhang, T., & Ma, H. (2017). 53BP1 loss induces chemoresistance of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil by inhibiting the ATM–CHK2–P53 pathway. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 143(3), 419–431. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2302-5>
- 45 He, L., Zhu, H., Zhou, S., Wu, T., Wu, H., Yang, H., Mao, H., SekharKathera, C., Janardhan, A., Edick, A. M., Zhang, A., Hu, Z., Pan, F., & Guo, Z. (2018). Wnt pathway is involved in 5-FU drug resistance of colorectal cancer cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(8), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0128-8>
- 46 Dietlein, F., Kalb, B., Jokic, M., Noll, E. M., Strong, A., Tharun, L., Ozretić, L., Künstlinger, H., Kambartel, K., Randerath, W. J., Jüngst, C., Schmitt, A., Torgovnick, A., Richters, A., Rauh, D., Siedek, F., Persigehl, T., Mauch, C., Bartkova, J., ... Reinhardt, H. C. (2015). A Synergistic Interaction between Chk1- and MK2 Inhibitors in KRAS-Mutant Cancer. *Cell*, 162(1), 146–159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.053>
- 47 Martino-Echarri, E., Henderson, B. R., & Brocardo, M. G. (2014). Targeting the DNA replication checkpoint by pharmacologic inhibition of Chk1 kinase: a strategy to sensitize APC mutant colon cancer cells to 5-fluorouracil chemotherapy. *Oncotarget*, 5(20), 9889–9900. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2475>
- 48 di Franco, S., Parrino, B., Gaggianesi, M., Pantina, V. D., Bianca, P., Nicotra, A., Mangiapane, L. R., lo Iacono, M., Ganduscio, G., Veschi, V., Brancato, O. R., Glaviano, A., Turdo, A., Pillitteri, I., Colarossi, L., Cascioferro, S., Carbone, D., Pecoraro, C., Fiori, M. E., ... Stassi, G. (2021). CHK1 inhibitor sensitizes resistant colorectal cancer stem cells to nortopsentin. *IScience*, 24(6), 102664. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102664>
- 49 Narayan, S., Jaiswal, A. S., Sharma, R., Nawab, A., Duckworth, L. V., Law, B. K., Zajac-Kaye, M., George, T. J., Sharma, J., Sharma, A. K., & Hromas, R. A. (2017). NSC30049 inhibits Chk1 pathway in 5-FU-resistant CRC bulk and stem cell populations. *Oncotarget*, 8(34), 57246–57264. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19778>
- 50 Massey, A. J. (2016). Inhibition of ATR-dependent feedback activation of Chk1 sensitises cancer cells to Chk1 inhibitor monotherapy. *Cancer Letters*, 383(1), 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.09.024>

- 51 Violette, S., Poulain, L., Dussaulx, E., Pepin, D., Faussat, A.-M., Chambaz, J., Lacorte, J.-M., Staedel, C., & Lesuffleur, T. (2002). Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-X(L) in addition to Bax and p53 status. *International Journal of Cancer*, 98(4), 498–504. <https://doi.org/10.1002/ijc.10146>
- 52 Petak, I., Tillman, D. M., & Houghton, J. A. (2000). p53 dependence of Fas induction and acute apoptosis in response to 5-fluorouracil-leucovorin in human colon carcinoma cell lines. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 6(11), 4432–4441.
- 53 Petak, I., Danam, R. P., Tillman, D. M., Vernes, R., Howell, S. R., Berczi, L., Kopper, L., Brent, T. P., & Houghton, J. A. (2003). Hypermethylation of the gene promoter and enhancer region can regulate Fas expression and sensitivity in colon carcinoma. *Cell Death and Differentiation*, 10(2), 211–217. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401132>
- 54 Maji, S., Shriwas, O., Samal, S. K., Priyadarshini, M., Rath, R., Panda, S., das Majumdar, S. K., Muduly, D. K., & Dash, R. (2019). STAT3- and GSK3 β -mediated Mcl-1 regulation modulates TPF resistance in oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 40(1), 173–183. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy135>
- 55 Yue, Y., Zhang, Q., Wang, X., & Sun, Z. (2023). STAT3 regulates 5-Fu resistance in human colorectal cancer cells by promoting Mcl-1-dependent cytoprotective autophagy. *Cancer Science*, 114(6), 2293–2305. <https://doi.org/10.1111/cas.15761>
- 56 Yang, Y., Ma, L., Xu, Y., Liu, Y., Li, W., Cai, J., & Zhang, Y. (2020). Enalapril overcomes chemoresistance and potentiates antitumor efficacy of 5-FU in colorectal cancer by suppressing proliferation, angiogenesis, and NF- κ B/STAT3-regulated proteins. *Cell Death & Disease*, 11(6), 477. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2675-x>
- 57 Fu, J., Xu, Y., Yang, Y., Liu, Y., Ma, L., & Zhang, Y. (2019). Aspirin suppresses chemoresistance and enhances antitumor activity of 5-Fu in 5-Fu-resistant colorectal cancer by abolishing 5-Fu-induced NF- κ B activation. *Scientific Reports*, 9(1), 16937. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53276-1>
- 58 Wang, W., Cassidy, J., O'Brien, V., Ryan, K. M., & Collie-Duguid, E. (2004). Mechanistic and predictive profiling of 5-Fluorouracil resistance in human cancer cells. *Cancer Research*, 64(22), 8167–8176. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0970>
- 59 Lan, W., Zhao, J., Chen, W., Shang, H., Peng, J., & Lin, J. (2021). Anlotinib Overcomes Multiple Drug Resistant Colorectal Cancer Cells via Inactivating PI3K/AKT Pathway. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 21(15), 1987–1995. <https://doi.org/10.2174/1871520621666210112113852>
- 60 Wang, H., Zhang, L., Yang, X., Jin, Y., Pei, S., Zhang, D., Zhang, H., Zhou, B., Zhang, Y., & Lin, D. (2015). PUMA mediates the combinational therapy of 5-FU and NVP-BEZ235 in colon cancer. *Oncotarget*, 6(16), 14385–14398. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3775>
- 61 Li, J., Hou, N., Faried, A., Tsutsumi, S., Takeuchi, T., & Kuwano, H. (2009). Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis

- in colon cancer cells. *Annals of Surgical Oncology*, 16(3), 761–771. <https://doi.org/10.1245/s10434-008-0260-0>
- 62 Li, J., Hou, N., Faried, A., Tsutsumi, S., & Kuwano, H. (2010). Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 46(10), 1900–1909. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.021>
- 63 Bhardwaj, M., Cho, H. J., Paul, S., Jakhar, R., Khan, I., Lee, S.-J., Kim, B.-Y., Krishnan, M., Khaket, T. P., Lee, H. G., & Kang, S. C. (2018). Vitexin induces apoptosis by suppressing autophagy in multi-drug resistant colorectal cancer cells. *Oncotarget*, 9(3), 3278–3291. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22890>
- 64 Zhao, L., Chen, H., Zhang, Q., Ma, J., Hu, H., & Xu, L. (2022). ATF4-mediated microRNA-145/HDAC4/p53 axis affects resistance of colorectal cancer cells to 5-fluorouracil by regulating autophagy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 89(5), 595–607. <https://doi.org/10.1007/s00280-021-04393-0>
- 65 Denton, D., & Kumar, S. (2019). Autophagy-dependent cell death. *Cell Death & Differentiation*, 26(4), 605–616. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0252-y>
- 66 Liu, S., Lin, H., Wang, D., Li, Q., Luo, H., Li, G., Chen, X., Li, Y., Chen, P., Zhai, B., Wang, W., Zhang, R., Chen, B., Zhang, M., Han, X., Li, Q., Chen, L., Liu, Y., Chen, X., ... Sui, X. (2019). PCDH17 increases the sensitivity of colorectal cancer to 5-fluorouracil treatment by inducing apoptosis and autophagic cell death. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 4, 53. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0087-0>
- 67 Alnuqaydan, A. M., Rah, B., Almutary, A. G., & Chauhan, S. S. (2020). Synergistic antitumor effect of 5-fluorouracil and withaferin-A induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and apoptosis in colorectal cancer cells. *American Journal of Cancer Research*, 10(3), 799–815.
- 68 Alnuqaydan, A. M., Rah, B., Almutary, A. G., & Chauhan, S. S. (2020). Synergistic antitumor effect of 5-fluorouracil and withaferin-A induces endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy and apoptosis in colorectal cancer cells. *American Journal of Cancer Research*, 10(3), 799–815.
- 69 Levy, J. M. M., Towers, C. G., & Thorburn, A. (2017). Targeting autophagy in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 17(9), 528–542. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.53>
- 70 Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H. L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A. K., Huang, R. Y. J., Kalcheim, C., Kalluri, R., ... EMT International Association (TEMTIA) (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(6), 341–352. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>
- 71 Weiss, F., Lauffenburger, D., & Friedl, P. (2022). Towards targeting of shared mechanisms of cancer metastasis and therapy resistance. *Nature Reviews. Cancer*, 22(3), 157–173. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00427-0>
- 72 Kim, A.-Y., Kwak, J.-H., Je, N. K., Lee, Y.-H., & Jung, Y.-S. (2015). Epithelial-mesenchymal Transition is Associated with Acquired Resistance to 5-

- Fluorouracil in HT-29 Colon Cancer Cells. *Toxicological Research*, 31(2), 151–156. <https://doi.org/10.5487/TR.2015.31.2.151>
- 73 Zhang, L., Song, R., Gu, D., Zhang, X., Yu, B., Liu, B., & Xie, J. (2017). The role of GLI1 for 5-Fu resistance in colorectal cancer. *Cell & Bioscience*, 7(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13578-017-0145-7>
- 74 Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 14(10), 611–629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>
- 75 Saxena, M., Stephens, M. A., Pathak, H., & Rangarajan, A. (2011). Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters. *Cell Death & Disease*, 2(7), e179. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.61>
- 76 Wu, W.-S., Heinrichs, S., Xu, D., Garrison, S. P., Zambetti, G. P., Adams, J. M., & Look, A. T. (2005). Slug antagonizes p53-mediated apoptosis of hematopoietic progenitors by repressing puma. *Cell*, 123(4), 641–653. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.029>
- 77 Wang, L., Hensch, N. R., Bondra, K., Sreenivas, P., Zhao, X. R., Chen, J., Moreno Campos, R., Baxi, K., Vaseva, A. v, Sunkel, B. D., Gryder, B. E., Pomella, S., Stanton, B. Z., Zheng, S., Chen, E. Y., Rota, R., Khan, J., Houghton, P. J., & Ignatius, M. S. (2021). SNAI2-Mediated Repression of BIM Protects Rhabdomyosarcoma from Ionizing Radiation. *Cancer Research*, 81(21), 5451–5463. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-4191>
- 78 Dai, Y., Wang, L., Tang, J., Cao, P., Luo, Z., Sun, J., Kiflu, A., Sai, B., Zhang, M., Wang, F., Li, G., & Xiang, J. (2016). Activation of anaphase-promoting complex by p53 induces a state of dormancy in cancer cells against chemotherapeutic stress. *Oncotarget*, 7(18), 25478–25492. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8172>
- 79 Sakowicz-Burkiewicz, M., Przybyla, T., Wessering, M., Bielarczyk, H., Maciejewska, I., & Pawelczyk, T. (2016). Suppression of TWIST1 enhances the sensitivity of colon cancer cells to 5-fluorouracil. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 78, 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.024>
- 80 Wang, H., Li, J., Wei, W., Yang, R., Chen, D., Ma, X., Jiang, G., & Wang, B. (2020). Regulation of ATP-binding cassette subfamily B member 1 by Snail contributes to chemoresistance in colorectal cancer. *Cancer Science*, 111(1), 84–97. <https://doi.org/10.1111/cas.14253>
- 81 Yang, Y., Jiang, H., Li, W., Chen, L., Zhu, W., Xian, Y., Han, Z., Yin, L., Liu, Y., Wang, Y., Pan, K., & Zhang, K. (2020). FOXM1/DVL2/Snail axis drives metastasis and chemoresistance of colorectal cancer. *Aging*, 12(23), 24424–24440. <https://doi.org/10.18632/aging.202300>
- 82 Liu, F., Wu, Q., Dong, Z., & Liu, K. (2023). Integrins in cancer: Emerging mechanisms and therapeutic opportunities. *Pharmacology & therapeutics*, 247, 108458. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108458>
- 83 Liu, S., Wang, J., Niu, W., Liu, E., Wang, J., Peng, C., Lin, P., Wang, B., Khan, A. Q., Gao, H., Liang, B., Shahbaz, M., & Niu, J. (2013). The $\beta 6$ -integrin-ERK/MAP

- kinase pathway contributes to chemo resistance in colon cancer. *Cancer Letters*, 328(2), 325–334. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.10.004>
- 84 Batlle, E., & Clevers, H. (2017). Cancer stem cells revisited. *Nature medicine*, 23(10), 1124–1134. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>
- 85 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>
- 86 Moreno-Londoño, A. P., & Robles-Flores, M. (2023). Functional Roles of CD133: More than Stemness Associated Factor Regulated by the Microenvironment. *Stem Cell Reviews and Reports*. <https://doi.org/10.1007/s12015-023-10647-6>
- 87 Frascogna, C., Mottareale, R., La Verde, G., Arrichiello, C., Muto, P., Netti, P. A., Pugliese, M., & Panzetta, V. (2024). Role of the mechanical microenvironment on CD-44 expression of breast adenocarcinoma in response to radiotherapy. *Scientific reports*, 14(1), 391. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50473-x>
- 88 Vermeulen, L., Todaro, M., de Sousa Mello, F., Sprick, M. R., Kemper, K., Perez Alea, M., Richel, D. J., Stassi, G., & 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 of the United States of America*, 105(36), 13427–13432. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805706105>
- 89 Nallasamy, P., Nimmakayala, R. K., Karmakar, S., Leon, F., Seshacharyulu, P., Lakshmanan, I., Rachagani, S., Mallya, K., Zhang, C., Ly, Q. P., Myers, M. S., Josh, L., Grabow, C. E., Gautam, S. K., Kumar, S., Lele, S. M., Jain, M., Batra, S. K., & Ponnusamy, M. P. (2021). Pancreatic Tumor Microenvironment Factor Promotes Cancer Stemness via SPP1-CD44 Axis. *Gastroenterology*, 161(6), 1998–2013.e7. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.08.023>
- 90 Gritti, A., Parati, E. A., Cova, L., Frolichsthal, P., Galli, R., Wanke, E., Faravelli, L., Morassutti, D. J., Roisen, F., Nickel, D. D., & Vescovi, A. L. (1996). Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(3), 1091–1100. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-01091.1996>
- 91 Jung, P., Sato, T., Merlos-Suárez, A., Barriga, F. M., Iglesias, M., Rossell, D., Auer, H., Gallardo, M., Blasco, M. A., Sancho, E., Clevers, H., & Batlle, E. (2011). Isolation and in vitro expansion of human colonic stem cells. *Nature medicine*, 17(10), 1225–1227. <https://doi.org/10.1038/nm.2470>
- 92 Rybak, A. P., He, L., Kapoor, A., Cutz, J. C., & Tang, D. (2011). Characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from DU145 prostate cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(5), 683–694. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.018>
- 93 Pastrana, E., Silva-Vargas, V., & Doetsch, F. (2011). Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*, 8(5), 486–498. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.04.007>
- 94 Kleeman, S. O., & Leedham, S. J. (2020). Not All Wnt Activation Is Equal: Ligand-Dependent versus Ligand-Independent Wnt Activation in Colorectal Cancer. *Cancers*, 12(11), 3355. <https://doi.org/10.3390/cancers12113355>

- 95 Werner, J., Boonekamp, K. E., Zhan, T., & Boutros, M. (2023). The Roles of Secreted Wnt Ligands in Cancer. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5349. <https://doi.org/10.3390/ijms24065349>
- 96 Nallanthighal, S., Heiserman, J. P., & Cheon, D. J. (2019). The Role of the Extracellular Matrix in Cancer Stemness. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 86. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00086>
- 97 Smart, C. E., Morrison, B. J., Saunus, J. M., Vargas, A. C., Keith, P., Reid, L., Wockner, L., Askarian-Amiri, M., Sarkar, D., Simpson, P. T., Clarke, C., Schmidt, C. W., Reynolds, B. A., Lakhani, S. R., & 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>
- 98 Ricci-Vitiani, L., Lombardi, D. G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., & de Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445(7123), 111–115. <https://doi.org/10.1038/nature05384>
- 99 Ham, S. L., Joshi, R., Thakuri, P. S., & Tavana, H. (2016). Liquid-based three-dimensional tumor models for cancer research and drug discovery. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 241(9), 939–954. <https://doi.org/10.1177/1535370216643772>
- 100 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>
- 101 Endo, H., & Inoue, M. (2019). Dormancy in cancer. *Cancer Science*, 110(2), 474–480. <https://doi.org/10.1111/cas.13917>
- 102 Dias, I. B., Bouma, H. R., & Henning, R. H. (2021). Unraveling the Big Sleep: Molecular Aspects of Stem Cell Dormancy and Hibernation. *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.624950>
- 103 Garcia-Mayea, Y., Mir, C., Masson, F., Paciucci, R., & LLeonart, M. E. (2020). Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance. *Seminars in Cancer Biology*, 60, 166–180. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.022>
- 104 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>
- 105 Yuan, Z., Liang, X., Zhan, Y., Wang, Z., Xu, J., Qiu, Y., Wang, J., Cao, Y., Le, V.-M., Ly, H.-T., Xu, J., Li, W., Yin, P., & Xu, K. (2020). Targeting CD133 reverses drug-resistance via the AKT/NF-κB/MDR1 pathway in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 122(9), 1342–1353. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0783-0>
- 106 Zhan, Y., Qiu, Y., Wang, H., Wang, Z., Xu, J., Fan, G., Xu, J., Li, W., Cao, Y., Le, V.-M., Ly, H.-T., Yuan, Z., Xu, K., & Yin, P. (2020). Bufalin reverses multidrug resistance by regulating stemness through the CD133/nuclear factor-κB/MDR1 pathway in colorectal cancer. *Cancer Science*, 111(5), 1619–1630. <https://doi.org/10.1111/cas.14345>

- 107 Jamal, S. M. el, Alamodi, A., Wahl, R. U., Grada, Z., Shareef, M. A., Hassan, S.-Y., Murad, F., Hassan, S.-L., Santourlidis, S., Gomez, C. R., Haikel, Y., Megahed, M., & Hassan, M. (2020). Melanoma stem cell maintenance and chemo-resistance are mediated by CD133 signal to PI3K-dependent pathways. *Oncogene*, 39(32), 5468–5478. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1373-6>
- 108 Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., & Freeman, J. W. (2018). The biology and role of CD44 in cancer progression: therapeutic implications. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5>
- 109 Najafi, S., Rahimi, Z., Mansoori, B., Mohammadi, A., Mohammadnejad, F., Amini, M., Mokhtazadeh, A., Asadzadeh, Z., Chi-Shing Cho, W., & Baradaran, B. (2023). CD44 Suppression Improved the Chemosensitivity of HT-29 Colorectal Cancer Cells to 5-Fluorouracil and Inhibited Cell Migration. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 13(3), 551–562. <https://doi.org/10.34172/apb.2023.053>
- 110 Ishimoto, T., Nagano, O., Yae, T., Tamada, M., Motohara, T., Oshima, H., Oshima, M., Ikeda, T., Asaba, R., Yagi, H., Masuko, T., Shimizu, T., Ishikawa, T., Kai, K., Takahashi, E., Imamura, Y., Baba, Y., Ohmura, M., Suematsu, M., ... Saya, H. (2011). CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell*, 19(3), 387–400. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.038>
- 111 Miyoshi, S., Tsugawa, H., Matsuzaki, J., Hirata, K., Mori, H., Saya, H., Kanai, T., & Suzuki, H. (2018). Inhibiting xCT Improves 5-Fluorouracil Resistance of Gastric Cancer Induced by CD44 Variant 9 Expression. *Anticancer Research*, 38(11), 6163–6170. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12969>
- 112 Lv, L., Liu, H.-G., Dong, S.-Y., Yang, F., Wang, Q.-X., Guo, G.-L., Pan, Y.-F., & Zhang, X.-H. (2016). Upregulation of CD44v6 contributes to acquired chemoresistance via the modulation of autophagy in colon cancer SW480 cells. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(7), 8811–8824. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4755-6>
- 113 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>
- 114 Ghatak, S., Hascall, V. C., Markwald, R. R., & Misra, S. (2021). FOLFOX Therapy Induces Feedback Upregulation of CD44v6 through YB-1 to Maintain Stemness in Colon Initiating Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2). <https://doi.org/10.3390/ijms22020753>
- 115 Mielgo, A., van Driel, M., Bloem, A., Landmann, L., & Günthert, U. (2006). A novel antiapoptotic mechanism based on interference of Fas signaling by CD44 variant isoforms. *Cell Death and Differentiation*, 13(3), 465–477. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401763>
- 116 Liu, Y.-S., Hsu, H.-C., Tseng, K.-C., Chen, H.-C., & Chen, S.-J. (2013). Lgr5 promotes cancer stemness and confers chemoresistance through ABCB1 in colorectal cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 67(8), 791–799. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2013.08.001>

- 117 Kobayashi, S., Yamada-Okabe, H., Suzuki, M., Natori, O., Kato, A., Matsubara, K., Jau Chen, Y., Yamazaki, M., Funahashi, S., Yoshida, K., Hashimoto, E., Watanabe, Y., Mutoh, H., Ashihara, M., Kato, C., Watanabe, T., Yoshikubo, T., Tamaoki, N., Ochiya, T., ... Yamazaki, T. (2012). LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 30(12), 2631–2644. <https://doi.org/10.1002/stem.1257>
- 118 Posey, T. A., Jacob, J., Parkhurst, A., Subramanian, S., Francisco, L. E., Liang, Z., & Carmon, K. S. (2023). Loss of LGR5 through Therapy-induced Downregulation or Gene Ablation Is Associated with Resistance and Enhanced MET-STAT3 Signaling in Colorectal Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 22(5), 667–678. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-22-0415>
- 119 Gargalionis, A. N., Papavassiliou, K. A., & Papavassiliou, A. G. (2021). Targeting STAT3 Signaling Pathway in Colorectal Cancer. *Biomedicines*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081016>
- 120 Álvarez-Varela, A., Novellademunt, L., Barriga, F. M., Hernando-Momblona, X., Cañellas-Socias, A., Cano-Crespo, S., Sevillano, M., Cortina, C., Stork, D., Morral, C., Turon, G., Slebe, F., Jiménez-Gracia, L., Caratù, G., Jung, P., Stassi, G., Heyn, H., Tauriello, D. V. F., Mateo, L., ... Batlle, E. (2022). Mex3a marks drug-tolerant persister colorectal cancer cells that mediate relapse after chemotherapy. *Nature Cancer*, 3(9), 1052–1070. <https://doi.org/10.1038/s43018-022-00402-0>
- 121 Lu, L.-L., Chen, X.-H., Zhang, G., Liu, Z.-C., Wu, N., Wang, H., Qi, Y.-F., Wang, H.-S., Cai, S. H., & Du, J. (2016). CCL21 Facilitates Chemoresistance and Cancer Stem Cell-Like Properties of Colorectal Cancer Cells through AKT/GSK-3 β /Snail Signals. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 5874127. <https://doi.org/10.1155/2016/5874127>
- 122 Hwang, W.-L., Yang, M.-H., Tsai, M.-L., Lan, H.-Y., Su, S.-H., Chang, S.-C., Teng, H.-W., Yang, S.-H., Lan, Y.-T., Chiou, S.-H., & Wang, H.-W. (2011). SNAIL regulates interleukin-8 expression, stem cell-like activity, and tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Gastroenterology*, 141(1), 279–291, 291.e1-5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.04.008>
- 123 Zhang, L., Lu, X., Xu, Y., La, X., Tian, J., Li, A., Li, H., Wu, C., Xi, Y., Song, G., Zhou, Z., Bai, W., An, L., & Li, Z. (2023). Tumor-associated macrophages confer colorectal cancer 5-fluorouracil resistance by promoting MRP1 membrane translocation via an intercellular CXCL17/CXCL22-CCR4-ATF6-GRP78 axis. *Cell Death & Disease*, 14(9), 582. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06108-0>
- 124 Larionova, I., Cherdyntseva, N., Liu, T., Patysheva, M., Rakina, M., & Kzhyshkowska, J. (2019). Interaction of tumor-associated macrophages and cancer chemotherapy. *Oncoimmunology*, 8(7), 1596004. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1596004>
- 125 Jinushi, M., Chiba, S., Yoshiyama, H., Masutomi, K., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Yagita, H., Takaoka, A., & Tahara, H. (2011). Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America, 108(30), 12425–12430. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106645108>
- 126 Mitchem, J. B., Brennan, D. J., Knolhoff, B. L., Belt, B. A., Zhu, Y., Sanford, D. E., Belaygorod, L., Carpenter, D., Collins, L., Piwnica-Worms, D., Hewitt, S., Udipi, G. M., Gallagher, W. M., Wegner, C., West, B. L., Wang-Gillam, A., Goedegebuure, P., Linehan, D. C., & DeNardo, D. G. (2013). Targeting tumor-infiltrating macrophages decreases tumor-initiating cells, relieves immunosuppression, and improves chemotherapeutic responses. *Cancer Research*, 73(3), 1128–1141. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2731>
- 127 Mantovani, A., & Allavena, P. (2015). The interaction of anticancer therapies with tumor-associated macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(4), 435–445. <https://doi.org/10.1084/jem.20150295>
- 128 Gaggianesi, M., Di Franco, S., Pantina, V. D., Porcelli, G., D'Accardo, C., Verona, F., Veschi, V., Colarossi, L., Faldetta, N., Pistone, G., Bongiorno, M. R., Todaro, M., & Stassi, G. (2021). Messing Up the Cancer Stem Cell Chemoresistance Mechanisms Supported by Tumor Microenvironment. *Frontiers in oncology*, 11, 702642. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.702642>
- 129 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>
- 130 Tan, S. H., & Barker, N. (2018). Wnt Signaling in Adult Epithelial Stem Cells and Cancer. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 153, 21–79. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.11.017>
- 131 Xie, Z., Zhou, G., Zhang, M., Han, J., Wang, Y., Li, X., Wu, Q., Li, M., & Zhang, S. (2023). Recent developments on BMPs and their antagonists in inflammatory bowel diseases. *Cell Death Discovery*, 9(1), 210. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01520-z>
- 132 Zhang, Y., & Que, J. (2020). BMP Signaling in Development, Stem Cells, and Diseases of the Gastrointestinal Tract. *Annual Review of Physiology*, 82, 251–273. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034500>
- 133 Wang, S., & Chen, Y.-G. (2018). BMP signaling in homeostasis, transformation and inflammatory response of intestinal epithelium. *Science China. Life Sciences*, 61(7), 800–807. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9310-7>
- 134 Beumer, J., & Clevers, H. (2021). Cell fate specification and differentiation in the adult mammalian intestine. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 22(1), 39–53. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0278-0>
- 135 Grumolato, L., Liu, G., Mong, P., Mudbhary, R., Biswas, R., Arroyave, R., Vijayakumar, S., Economides, A. N., & 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>
- 136 Flores-Hernández, E., Velázquez, D. M., Castañeda-Patlán, M. C., Fuentes-García, G., Fonseca-Camarillo, G., Yamamoto-Furusho, J. K., Romero-Avila, M. T., García-Sáinz, J. A., & 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>

- 137 Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* 2002 May 1;16(9):1066-76. doi: 10.1101/gad.230302. PMID: 12000790; PMCID: PMC186245.
- 138 Metcalfe, C., Mendoza-Topaz, C., Mieszczanek, J., & Bienz, M. (2010). Stability elements in the LRP6 cytoplasmic tail confer efficient signalling upon DIX-dependent polymerization. *Journal of Cell Science*, 123(9), 1588–1599. <https://doi.org/10.1242/jcs.067546>
- 139 Kang, K., Shi, Q., Wang, X., & Chen, Y.-G. (2022). Dishevelled phase separation promotes Wnt signalosome assembly and destruction complex disassembly. *Journal of Cell Biology*, 221(12). <https://doi.org/10.1083/jcb.202205069>
- 140 Daniels, D. L., & Weis, W. I. (2005). β -catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(4), 364–371. <https://doi.org/10.1038/nsmb912>
- 141 Anthony, C. C., Robbins, D. J., Ahmed, Y., & Lee, E. (2020). Nuclear Regulation of Wnt/ β -Catenin Signaling: It's a Complex Situation. *Genes*, 11(8), 886. <https://doi.org/10.3390/genes11080886>
- 142 Hao, H.-X., Xie, Y., Zhang, Y., Charlat, O., Oster, E., Avello, M., Lei, H., Mickanin, C., Liu, D., Ruffner, H., Mao, X., Ma, Q., Zamponi, R., Bouwmeester, T., Finan, P. M., Kirschner, M. W., Porter, J. A., Serluca, F. C., & Cong, F. (2012). ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature*, 485(7397), 195–200. <https://doi.org/10.1038/nature11019>
- 143 Koo, B.-K., Spit, M., Jordens, I., Low, T. Y., Stange, D. E., van de Wetering, M., van Es, J. H., Mohammed, S., Heck, A. J. R., Maurice, M. M., & Clevers, H. (2012). Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors. *Nature*, 488(7413), 665–669. <https://doi.org/10.1038/nature11308>
- 144 de Lau, W., Peng, W. C., Gros, P., & Clevers, H. (2014). The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes & Development*, 28(4), 305–316. <https://doi.org/10.1101/gad.235473.113>
- 145 Morgan, R. G., Mortensson, E., & Williams, A. C. (2018). Targeting LGR5 in Colorectal Cancer: therapeutic gold or too plastic? *British Journal of Cancer*, 118(11), 1410–1418. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0118-6>
- 146 Qin, K., Yu, M., Fan, J., Wang, H., Zhao, P., Zhao, G., Zeng, W., Chen, C., Wang, Y., Wang, A., Schwartz, Z., Hong, J., Song, L., Wagstaff, W., Haydon, R. C., Luu, H. H., Ho, S. H., Strelzow, J., Reid, R. R., ... Shi, L. L. (2024). Canonical and noncanonical Wnt signaling: Multilayered mediators, signaling mechanisms and major signaling crosstalk. *Genes & Diseases*, 11(1), 103–134. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2023.01.030>
- 147 Mognol, G. P., Carneiro, F. R. G., Robbs, B. K., Faget, D. v, & Viola, J. P. B. (2016). Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell Death & Disease*, 7(4), e2199. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.97>
- 148 Lin, Y., Song, Y., Zhang, Y., Shi, M., Hou, A., & Han, S. (2023). NFAT signaling dysregulation in cancer: Emerging roles in cancer stem cells. *Biomedicine &*

- Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie, 165, 115167. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115167>
- 149 Gao, B., Song, H., Bishop, K., Elliot, G., Garrett, L., English, M. A., Andre, P., Robinson, J., Sood, R., Minami, Y., Economides, A. N., & 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>
- 150 Yang, W., Garrett, L., Feng, D., Elliott, G., Liu, X., Wang, N., Wong, Y. M., Choi, N. T., Yang, Y., & 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>
- 151 Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 36(11), 1461–1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>
- 152 Böttcher, A., Büttner, M., Tritschler, S., Sterr, M., Aliluev, A., Oppenländer, L., Burtscher, I., Sass, S., Irmeler, M., Beckers, J., Ziegenhain, C., Enard, W., Schamberger, A. C., Verhamme, F. M., Eickelberg, O., Theis, F. J., & 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>
- 153 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. *The Journal of biological chemistry*, 279(25), 26707–26715. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402877200>
- 154 Bugter, J. M., Fenderico, N., & Maurice, M. M. (2021). Mutations and mechanisms of WNT pathway tumour suppressors in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 21(1), 5–21. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00307-z>
- 155 Voloshanenko, O., Erdmann, G., Dubash, T. D., Augustin, I., Metzsig, M., Moffa, G., Hundsrucker, C., Kerr, G., Sandmann, T., Anchang, B., Demir, K., Boehm, C., Leible, S., Ball, C. R., Glimm, H., Spang, R., & Boutros, M. (2013). Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. *Nature Communications*, 4, 2610. <https://doi.org/10.1038/ncomms3610>
- 156 Moon, B. S., Jeong, W. J., Park, J., Kim, T. I., Min, doS., & Choi, K. Y. (2014). Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/ β -catenin signaling. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(2), djt373. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt373>
- 157 Alvarado-Ortiz, E., Ortiz-Sánchez, E., Sarabia-Sánchez, M. A., de la Cruz-López, K. G., García-Carrancá, A., & Robles-Flores, M. (2023). Mutant p53 gain-of-function stimulates canonical Wnt signaling via PI3K/AKT pathway in colon cancer. *Journal of Cell Communication and Signaling*. <https://doi.org/10.1007/s12079-023-00793-4>
- 158 Cho, Y.-H., Ro, E. J., Yoon, J.-S., Mizutani, T., Kang, D.-W., Park, J.-C., il Kim, T., Clevers, H., & Choi, K.-Y. (2020). 5-FU promotes stemness of colorectal cancer via p53-mediated WNT/ β -catenin pathway activation. *Nature Communications*, 11(1), 5321. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19173-2>
- 159 Hu, Y. B., Yan, C., Mu, L., Mi, Y. L., Zhao, H., Hu, H., Li, X. L., Tao, D. D., Wu, Y. Q., Gong, J. P., & 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>
- 160 Giannakis, M., Hodis, E., Jasmine Mu, X., Yamauchi, M., Rosenbluh, J., Cibulskis, K., Saksena, G., Lawrence, M. S., Qian, Z. R., Nishihara, R., Van Allen, E. M., Hahn, W. C., Gabriel, S. B., Lander, E. S., Getz, G., Ogino, S., Fuchs, C. S., & Garraway, L. A. (2014). RNF43 is frequently mutated in colorectal and endometrial cancers. *Nature genetics*, 46(12), 1264–1266. <https://doi.org/10.1038/ng.3127>
- 161 Cho, A. R., Sul, H. J., Kim, Y. J., Kim, B., & Zang, D. Y. (2022). RNF43 R117fs mutant positively regulates Wnt/ β -catenin signaling by failing to internalize FZD expressed on the cell surface. *Scientific reports*, 12(1), 7013. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10868-8>
- 162 Yu, J., Yusoff, P. A. M., Woutersen, D. T. J., Goh, P., Harmston, N., Smits, R., Epstein, D. M., Virshup, D. M., & Madan, B. (2020). The Functional Landscape of Patient-Derived RNF43 Mutations Predicts Sensitivity to Wnt Inhibition. *Cancer research*, 80(24), 5619–5632. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0957>
- 163 Kleeman, S. O., Koelzer, V. H., Jones, H. J., Vazquez, E. G., Davis, H., East, J. E., Arnold, R., Koppens, M. A., Blake, A., Domingo, E., Cunningham, C., Beggs, A. D., Pestinger, V., Loughrey, M. B., Wang, L. M., Lannagan, T. R., Woods, S. L., Worthley, D., Consortium, S. C., Tomlinson, I., ... Leedham, S. J. (2020). Exploiting differential Wnt target gene expression to generate a molecular biomarker for colorectal cancer stratification. *Gut*, 69(6), 1092–1103. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319126>
- 164 Zhao, H., Ming, T., Tang, S., Ren, S., Yang, H., Liu, M., Tao, Q., & Xu, H. (2022). Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target. *Molecular cancer*, 21(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01616-7>
- 165 Morin, P. J., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1996). Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 7950–7954. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7950>
- 166 Dow, L. E., O'Rourke, K. P., Simon, J., Tschaharganeh, D. F., van Es, J. H., Clevers, H., & Lowe, S. W. (2015). Apc Restoration Promotes Cellular Differentiation and Reestablishes Crypt Homeostasis in Colorectal Cancer. *Cell*, 161(7), 1539–1552. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.033>
- 167 Galluzzi, L., Spranger, S., Fuchs, E., & López-Soto, A. (2019). WNT Signaling in Cancer Immunosurveillance. *Trends in Cell Biology*, 29(1), 44–65. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.08.005>
- 168 Yang, L., Shi, P., Zhao, G., Xu, J., Peng, W., Zhang, J., Zhang, G., Wang, X., Dong, Z., Chen, F., & 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>
- 169 VanderVorst, K., Hatakeyama, J., Berg, A., Lee, H., & Carraway, K. L. (2018). Cellular and molecular mechanisms underlying planar cell polarity pathway contributions to cancer malignancy. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 81, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.09.026>

- 170 Holcombe, R. F., Marsh, J. L., Waterman, M. L., Lin, F., Milovanovic, T., & Truong, T. (2002). Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma. *Molecular Pathology: MP*, 55(4), 220–226. <https://doi.org/10.1136/mp.55.4.220>
- 171 Gujral, T. S., Chan, M., Peshkin, L., Sorger, P. K., Kirschner, M. W., & MacBeath, G. (2014). A noncanonical Frizzled2 pathway regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cell*, 159(4), 844–856. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.032>
- 172 Nishioka, M., Ueno, K., Hazama, S., Okada, T., Sakai, K., Suehiro, Y., Okayama, N., Hirata, H., Oka, M., Imai, K., Dahiya, R., & Hinoda, Y. (2013). Possible involvement of Wnt11 in colorectal cancer progression. *Molecular Carcinogenesis*, 52(3), 207–217. <https://doi.org/10.1002/mc.21845>
- 173 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>
- 174 Colozza, G., Lee, H., Merenda, A., Wu, S.-H. S., Català-Bordes, A., Radaszkiewicz, T. W., Jordens, I., Lee, J.-H., Bamford, A.-D., Farnhammer, F., Low, T. Y., Maurice, M. M., Bryja, V., Kim, J., & Koo, B.-K. (2023). Intestinal Paneth cell differentiation relies on asymmetric regulation of Wnt signaling by Daam1/2. *Science Advances*, 9(47), eadh9673. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adh9673>
- 175 Zhong, Z., & Virshup, D. M. (2020). Wnt Signaling and Drug Resistance in Cancer. *Molecular Pharmacology*, 97(2), 72–89. <https://doi.org/10.1124/mol.119.117978>
- 176 Martin-Orozco, E., Sanchez-Fernandez, A., Ortiz-Parra, I., & Ayala-San Nicolas, M. (2019). WNT Signaling in Tumors: The Way to Evade Drugs and Immunity. *Frontiers in Immunology*, 10, 2854. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02854>
- 177 Yuan, S., Tao, F., Zhang, X., Zhang, Y., Sun, X., & Wu, D. (2020). Role of Wnt/ β -Catenin Signaling in the Chemoresistance Modulation of Colorectal Cancer. *BioMed Research International*, 2020, 9390878. <https://doi.org/10.1155/2020/9390878>
- 178 Uppada, S. B., Gowrikumar, S., Ahmad, R., Kumar, B., Szeglin, B., Chen, X., Smith, J. J., Batra, S. K., Singh, A. B., & Dhawan, P. (2018). MASTL induces Colon Cancer progression and Chemoresistance by promoting Wnt/ β -catenin signaling. *Molecular Cancer*, 17(1), 111. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0848-3>
- 179 Emons, G., Spitzner, M., Reineke, S., Möller, J., Auslander, N., Kramer, F., Hu, Y., Beissbarth, T., Wolff, H. A., Rave-Fränk, M., Heßmann, E., Gaedcke, J., Ghadimi, B. M., Johnsen, S. A., Ried, T., & Grade, M. (2017). Chemoradiotherapy Resistance in Colorectal Cancer Cells is Mediated by Wnt/ β -catenin Signaling. *Molecular Cancer Research: MCR*, 15(11), 1481–1490. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0205>
- 180 Wickström, M., Dyberg, C., Milosevic, J., Einvik, C., Calero, R., Sveinbjörnsson, B., Sandén, E., Darabi, A., Siesjö, P., Kool, M., Kogner, P., Baryawno, N., &

- Johnsen, J. I. (2015). Wnt/ β -catenin pathway regulates MGMT gene expression in cancer and inhibition of Wnt signalling prevents chemoresistance. *Nature Communications*, 6, 8904. <https://doi.org/10.1038/ncomms9904>
- 181 Zhang, K., Li, M., Huang, H., Li, L., Yang, J., Feng, L., Gou, J., Jiang, M., Peng, L., Chen, L., Li, T., Yang, P., Yang, Y., Wang, Y., Peng, Q., Dai, X., & Zhang, T. (2017). Dishevelled1-3 contribute to multidrug resistance in colorectal cancer via activating Wnt/ β -catenin signaling. *Oncotarget*, 8(70), 115803–115816. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23253>
- 182 Xu, X., Wang, Y., Deng, H., Liu, C., Wu, J., & Lai, M. (2018). HMGA2 enhances 5-fluorouracil chemoresistance in colorectal cancer via the Dvl2/Wnt pathway. *Oncotarget*, 9(11), 9963–9974. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24133>
- 183 Yang, Y., Jiang, H., Li, W., Chen, L., Zhu, W., Xian, Y., Han, Z., Yin, L., Liu, Y., Wang, Y., Pan, K., & Zhang, K. (2020). FOXM1/DVL2/Snail axis drives metastasis and chemoresistance of colorectal cancer. *Aging*, 12(23), 24424–24440. <https://doi.org/10.18632/aging.202300>
- 184 Chikazawa, N., Tanaka, H., Tasaka, T., Nakamura, M., Tanaka, M., Onishi, H., & Katano, M. (2010). Inhibition of Wnt signaling pathway decreases chemotherapy-resistant side-population colon cancer cells. *Anticancer Research*, 30(6), 2041–2048.
- 185 He, L., Zhu, H., Zhou, S., Wu, T., Wu, H., Yang, H., Mao, H., SekharKathera, C., Janardhan, A., Edick, A. M., Zhang, A., Hu, Z., Pan, F., & Guo, Z. (2018). Wnt pathway is involved in 5-FU drug resistance of colorectal cancer cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(8), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0128-8>
- 186 Chen, H.-Y., Lang, Y.-D., Lin, H.-N., Liu, Y.-R., Liao, C.-C., Nana, A. W., Yen, Y., & Chen, R.-H. (2019). miR-103/107 prolong Wnt/ β -catenin signaling and colorectal cancer stemness by targeting Axin2. *Scientific Reports*, 9(1), 9687. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41053-z>
- 187 Li, Z., Yang, Z., Liu, W., Zhu, W., Yin, L., Han, Z., Xian, Y., Wen, J., Tang, H., Lin, X., Yang, Y., Wang, J., & Zhang, K. (2023). Disheveled3 enhanced EMT and cancer stem-like cells properties via Wnt/ β -catenin/c-Myc/SOX2 pathway in colorectal cancer. *Journal of Translational Medicine*, 21(1), 302. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04120-8>
- 188 Zhang, W., Kong, L., Zhu, H., Sun, D., Han, Q., Yan, B., Cui, Z., Zhang, W., Zhang, S., Kang, X., Dai, G., Qian, N., & Yan, W. (2022). Retinoic Acid-Induced 2 (RAI2) Is a Novel Antagonist of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway and Potential Biomarker of Chemosensitivity in Colorectal Cancer. *Frontiers in Oncology*, 12, 805290. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.805290>
- 189 Varnat, F., Siegl-Cachedenier, I., Malerba, M., Gervaz, P., & Ruiz i Altaba, A. (2010). Loss of WNT-TCF addiction and enhancement of HH-GLI1 signalling define the metastatic transition of human colon carcinomas. *EMBO Molecular Medicine*, 2(11), 440–457. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000098>
- 190 Chen, G. T., Tifrea, D. F., Murad, R., Habowski, A. N., Lyou, Y., Duong, M. R., Hosohama, L., Mortazavi, A., Edwards, R. A., & Waterman, M. L. (2022). Disruption of β -Catenin-Dependent Wnt Signaling in Colon Cancer Cells Remodels the Microenvironment to Promote Tumor Invasion. *Molecular Cancer*

- Research: MCR, 20(3), 468–484. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-21-0349>
- 191 Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., Bot, B. M., Morris, J. S., Simon, I. M., Gerster, S., Fessler, E., de Sousa E Melo, F., Missiaglia, E., Ramay, H., Barras, D., ... Tejpar, S. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature Medicine*, 21(11), 1350–1356. <https://doi.org/10.1038/nm.3967>
- 192 Isella, C., Brundu, F., Bellomo, S. E., Galimi, F., Zanella, E., Porporato, R., Petti, C., Fiori, A., Orzan, F., Senetta, R., Boccaccio, C., Ficarra, E., Marchionni, L., Trusolino, L., Medico, E., & Bertotti, A. (2017). Selective analysis of cancer-cell intrinsic transcriptional traits defines novel clinically relevant subtypes of colorectal cancer. *Nature Communications*, 8, 15107. <https://doi.org/10.1038/ncomms15107>
- 193 Linnekamp, J. F., Hooff, S. R. van, Prasetyanti, P. R., Kandimalla, R., Buikhuisen, J. Y., Fessler, E., Ramesh, P., Lee, K. A. S. T., Bochove, G. G. W., de Jong, J. H., Cameron, K., Leersum, R. van, Rodermond, H. M., Franitza, M., Nürnberg, P., Mangiapane, L. R., Wang, X., Clevers, H., Vermeulen, L., ... Medema, J. P. (2018). Consensus molecular subtypes of colorectal cancer are recapitulated in in vitro and in vivo models. *Cell Death and Differentiation*, 25(3), 616–633. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0011-5>
- 194 Dong, X., Liao, W., Zhang, L., Tu, X., Hu, J., Chen, T., Dai, X., Xiong, Y., Liang, W., Ding, C., Liu, R., Dai, J., Wang, O., Lu, L., & 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>
- 195 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>
- 196 Wei, W., Sun, H.-H., Li, N., Li, H.-Y., Li, X., Li, Q., & Shen, X.-H. (2014). WNT5A modulates cell cycle progression and contributes to the chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*, 13(5), 529–538. [https://doi.org/10.1016/S1499-3872\(14\)60277-0](https://doi.org/10.1016/S1499-3872(14)60277-0)
- 197 Griesmann, H., Ripka, S., Pralle, M., Ellenrieder, V., Baumgart, S., Buchholz, M., Pilarsky, C., Aust, D., Gress, T. M., & Michl, P. (2013). WNT5A-NFAT signaling mediates resistance to apoptosis in pancreatic cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 15(1), 11–22. <https://doi.org/10.1593/neo.121312>
- 198 Hung, T.-H., Hsu, S.-C., Cheng, C.-Y., Choo, K.-B., Tseng, C.-P., Chen, T.-C., Lan, Y.-W., Huang, T.-T., Lai, H.-C., Chen, C.-M., & Chong, K.-Y. (2014). Wnt5A regulates ABCB1 expression in multidrug-resistant cancer cells through activation of the non-canonical PKA/β-catenin pathway. *Oncotarget*, 5(23), 12273–12290. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2631>

- 199 Menck, K., Heinrichs, S., Baden, C., & Bleckmann, A. (2021). The WNT/ROR Pathway in Cancer: From Signaling to Therapeutic Intervention. *Cells*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/cells10010142>
- 200 Fuertes, G., del Valle-Pérez, B., Pastor, J., Andrades, E., Peña, R., García de Herreros, A., & Duñach, M. (2023). Noncanonical Wnt signaling promotes colon tumor growth, chemoresistance and tumor fibroblast activation. *EMBO Reports*, 24(4), e54895. <https://doi.org/10.15252/embr.202254895>
- 201 Peuker, K., Muff, S., Wang, J., Künzel, S., Bosse, E., Zeissig, Y., Luzzi, G., Basic, M., Strigli, A., Ulbricht, A., Kaser, A., Arlt, A., Chavakis, T., van den Brink, G. R., Schafmayer, C., Egberts, J. H., Becker, T., Bianchi, M. E., Bleich, A., Röcken, C., ... Zeissig, S. (2016). Epithelial calcineurin controls microbiota-dependent intestinal tumor development. *Nature medicine*, 22(5), 506–515. <https://doi.org/10.1038/nm.4072>
- 202 Bond, C. E., McKeone, D. M., Kalimutho, M., Bettington, M. L., Pearson, S.-A., Dumenil, T. D., Wockner, L. F., Burge, M., Leggett, B. A., & Whitehall, V. L. J. (2016). RNF43 and ZNRF3 are commonly altered in serrated pathway colorectal tumorigenesis. *Oncotarget*, 7(43), 70589–70600. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12130>
- 203 Sukach, A. N., & Ivanov, E. N. (2007). Formation of spherical colonies as a property of stem cells. *Tsitologija*, 49(11), 916–922. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18217358/>
- 204 Qureshi-Baig, K., Ullmann, P., Rodriguez, F., Frاسquilho, S., Nazarov, P. v, Haan, S., & Letellier, E. (2016). What Do We Learn from Spheroid Culture Systems? Insights from Tumorspheres Derived from Primary Colon Cancer Tissue. *PloS One*, 11(1), e0146052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146052>
- 205 Yan, Y., Zuo, X., & Wei, D. (2015). Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(9), 1033–1043. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0048>
- 206 Taniguchi, H., Moriya, C., Igarashi, H., Saitoh, A., Yamamoto, H., Adachi, Y., & Imai, K. (2016). Cancer stem cells in human gastrointestinal cancer. *Cancer Science*, 107(11), 1556–1562. <https://doi.org/10.1111/cas.13069>
- 207 Shimokawa, M., Ohta, Y., Nishikori, S., Matano, M., Takano, A., Fujii, M., Date, S., Sugimoto, S., Kanai, T., & Sato, T. (2017). Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. *Nature*, 545(7653), 187–192. <https://doi.org/10.1038/nature22081>
- 208 Leng, Z., Xia, Q., Chen, J., Li, Y., Xu, J., Zhao, E., Zheng, H., Ai, W., & Dong, J. (2018). Lgr5+CD44+EpCAM+ Strictly Defines Cancer Stem Cells in Human Colorectal Cancer. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 46(2), 860–872. <https://doi.org/10.1159/000488743>
- 209 Vasquez, E. G., Nasreddin, N., Valbuena, G. N., Mulholland, E. J., Belnoue-Davis, H. L., Eggington, H. R., Schenck, R. O., Wouters, V. M., Wirapati, P., Gilroy, K., Lannagan, T. R. M., Flanagan, D. J., Najumudeen, A. K., Omwenga, S., McCorry, A. M. B., Easton, A., Koelzer, V. H., East, J. E., Morton, D., ...

- Leedham, S. J. (2022). Dynamic and adaptive cancer stem cell population admixture in colorectal neoplasia. *Cell Stem Cell*, 29(8), 1213-1228.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.07.008>
- 210 Morgan, R. G., Molnár, E., Jones, R. F., Collard, T. J., Lane, J. D., Greenhough, A., Paraskeva, C., & Williams, A. C. (2015). Nutrient stress alters the glycosylation status of LGR5 resulting in reduced protein stability and membrane localisation in colorectal tumour cells: implications for targeting cancer stem cells. *British Journal of Cancer*, 112(4), 714–719. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.4>
- 211 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>
- 212 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>
- 213 Spencer, S. L., Cappell, S. D., Tsai, F.-C., Overton, K. W., Wang, C. L., & Meyer, T. (2013). The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit. *Cell*, 155(2), 369–383. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.062>
- 214 Hanaki, S., Habara, M., Sato, Y., Tomiyasu, H., Miki, Y., Shibutani, S., & Shimada, M. (2024). Dephosphorylation of NFAT by Calcineurin inhibits Skp2-mediated degradation. *Journal of biochemistry*, 175(3), 235–244. <https://doi.org/10.1093/jb/mvad103>
- 215 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 (New York, N.Y.)*, 285(5436), 2129–2133. <https://doi.org/10.1126/science.285.5436.2129>
- 216 Hrckulak, D., Janeckova, L., Lanikova, L., Kriz, V., Horazna, M., Babosova, O., Vojtechova, M., Galuskova, K., Sloncova, E., & Korinek, V. (2018). Wnt Effector TCF4 Is Dispensable for Wnt Signaling in Human Cancer Cells. *Genes*, 9(9), 439. <https://doi.org/10.3390/genes9090439>
- 217 Deshmukh, V., Hu, H., Barroga, C., Bossard, C., Kc, S., Dellamary, L., Stewart, J., Chiu, K., Ibanez, M., Pedraza, M., Seo, T., Do, L., Cho, S., Cahiwat, J., Tam, B., Tambiah, J. R. S., Hood, J., Lane, N. E., & Yazici, Y. (2018). A small-molecule inhibitor of the Wnt pathway (SM04690) as a potential disease modifying agent for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis and Cartilage*, 26(1), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2017.08.015>
- 218 Deshmukh, V., O'Green, A. L., Bossard, C., Seo, T., Lamangan, L., Ibanez, M., Ghias, A., Lai, C., Do, L., Cho, S., Cahiwat, J., Chiu, K., Pedraza, M., Anderson, S., Harris, R., Dellamary, L., Kc, S., Barroga, C., Melchior, B., ... Yazici, Y. (2019). Modulation of the Wnt pathway through inhibition of CLK2 and DYRK1A by lorecivint as a novel, potentially disease-modifying approach for knee osteoarthritis treatment. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(9), 1347–1360. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.05.006>
- 219 Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5307), 1787–1790. <https://doi.org/10.1126/science.275.5307.1787>

- 220 He, J., Zeng, Z., Wang, Y., Deng, J., Tang, X., Liu, F., Huang, J., Chen, H., Liang, R., Zan, X., Liu, Z., Tong, A., Guo, G., Xu, J., Zhu, X., Zhou, L., & Peng, Y. (2021). Characterization of novel CTNNB1 mutation in Craniopharyngioma by whole-genome sequencing. *Molecular cancer*, 20(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01468-7>
- 221 Yang, H.-Z., Ma, Y., Zhou, Y., Xu, L.-M., Chen, X.-J., Ding, W.-B., & Zou, H.-B. (2015). Autophagy contributes to the enrichment and survival of colorectal cancer stem cells under oxaliplatin treatment. *Cancer Letters*, 361(1), 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.02.045>
- 222 Jin, F., Wang, Y., Li, M., Zhu, Y., Liang, H., Wang, C., Wang, F., Zhang, C.-Y., Zen, K., & Li, L. (2017). MiR-26 enhances chemosensitivity and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through inhibiting autophagy. *Cell Death & Disease*, 8(1), e2540. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.461>
- 223 Li, Y.-J., Lei, Y.-H., Yao, N., Wang, C.-R., Hu, N., Ye, W.-C., Zhang, D.-M., & Chen, Z.-S. (2017). Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chinese Journal of Cancer*, 36(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s40880-017-0219-2>
- 224 Klionsky, D. J., Abdel-Aziz, A. K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M. H., Abudu, Y. P., Acevedo-Arozena, A., Adamopoulos, I. E., Adeli, K., Adolph, T. E., Adornetto, A., Aflaki, E., Agam, G., Agarwal, A., Aggarwal, B. B., Agnello, M., ... Tong, C. K. (2021). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. In *Autophagy* (Vol. 17, Issue 1, pp. 1–382). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>
- 225 Kumar, B., Ahmad, R., Sharma, S., Gowrikumar, S., Primeaux, M., Rana, S., Natarajan, A., Oupicky, D., Hopkins, C. R., Dhawan, P., & Singh, A. B. (2021). PIK3C3 Inhibition Promotes Sensitivity to Colon Cancer Therapy by Inhibiting Cancer Stem Cells. *Cancers*, 13(9). <https://doi.org/10.3390/cancers13092168>
- 226 Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6), 947–956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>
- 227 Arora, M., & Spencer, S. L. (2017). A Cell-Cycle “Safe Space” for Surviving Chemotherapy. *Cell Systems*, 5(3), 161–162. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.09.010>
- 228 Chen, J.-Y., Lin, J.-R., Tsai, F.-C., & Meyer, T. (2013). Dosage of Dyrk1a shifts cells within a p21-cyclin D1 signaling map to control the decision to enter the cell cycle. *Molecular Cell*, 52(1), 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.09.009>
- 229 Wang, Q., Zhou, Y., Weiss, H. L., Chow, C.-W., & Evers, B. M. (2011). NFATc1 regulation of TRAIL expression in human intestinal cells. *PloS One*, 6(5), e19882. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019882>
- 230 Holtz-Heppelmann, C. J., Algeciras, A., Badley, A. D., & Paya, C. v. (1998). Transcriptional regulation of the human FasL promoter-enhancer region. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(8), 4416–4423. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.8.4416>

- 231 Han, S., Meng, L., Jiang, Y., Cheng, W., Tie, X., Xia, J., & Wu, A. (2017). Lithium enhances the antitumour effect of temozolomide against TP53 wild-type glioblastoma cells via NFAT1/FasL signalling. *British Journal of Cancer*, 116(10), 1302–1311. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.89>
- 232 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, 19793. <https://doi.org/10.1038/srep19793>
- 233 Rivera, A., & Maxwell, S. A. (2005). The p53-induced gene-6 (proline oxidase) mediates apoptosis through a calcineurin-dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(32), 29346–29354. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504852200>
- 234 Wang, W., Zafar, A., Rajaei, M., & Zhang, R. (2020). Two Birds with One Stone: NFAT1-MDM2 Dual Inhibitors for Cancer Therapy. *Cells*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/cells9051176>
- 235 Wang, W., Qin, J. J., Voruganti, S., Nijampatnam, B., Velu, S. E., Ruan, K. H., Hu, M., Zhou, J., & Zhang, R. (2018). Discovery and Characterization of Dual Inhibitors of MDM2 and NFAT1 for Pancreatic Cancer Therapy. *Cancer research*, 78(19), 5656–5667. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3939>
- 236 Piki, E., Dini, A., Raivola, J., Salokas, K., Zhang, K., Varjosalo, M., Pellinen, T., Välimäki, K., Veskimäe, K. T., Staff, S., Hautaniemi, S., Murumägi, A., & Ungureanu, D. (2023). ROR1-STAT3 signaling contributes to ovarian cancer intra-tumor heterogeneity. *Cell Death Discovery*, 9(1), 222. <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01527-6>
- 237 Karvonen, H., Barker, H., Kaleva, L., Niininen, W., & Ungureanu, D. (2019). Molecular Mechanisms Associated with ROR1-Mediated Drug Resistance: Crosstalk with Hippo-YAP/TAZ and BMI-1 Pathways. *Cells*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080812>
- 238 Long, Q. Z., Du, Y. F., Liu, X. G., Li, X., & He, D. L. (2015). miR-124 represses FZD5 to attenuate P-glycoprotein-mediated chemo-resistance in renal cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(9), 7017–7026. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3369-3>
- 239 Huang, W., Yang, S., Cheng, Y. S., Sima, N., Sun, W., Shen, M., Braisted, J. C., Lu, W., & Zheng, W. (2022). Terfenadine resensitizes doxorubicin activity in drug-resistant ovarian cancer cells via an inhibition of CaMKII/CREB1 mediated ABCB1 expression. *Frontiers in oncology*, 12, 1068443. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.1068443>
- 240 Fang, Y., Xiao, X., Wang, J., Dasari, S., Pepin, D., Nephew, K. P., Zamarin, D., & Mitra, A. K. (2024). Cancer associated fibroblasts serve as an ovarian cancer stem cell niche through noncanonical Wnt5a signaling. *NPJ precision oncology*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41698-023-00495-5>
- 241 Bartucci, M., Svensson, S., Romania, P., Dattilo, R., Patrizii, M., Signore, M., Navarra, S., Lotti, F., Biffoni, M., Pillozzi, E., Duranti, E., Martinelli, S., Rinaldo, C., Zeuner, A., Maugeri-Saccà, M., Eramo, A., & de Maria, R. (2012). Therapeutic

- targeting of Chk1 in NSCLC stem cells during chemotherapy. *Cell Death and Differentiation*, 19(5), 768–778. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.170>
- 242 Vijayakumar, S., Liu, G., Rus, I. A., Yao, S., Chen, Y., Akiri, G., Grumolato, L., & Aaronson, S. A. (2011). High-frequency canonical Wnt activation in multiple sarcoma subtypes drives proliferation through a TCF/ β -catenin target gene, CDC25A. *Cancer cell*, 19(5), 601–612. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.03.010>
- 243 Suzuki, A., Pelikan, R. C., & Iwata, J. (2015). WNT/ β -Catenin Signaling Regulates Multiple Steps of Myogenesis by Regulating Step-Specific Targets. *Molecular and cellular biology*, 35(10), 1763–1776. <https://doi.org/10.1128/MCB.01180-14>
- 244 Ding, Y., Su, S., Tang, W., Zhang, X., Chen, S., Zhu, G., Liang, J., Wei, W., Guo, Y., Liu, L., Chen, Y. G., & Wu, W. (2014). Enrichment of the β -catenin-TCF complex at the S and G2 phases ensures cell survival and cell cycle progression. *Journal of cell science*, 127(Pt 22), 4833–4845. <https://doi.org/10.1242/jcs.146977>
- 245 Zhang, Y., Fan, J., Fan, Y., Li, L., He, X., Xiang, Q., Mu, J., Zhou, D., Sun, X., Yang, Y., Ren, G., Tao, Q., & Xiang, T. (2018). The new 6q27 tumor suppressor DACT2, frequently silenced by CpG methylation, sensitizes nasopharyngeal cancer cells to paclitaxel and 5-FU toxicity via β -catenin/Cdc25c signaling and G2/M arrest. *Clinical epigenetics*, 10(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0459-2>
- 246 Leow, P. C., Tian, Q., Ong, Z. Y., Yang, Z., & Ee, P. L. (2010). Antitumor activity of natural compounds, curcumin and PKF118-310, as Wnt/ β -catenin antagonists against human osteosarcoma cells. *Investigational new drugs*, 28(6), 766–782. <https://doi.org/10.1007/s10637-009-9311-z>
- 247 Zhao, L., Miao, H. C., Li, W. J., Sun, Y., Huang, S. L., Li, Z. Y., & Guo, Q. L. (2016). LW-213 induces G2/M cell cycle arrest through AKT/GSK3 β / β -catenin signaling pathway in human breast cancer cells. *Molecular carcinogenesis*, 55(5), 778–792. <https://doi.org/10.1002/mc.22321>
- 248 Sekiya, T., Nakamura, T., Kazuki, Y., Oshimura, M., Kohu, K., Tago, K., Ohwada, S., & Akiyama, T. (2002). Overexpression of Icat induces G(2) arrest and cell death in tumor cell mutants for adenomatous polyposis coli, beta-catenin, or Axin. *Cancer research*, 62(11), 3322–3326.
- 249 Kapoor, S., & Padwad, Y. S. (2023). Phloretin induces G2/M arrest and apoptosis by suppressing the β -catenin signaling pathway in colorectal carcinoma cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 28(5-6), 810–829. <https://doi.org/10.1007/s10495-023-01826-4>
- 250 Zhu, Y., Huang, S., Chen, S., Chen, J., Wang, Z., Wang, Y., & Zheng, H. (2021). SOX2 promotes chemoresistance, cancer stem cells properties, and epithelial–mesenchymal transition by β -catenin and Beclin1/autophagy signaling in colorectal cancer. *Cell Death & Disease*, 12(5), 449. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03733-5>
- 251 Chen, Y., Zhao, H., Liang, W., Jiang, E., Zhou, X., Shao, Z., Liu, K., & Shang, Z. (2022). Autophagy regulates the cancer stem cell phenotype of head and neck squamous cell carcinoma through the noncanonical FOXO3/SOX2 axis. *Oncogene*, 41(5), 634–646. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02115-7>

- 252 Gregorieff A, Liu Y, Inanlou MR, Khomchuk Y, Wrana JL. Yap-dependent reprogramming of Lgr5(+) stem cells drives intestinal regeneration and cancer. *Nature*. 2015 Oct 29;526(7575):715-8. doi: 10.1038/nature15382. Epub 2015 Oct 21. PMID: 26503053.
- 253 Wu, C., Rakhshandehroo, T., Wettersten, H. I., Campos, A., von Schalscha, T., Jain, S., Yu, Z., Tan, J., Mose, E., Childers, B. G., Lowy, A. M., Weis, S. M., & Cheresch, D. A. (2023). Pancreatic cancer cells upregulate LPAR4 in response to isolation stress to promote an ECM-enriched niche and support tumour initiation. *Nature Cell Biology*, 25(2), 309–322. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-01055-y>
- 254 Tam, B. Y., Chiu, K., Chung, H., Bossard, C., Nguyen, J. D., Creger, E., Eastman, B. W., Mak, C. C., Ibanez, M., Ghias, A., Cahiwat, J., Do, L., Cho, S., Nguyen, J., Deshmukh, V., Stewart, J., Chen, C.-W., Barroga, C., Dellamary, L., ... Yazici, Y. (2020). The CLK inhibitor SM08502 induces anti-tumor activity and reduces Wnt pathway gene expression in gastrointestinal cancer models. *Cancer Letters*, 473, 186–197. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.09.009>
- 255 Blackie, A. C., & Foley, D. J. (2022). Exploring the roles of the Cdc2-like kinases in cancers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 70, 116914. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2022.116914>
- 256 Zhou, H.-B., Yang, L., Liu, S.-F., Xu, X.-H., Chen, Z., Li, Y.-X., Yuan, J.-H., & Wei, Y.-C. (2022). CDC Like Kinase 2 plays an oncogenic role in colorectal cancer via modulating the Wnt/ β -catenin signaling. *Neoplasma*, 69(3), 657–669. https://doi.org/10.4149/neo_2022_220206N138
- 257 Funnell, T., Tasaki, S., Oloumi, A., Araki, S., Kong, E., Yap, D., Nakayama, Y., Hughes, C. S., Cheng, S.-W. G., Tozaki, H., Iwatani, M., Sasaki, S., Ohashi, T., Miyazaki, T., Morishita, N., Morishita, D., Ogasawara-Shimizu, M., Otori, M., Nakao, S., ... Aparicio, S. (2017). CLK-dependent exon recognition and conjoined gene formation revealed with a novel small molecule inhibitor. *Nature Communications*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.1038/s41467-016-0008-7>
- 258 Park, S. Y., Piao, Y., Thomas, C., Fuller, G. N., & de Groot, J. F. (2016). Cdc2-like kinase 2 is a key regulator of the cell cycle via FOXO3a/p27 in glioblastoma. *Oncotarget*, 7(18), 26793–26805. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8471>
- 259 Han, T., Goswami, S., Hu, Y., Tang, F., Zafra, M. P., Murphy, C., Cao, Z., Poirier, J. T., Khurana, E., Elemento, O., Hechtman, J. F., Ganesh, K., Yaeger, R., & Dow, L. E. (2020). Lineage Reversion Drives WNT Independence in Intestinal Cancer. *Cancer Discovery*, 10(10), 1590–1609. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1536>
- 260 Wenzel, J., Rose, K., Haghghi, E. B., Lamprecht, C., Rauen, G., Freißen, V., Kesselring, R., Boerries, M., & Hecht, A. (2020). Loss of the nuclear Wnt pathway effector TCF7L2 promotes migration and invasion of human colorectal cancer cells. *Oncogene*, 39(19), 3893–3909. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1259-7>
- 261 Seth, C., & Ruiz i Altaba, A. (2016). Metastases and Colon Cancer Tumor Growth Display Divergent Responses to Modulation of Canonical WNT Signaling. *PLoS One*, 11(3), e0150697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150697>

11. ANEXOS

Artículo derivado del proyecto de doctorado

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>.

Artículo publicado como actividad académica, desarrollado durante los estudios de doctorado.

Moreno-Londoño, A. P., & Robles-Flores, M. (2024). Functional Roles of CD133: More than Stemness Associated Factor Regulated by the Microenvironment. *Stem cell reviews and reports*, 20(1), 25–51. <https://doi.org/10.1007/s12015-023-10647-6>.



Article

Canonical Wnt Pathway Is Involved in Chemoresistance and Cell Cycle Arrest Induction in Colon Cancer Cell Line Spheroids

Angela Patricia Moreno-Londoño¹, María Cristina Castañeda-Patlán¹, Miguel Angel Sarabia-Sánchez¹, Marina Macías-Silva² and Martha Robles-Flores^{1,*}

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 04510, Mexico

² Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City 04510, Mexico

* Correspondence: rmartha@unam.mx

Abstract: The presence of cancer stem cells (CSCs) has been associated with the induction of drug resistance and disease recurrence after therapy. 5-Fluorouracil (5FU) is widely used as the first-line treatment of colorectal cancer (CRC). However, its effectiveness may be limited by the induction of drug resistance in tumor cells. The Wnt pathway plays a key role in the development and CRC progression, but it is not clearly established how it is involved in CSCs resistance to treatment. This work aimed to investigate the role played by the canonical Wnt/ β -catenin pathway in CSCs resistance to 5FU treatment. Using tumor spheroids as a model of CSCs enrichment of CRC cell lines with different Wnt/ β -catenin contexts, we found that 5FU induces in all CRC spheroids tested cell death, DNA damage, and quiescence, but in different proportions for each one: RKO spheroids were very sensitive to 5FU, while SW480 were less susceptible, and the SW620 spheroids, the metastatic derivative of SW480 cells, displayed the highest resistance to death, high clonogenic capacity, and the highest ability for regrowth after 5FU treatment. Activating the canonical Wnt pathway with Wnt3a in RKO spheroids decreased the 5FU-induced cell death. But the Wnt/ β -catenin pathway inhibition with Adavivint alone or in combination with 5FU in spheroids with aberrant activation of this pathway produced a severe cytostatic effect compromising their clonogenic capacity and diminishing the stem cell markers expression. Remarkably, this combined treatment also induced the survival of a small cell subpopulation that could exit the arrest, recover SOX2 levels, and re-grow after treatment.

Keywords: canonical Wnt signaling; colon cancer; cancer stem cells; chemoresistance; quiescence induction; tumor spheroids



Citation: Moreno-Londoño, A.P.; Castañeda-Patlán, M.C.; Sarabia-Sánchez, M.A.; Macías-Silva, M.; Robles-Flores, M. Canonical Wnt Pathway Is Involved in Chemoresistance and Cell Cycle Arrest Induction in Colon Cancer Cell Line Spheroids. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 5252. <https://doi.org/10.3390/ijms24065252>

Academic Editors: Miran Čoklo and Mirela Sedic

Received: 28 December 2022

Revised: 14 February 2023

Accepted: 15 February 2023

Published: 9 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is one of the cancers with the highest incidence (occupying the third position) and the second position in mortality percentage worldwide (Globocan 2020). 5-Fluorouracil (5FU) remains the most common chemotherapeutic drug used in the fight against CRC, either alone or in combination with other medications. Although patients show an initial response to 5FU-based therapy, many of them no longer respond; residual tumoral cells re-gain proliferative capacity and repopulate the tumor, resulting in disease relapse [1–3]. In this regard, it has been reported that more than 40% of patients show resistance to 5FU [4], but the mechanisms involved in resistance promotion in residual cancer cells are not fully understood [4,5].

Cancer stem cells (CSCs) represent a cell subset with characteristics similar to healthy stem cells, such as self-renewal capacity, but with tumor-initiating ability and high invasive capacity. One of the most important CSC properties is their ability to resist conventional

therapies [6]. Among the mechanisms that allow them to resist treatment are the high expression of multidrug resistance genes, such as the ATP-binding cassette transporter proteins, increased anti-apoptotic protein expression, and more efficient DNA damage repair machinery. But probably the most efficient way to resist therapy mainly directed to eliminate proliferating cells is their ability to enter a quiescent state, in which, apart from this, the tumoral cell can avoid DNA damage induced by the conventional antiproliferative agents [7]. Finding new ways to eradicate the CSCs subpopulation is then of paramount importance. Still, it demands understanding the cellular and molecular mechanisms that allow CSCs to face cytotoxic stress.

The Wnt signaling is one of the main pathways regulating stemness in healthy and cancer cells [8,9]. Wnt ligands in the stem cell niche can activate different Wnt pathways, canonical β -catenin-dependent, and non-canonical β -catenin-independent signaling pathways. Wnt pathways control cell proliferation, survival, migration, and invasiveness. But only the canonical pathway has been directly linked to the maintenance of the stem cell phenotype in CRC. The non-canonical pathway's role in cancer stem cells remains poorly understood [10]. Experimental evidence in different cancers has shown that canonical Wnt inhibition may sensitize tumoral cells to conventional therapy [11,12], which allows for overcoming resistance. On the other hand, it has also been reported that aberrant Wnt signaling confers resistance to targeted or standard anti-cancer therapies by several mechanisms. These include maintaining the cancer stem cell population, favoring transcriptional plasticity, improving DNA damage repair, and inducing immune evasion [13].

The main objective of this study was to investigate the role played by the canonical Wnt/ β -catenin pathway in CSCs resistance to 5FU treatment in colon tumor spheroids, an in vitro model characterized by the enrichment of cells with a stemness phenotype. Our findings indicate that 5FU alone induces in all CRC spheroids tested cell death, DNA damage, and quiescence, but in different proportions for each one. We also found that the activation of canonical Wnt signaling promotes survival in different spheroid cell contexts, which counteracts the negative effects induced by 5FU. Notably, in CSCs with aberrant canonical Wnt activation, the combined treatment of 5FU with a canonical Wnt inhibitor produced severe cytostatic effects via the induction of a G0 arrest and G2 phase accumulation. Despite this, a small CSC population could exit the arrest and re-grow after treatment. Our data suggest, therefore, that canonical Wnt signaling is involved in inducing CSCs resistance to 5FU treatment, but that in addition, other mechanisms besides canonical Wnt signaling are involved in CSCs survival promotion.

2. Results

2.1. Tumor Spheroid Culture Is Enriched in CSCs and Serves as a Model for CSCs Study

Spheroids culture has been widely used to study cancer stem cells since their enrichment has been demonstrated in these cultures that favor the stem cells' ability for anchorage-independent growth in a clonal density and serum-free medium [14–16]. Many studies have reported that CRC cancer cells in spheroids express markers associated with stemness phenotypes such as CD133, CD44, CD44v6, CD166, and Lgr5 [17–20], the latter widely used to study CRC cancer stem-like cells both in in vitro and in vivo models [21,22]. To validate our model, we compared the cell surface expression of Lgr5, CD133, CD44, and CD44v6 between monolayer cultures (2D cultures) and second-generation spheroids on the 11th day of forming spheroids. We found that spheroids showed a heterogeneous expression of these CSCs markers depending on the CRC cell line tested. Overall, spheroids exhibit an increased expression of Lgr5 and CD133 at the cell surface (Figures 1C and 1F, respectively), while the total levels of CD44 and CD44v6 did not change compared with cells grown in 2D cultures (Figures 1B and 1E, respectively). Remarkably, SW480 and RKO spheroids showed a higher proportion of CD44+Lgr5+ double-positive subpopulation than 2D cultures (Figure 1A,D). In SW620 spheroids, we only observed an increase of 2.5-fold in the Lgr5+CD44– subpopulation compared to 2D culture, without showing changes in Lgr5 and CD44 total expression levels. The meaning of these changes in subpopulation

distribution in SW620 spheroids compared to 2D cultures is unclear. Several studies have reported that CSCs surface marker expression is dynamic and can fluctuate in response to the tumoral microenvironment [23–26].

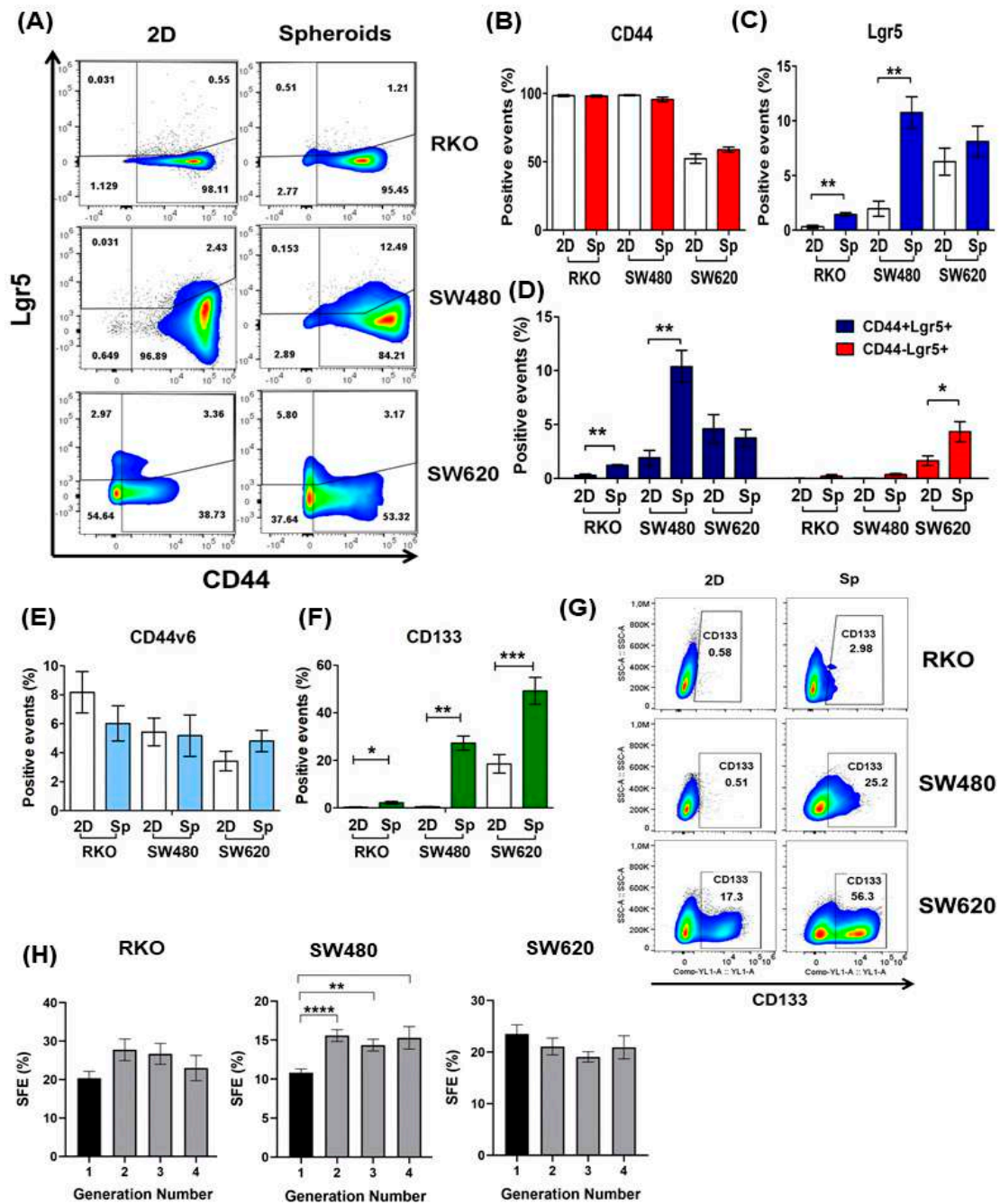


Figure 1. Spheroids as a model of cancer stem cells (CSCs) enrichment of CRC cell lines. (A–G) Comparative expression of surface markers associated with stemness in second-generation spheroids compared to monolayer cultures (2D) in RKO, SW480, and SW620 cell lines. The proportions of CD44 (B), Lgr5 (C), CD44v6 (E), CD133 (F,G), CD44+Lgr5+, and CD44–Lgr5+ subpopulations (A,D) were measured by flow cytometry. (H) Quantification of the spheroid formation efficiency (SFE %) of the RKO, SW480, and SW620 cell lines throughout four consecutive generations. Data are represented as the mean values ± SEM of at least three independent experiments. (B–F) Student’s *t*-test; (G) One-way ANOVA followed by Bonferroni’s multiple comparisons. * *p* < 0.05; ** *p* < 0.001; *** *p* < 0.0001; **** *p* < 0.00001.

Additionally, we examined the self-renewal ability of the cells cultured in spheroids by assessing spheroid formation efficiency through serial passages (four generations). As shown in Figure 1H, the spheroids cultures from all the cell lines tested contain a subpopulation with unlimited self-renewal ability, which is consistent with the CSC phenotype [16]. The spheroid-forming efficiency (SFE) of RKO and SW480 cell lines increased from the second generation, but only SW480 cells exhibited a significant increase. Although SW620 cells showed a slight reduction in SFE along the passages, it was not statistically significant. These results indicated that spheroids culture is an optimum in vitro model to study cancer stem-like cells.

2.2. 5FU Induces Cell Cycle Arrest in CRC Spheroids

To evaluate the 5FU-induced cytotoxicity in CRC spheroids, we treated established spheroids with increasing concentrations of 5FU for 72 h. Figure 2A shows that both SW480 and SW620 spheroids show resistance to 5FU, while RKO spheroids exhibit sensitivity according to cell viability analysis. 5FU induced cell death and DNA damage in the spheroids of all cell lines tested, but RKO spheroids showed higher levels of cleaved-PARP (c-PARP) and p- γ H2AX (Ser139) as apoptosis and DNA damage markers, respectively (Figure 2B), followed by SW480 spheroids and SW620 spheroids. Regardless of the mutational status of cell lines, 5FU increased the proportion of cells in a quiescent state (Go phase of the cell cycle) as measured by the non-expression of Ki67, a cell proliferation marker (Figure 2C). Moreover, RKO spheroids showed a decrease in the G2/M phase after 72 h of 5FU treatment ($p < 0.001$) as a consequence of the cell cycle arrest (Figure 2C). In addition, p-CDK2 levels decreased, and p21 levels increased significantly in RKO spheroids due to increasing levels of p53 (wild-type) in response to 5FU-induced DNA damage (Figure 2D). Surprisingly, we detected high basal levels of p21 in SW480 spheroids compared to SW620 spheroids, and 5FU treatment only decreased them in SW480 spheroids. Thus, these data suggest that 5FU-induced cell cycle arrest in Go in SW480 and SW620 spheroids is probably via other CDK inhibitors (Figure 2D). These results could explain a minor capacity for regrowth post-5FU treatment (5FU-free time) under anchorage-dependent conditions (Figure 3C) and the absence of cell division under anchorage-independent conditions after 21 days of incubation (Figure 3B). In addition, as can be seen in Figure 2D, SW620 spheroids were the only ones that showed an increase in p-CDK2 levels. This result was consistent with the higher clonogenic capacity they displayed under anchorage-dependent conditions (Figure 3C) and the emergence of several clones observed on the 21st day of incubation under anchorage-independent conditions during 5FU post-treatment time compared to other cell lines (Figure 3B).

Additionally, because of the detection of low or no regrowth as spheroids in all cell lines after 5FU treatment, we evaluated cell viability on the 21st day of incubation. We found that only 18% of RKO cells and 27% of SW480 cells were still viable, in contrast with 66% of SW620 cells (Figure 3B). This result, along with the limited size of clones of SW480/SW620 and the non-proliferation of RKO cells at the end of the assay compared to established spheroids derived from control cells on the 7th-day post-treatment, reflect a deep cell cycle arrest in RKO cells and a slow-cycling phenotype of survival cells during post-treatment time in SW480 and SW620 cells.

Altogether these results indicated that the metastatic SW620 spheroids display the highest resistance to 5FU, as they exhibit lower cell death and DNA damage compared to spheroids of the other cell lines. In addition, and remarkably, their capacity to re-grow and survive post-treatment is much higher than that of RKO and SW480 tumor spheroids. These abilities would be related to a greater probability of recurrence.

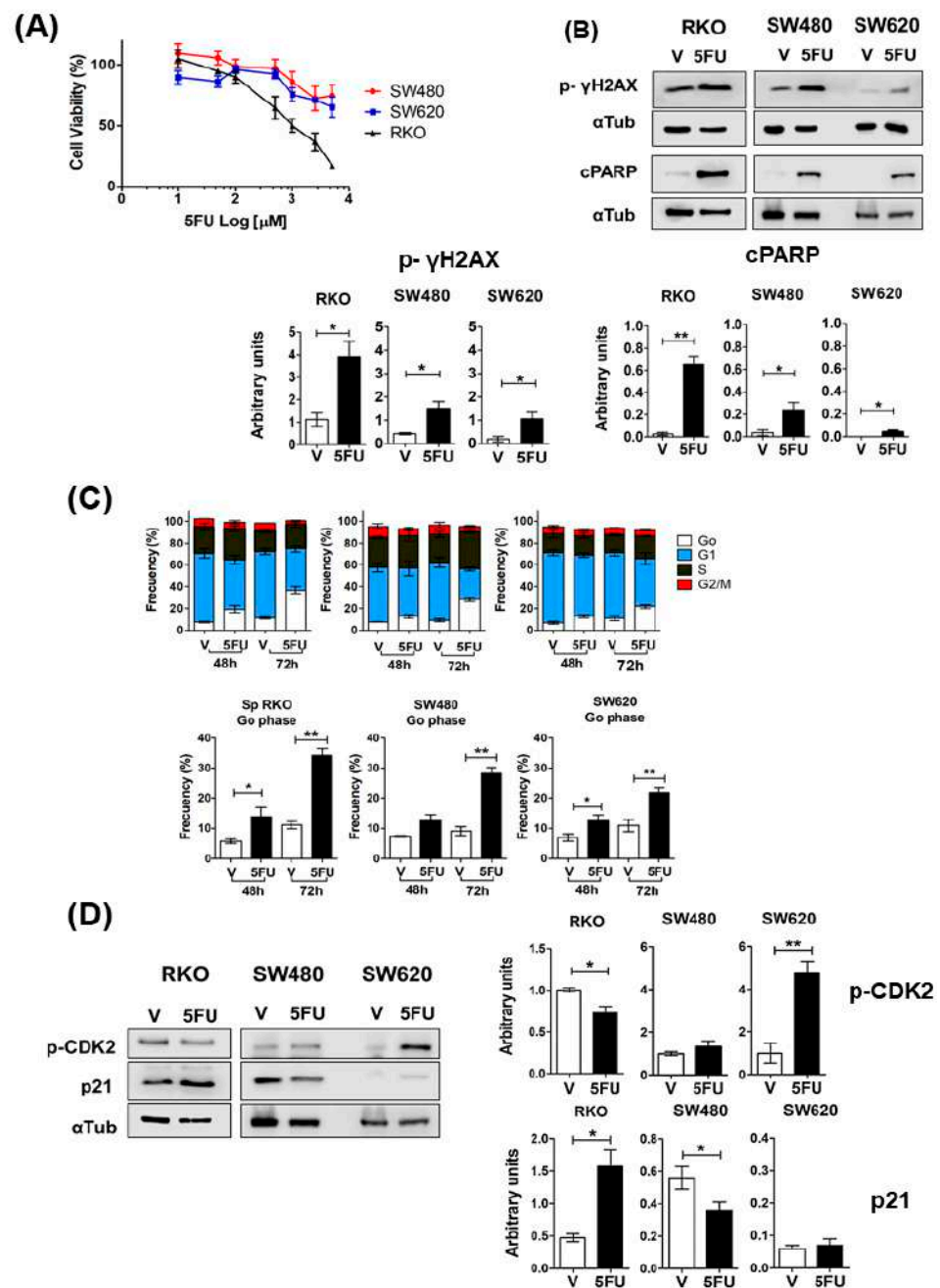


Figure 2. 5FU induces cell death and cell cycle arrest in CRC spheroids. **(A,B)** 5FU cytotoxicity on spheroids from colon cancer cell lines (RKO, SW480, and SW620). **(A)** Dose–response assay of spheroids treated with 5FU for 72 h. Cell viability was determined using the CellTiter-Glo 3D Kit. **(B)** **Upper panel:** Representative immunoblots of cleaved PARP (cPARP) and phospho-histone γH2AX (Ser 139) in spheroids after 72 h of treatment with 5FU or vehicle (V). α -tubulin was used as a loading control. **Lower panel:** quantification of the relative expression levels of the indicated proteins in the **upper panel**. **(C)** **Upper panel:** cell cycle distribution determined by Ki67 detection and propidium iodide staining in spheroids treated with 5FU for 48 and 72 h. **Lower panel:** a comparative analysis of the Go phase between spheroids treated with or without 5FU at the indicated time points. **(D)** **Left panel:** representative immunoblots of phospho-CDK2 (Thr160) and p21 in spheroids after 72 h of treatment with 5FU or vehicle (V). α -tubulin (αTub) was used as a loading control. **Right panel:** quantification of the relative expression levels of the indicated proteins in the **left panel**. Data are represented as the mean values \pm SEM of at least three independent experiments. Student’s *t*-test * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

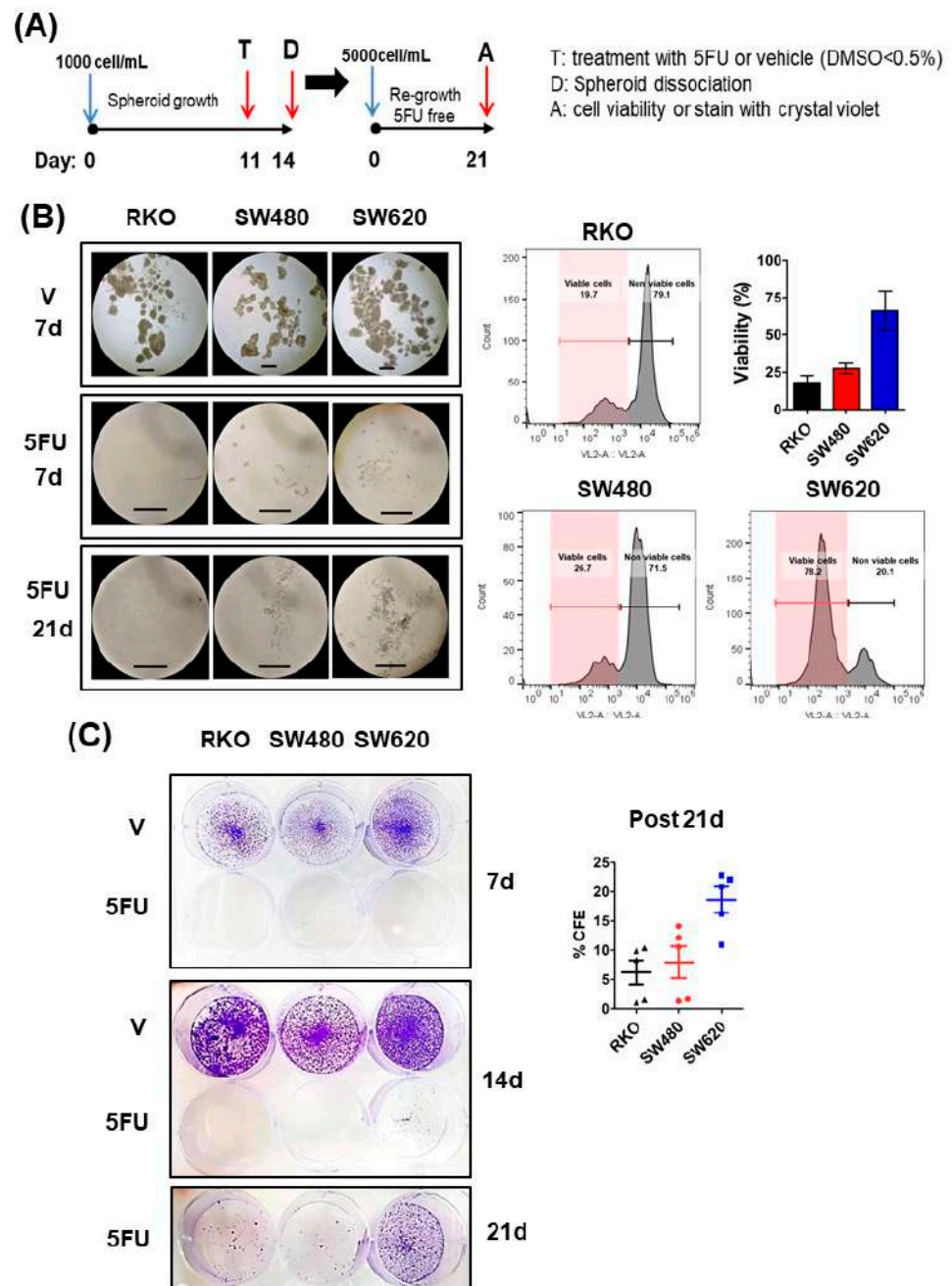


Figure 3. SW620 metastatic cells exhibit an increased capacity for re-grow after 5FU treatment under independent and anchorage-dependent conditions compared to SW480 and RKO cell lines derived from primary tumors. **(A)** Experimental scheme to evaluate the ability of CRC spheroid cells to re-grow after 5FU treatment in anchorage-independent and-dependent conditions compared to cells from spheroids treated with vehicle (V) according to methodology. Spheroids treated were dissociated and seeded to 5000 cells/mL in low-attachment and Tissue culture-treated microplates, respectively. **(B)** **Left panel:** Photographs of cell cultures in low-attachment microplates on the 7th, 14th, and 21st day of incubation after spheroids dissociation and cell re-seeding (scale bar: 500 μ m). **Right panel:** Cell viability of collected cells in these cultures was determined using AquaZombie dye on the 21st day of incubation. Fluorescence was measured by flow cytometry. **(C)** Colonies formed in high adherence surfaces (tissue culture-treated microplates) were stained with crystal violet on the 7th, 14th, and 21st days of growth after cell re-seeding. The colony formation efficiency (% CFE) post-5FU treatment was calculated on the 21st day. Images are representative of at least three independent experiments.

2.3. Wnt Pathway Stimulation Promotes Cell Survival in 5FU-Sensitive Spheroids

Given the increasing evidence suggesting the participation of the canonical Wnt pathway in drug chemoresistance [27], we investigated whether Wnt signaling activation by Wnt ligands favors the survival of 5FU-treated spheroids. Because the RKO spheroids do not have a constitutive, ligand-independent canonical Wnt signaling activation and are responsive to Wnt ligands, we treated RKO spheroids with 300 ng/mL of either Wnt3a or Wnt5a ligands to evaluate their effect on 5FU-induced cytotoxicity. We have previously reported that the Wnt3a ligand acts as a prototype canonical ligand, activating the β -catenin transcriptional activity in RKO 2D cell culture [28]. As can be observed in Figure 4A, we also detected that only Wnt3a, but non-Wnt5a, induced the β -catenin transcriptional activity in a subpopulation of spheroids transduced with a GFP-Wnt reporter gene after 24 h of treatment. Moreover, Wnt3a caused an increase in active β -catenin (non-phosphorylated) levels at 24 h of treatment with a subsequent fall at 48 h (Figure 4B). Consistent with this, we detected the increased expression of canonical β -catenin/TCF target genes, such as c-Myc, cyclin D1, and survivin (Figure 4B). Of note, both Wnt3a and Wnt5a increased the level of these proteins, but at different times, at 24 and 48 h, respectively (Figure 4B). Consistent with our previous reports [28], we also observed that while Wnt3a can simultaneously activate canonical and non-canonical Wnt/ Ca^{2+} pathways, Wnt5a acts as a non-canonical-prototype ligand in RKO spheroids. Wnt5a could activate Wnt/ Ca^{2+} pathway effectors such as the NFAT transcription factor family involved in cell cycle progression, apoptosis, and survival [29,30].

Because we observed that Wnt ligands showed a different response over time according to changes in the protein levels of the target genes mentioned above, we used a different treatment protocol for each Wnt ligand in RKO spheroids. Given that Wnt3a promotes the expression of β -catenin/TCF target genes in the short term (24 h), we treated RKO-spheroids with an acute Wnt3a dose 1 h before the addition of 5FU (co-treatment model). In contrast, Wnt5a treatment was performed 48 h before 5FU treatment (pretreatment model) due to increased levels of proteins evaluated at 48 h. We found that Wnt5a did not reduce the cell death induced by 5FU, measured by c-PARP levels, and Wnt3a only decreased it by 20% (Figure 4C). But importantly, we found that both Wnt ligands increased the expression of anti-apoptotic proteins such as survivin and Bcl-2 (Figure 4D) compared to RKO spheroids treated with 5FU alone. These data, therefore, indicate that canonical Wnt pathway activation, either by ligand (in RKO cells) or already constitutively active (in SW480 and SW620 cells), induces the same effect in colon cancer stem cells: it counteracts the negative effects produced in them by 5FU. This explains why SW480 and SW620 cells are already resistant to 5FU, and RKO cells are sensitive unless Wnt3a stimulates canonical Wnt in them.

2.4. Canonical Wnt Inhibition Favors Survival against 5FU-Induced Cytotoxicity in Spheroids with Constitutive Active Canonical Wnt Signaling

The results obtained with RKO spheroids showing that canonical Wnt signaling activation attenuates 5FU-induced cell death suggested that inhibiting canonical Wnt signaling in cells with constitutive activity could sensitize them to chemotherapy. To test this hypothesis, first, we overexpressed a dominant-negative TCF4 (dnTCF4) in SW480 and SW620 cell lines by stable transfection with the pPGS dnTcf-4(Δ N41) plasmid. As can be observed in Figure 5, the inhibition of the β -catenin transcriptional activity mediated by the expression of the dnTCF4 counteracted the negative effect produced by 5FU alone in cell viability (Figure 5B). However, although there was an initial depletion in the β -catenin TOPflash reporter activity in SW480 cells, we observed that it was restored along the passages, possibly due to a compensatory effect by the presence of other TCF/LEF proteins in these cells, such as TCF1 [31]. Nevertheless, this effect was less in the SW620 cell line, and we observed a low β -catenin/TCF transcriptional activity (Figure 5A) sustained along several passages. For that reason, we only evaluated the effect of dnTCF4 expression in SW620 spheroids against 5FU-induced cytotoxicity. We found that dnTCF4 expression decreased

the loss of cell viability (Figure 5B) and reduced by 38% the 5FU-induced p-yH2AX levels, with no changes in p-CDK2 and survivin levels (Figure 5C,D) after 72 h of 5FU treatment compared to 5FU-treated control spheroids derived from cells transfected with an empty vector. Analysis of cell cycle distribution did not reveal significant changes in dnTCF4 spheroids treated with 5FU in contrast to control spheroids, apart from a G2/M phase reduction (Figure 5E). These results suggest a slight 5FU effect on the proliferation of SW620 spheroids that express dnTCF4, but we cannot rule out the possibility of a compensation effect from other expressed TCF proteins during spheroid formation.

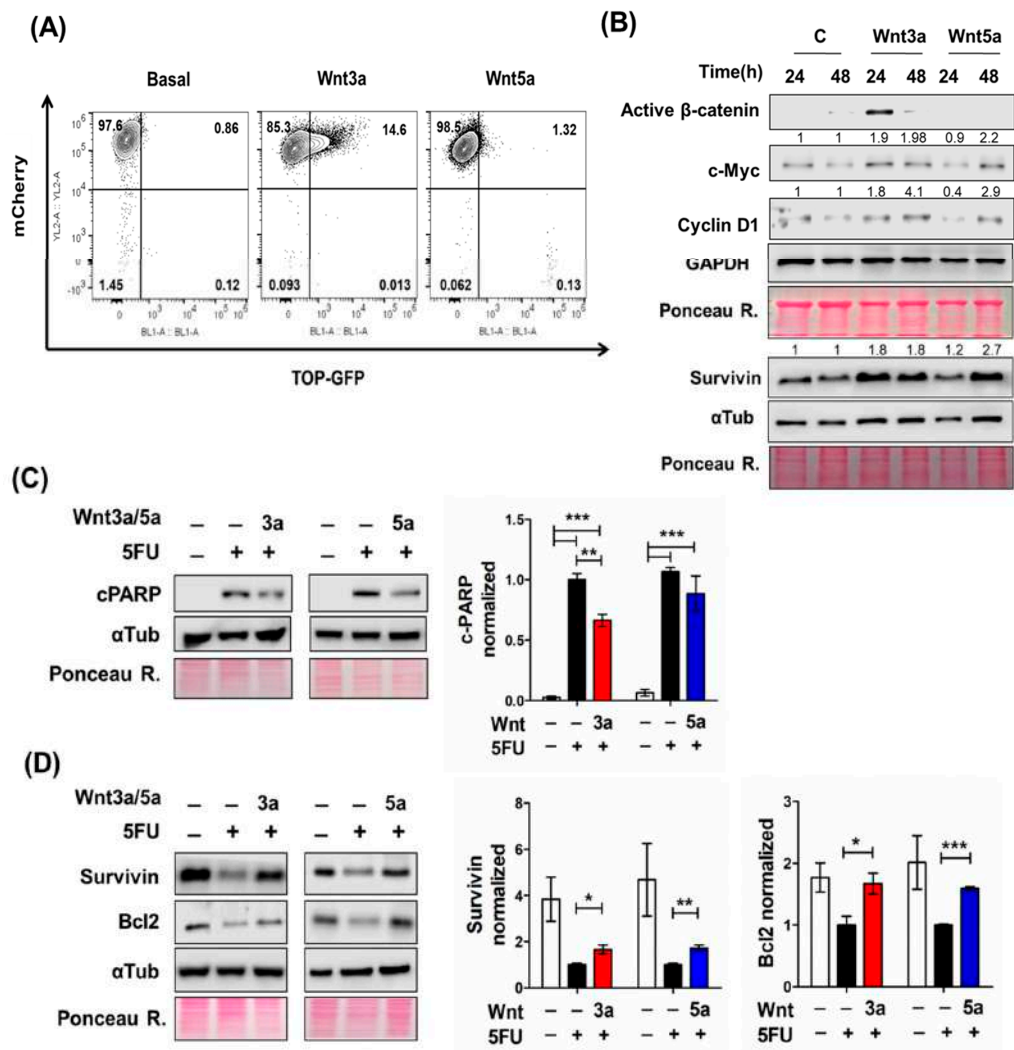


Figure 4. Wnt ligands decrease 5FU-induced death in RKO spheroids through the induction of antiapoptotic protein expression. **(A,B)** Wnt3a but non-Wnt5a activate the canonical Wnt/ β -catenin pathway in RKO spheroids. **(A)** β -catenin/TCF-mediated transcriptional activity was determined in RKO spheroids from sorted cells that were transduced with double-color construct TOP-GFP.mCherry reporter. Spheroids were treated with 300 ng/mL of Wnt3a or Wnt5a for 24 h, and fluorescence was measured by flow cytometry in dissociated spheroid cells. **(B)** Changes in active (non-phosphorylated) β -catenin, c-Myc, cyclin D1, and survivin levels in RKO spheroids treated with 300 ng/mL of Wnt3a or Wnt5a for 24 and 48 h were determined by Western blot. Ponceau Red staining for total protein was used as loading control. Quantification of the relative levels of indicated proteins was normalized to control. Fold change with respect to control (C 24 h or C 48 h) is shown on the top of each band. **(C,D)** Left panels: representative immunoblots of the indicated proteins in RKO spheroids treated with or without Wnt ligands under a scheme of pre-treatment or co-treatment with 5FU. Pre-treatment: RKO spheroids were treated with 300 ng/mL of Wnt5a for 48 h and subsequently

treated with 5FU for 72 h. Co-treatment: RKO spheroids were treated with 300 ng/mL of Wnt3a ligand 1 h before adding 5FU. Spheroids were collected and lysed after 72 h of 5FU treatment. Ponceau Red staining for total protein was used as a loading control. **Right** panels: quantification of the relative levels of indicated proteins in the **left** panels. Protein levels were normalized to 5FU treatment. Data are represented as the mean values \pm SEM of at least three independent experiments. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

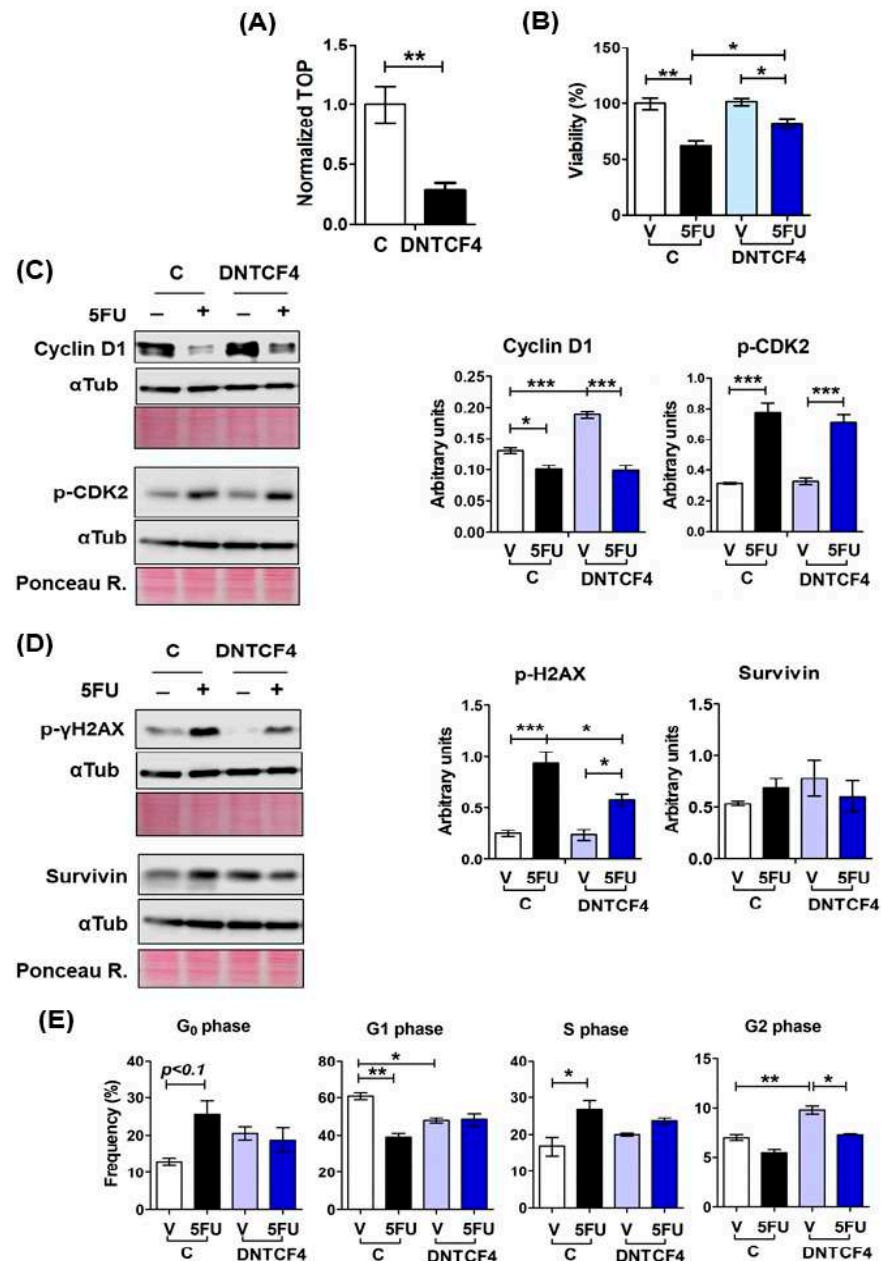


Figure 5. Dominant negative TCF4 (DNTCF4) promotes cell survival in SW620 Spheroids treated with 5FU through decreasing DNA damage. (A) β -catenin/TCF-mediated transcriptional activity decreased as a result of DNTCF4 expression in SW620 cells transfected with plasmid pPGS dnTcf4(deltaN41). The normalized activity of the TCF reporter (TOP-Luc) is shown. Renilla luciferase levels were used as transfection control. (B) SW620 spheroids that express dnTCF4 were treated with 5FU for 72 h. Cell viability was measured using the CellTiter Glo-3D Kit and compared to spheroids derived from cells transfected with an empty vector. (C,D) Immunoblot analysis of cyclin D1 (C), phospho-CDK2 (Th160) (C), phosphor-histone γ H2AX (Ser 139) as DNA damage marker, and survivin (D) in SW620 spheroids^{dnTCF4} and control spheroids treated with or without 5FU for 72 h.

Ponceau Red staining for total protein was used as loading control. (E) Comparative cell cycle analysis of SW620 spheroids^{dnTCF4} and control spheroids treated with or without 5FU for 72 h. Data are represented by the mean \pm SEM of at least two independent tests. One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparisons. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

To investigate the depletion impact of the other TCF proteins, we used the pharmacological inhibitor Adavivint (SM04690), a potent Wnt signaling inhibitor that acts as an ATP competitive small molecule that reduces the expression of TCF1, TCF4 (TCF7L2), AXIN2, and LEF1 at a post-transcriptional level through inhibition of intranuclear kinases CLK2 and DYRK1A, thus leading to an overall inhibitory effect on canonical Wnt-related gene expression [32]. First, we evaluated the efficiency of this inhibitor in SW480 and SW620 cell lines in 2D and spheroids cultures. The results presented in Supplementary Figure S1A show that monolayer cultures of both cell lines treated with increasing Adavivint concentrations (0.03, 0.1, and 1 μ M) for 48 h showed a decrease in the β -catenin, TCF1, and TCF4 expression, and also in Wnt target gene expression such as c-Myc and Axin2, with a higher fall in all levels of the proteins evaluated with 1 μ M Adavivint. In addition, we observed a reduction in β -catenin, TCF1, and c-Myc expression with 1 μ M Adavivint at 72 h of treatment in SW620 spheroids and SW480 spheroids without changes in TCF4 levels (Figure S1C,D). The β -catenin/TCF transcriptional activity also was assessed in spheroids of SW480^{TOP-GFP} cells, obtaining that 1 μ M Adavivint decreased 80% of the GFP fluorescence after 72 h of treatment (Figure S1B).

According to these results, we pretreated SW480 spheroids and SW620 spheroids with 1 μ M Adavivint for 72 h, followed by 5FU treatment for the other 72 h. Surprisingly, the Adavivint pretreatment reduced the apoptosis induced by 5FU (visualized as cleaved-PARP) in spheroids of both cell lines (Figure 6A). Adavivint decreased the DNA damage measured as p- γ H2AX (Ser139) levels in SW620 spheroids with no effect on SW480 spheroids (Figure 6B). As a result of canonical Wnt signaling inhibition, the expression of survivin, an anti-apoptotic protein, was downregulated regardless of the 5FU effect (Figure 6C). Therefore, the data indicate that canonical Wnt signaling inhibition by Adavivint enhances survival in SW480 and SW620 spheroids against 5FU-induced damage. In addition, Adavivint pretreatment decreased the p-CDK2 levels in spheroids of both cell lines but only caused a significant increase in p21 in SW620 spheroids (3.5-fold compared to control), whereas 5FU-induced p21 depletion in SW480 spheroids was not significantly decreased by Adavivint (Figure 6D). These results indicate that canonical Wnt inhibition could disturb the cell cycle and impose a slow-proliferative phenotype.

We next analyzed the cell cycle distribution only in cells from SW620 spheroids due to the overall impact of Adavivint on 5FU-chemoresistance, the metastatic cell line that exhibits higher resistance to 5FU compared to spheroids of the other cell lines, as we described before. Adavivint pretreatment did not induce changes in quiescent cell subpopulation (Go phase) compared to spheroids treated with 5FU alone, as we expected. In contrast, independent of the 5FU stimulus, Adavivint treatment increased the proportion of cells in the S and G2/M phases (Figure 6E). Considering the reduction in p-CDK2, a proliferation marker, and the increase in p21 in SW620 spheroids in conjunction with the changes in the cell cycle distribution, the data suggest that Adavivint causes a delay in the cell cycle at the S and G2 phases compared to the control, rather than reinforce the cell cycle arrest induced by 5FU. G2-phase delaying would favor DNA repair before mitosis and improve survival under endogenous and 5FU-induced damage [33–35].

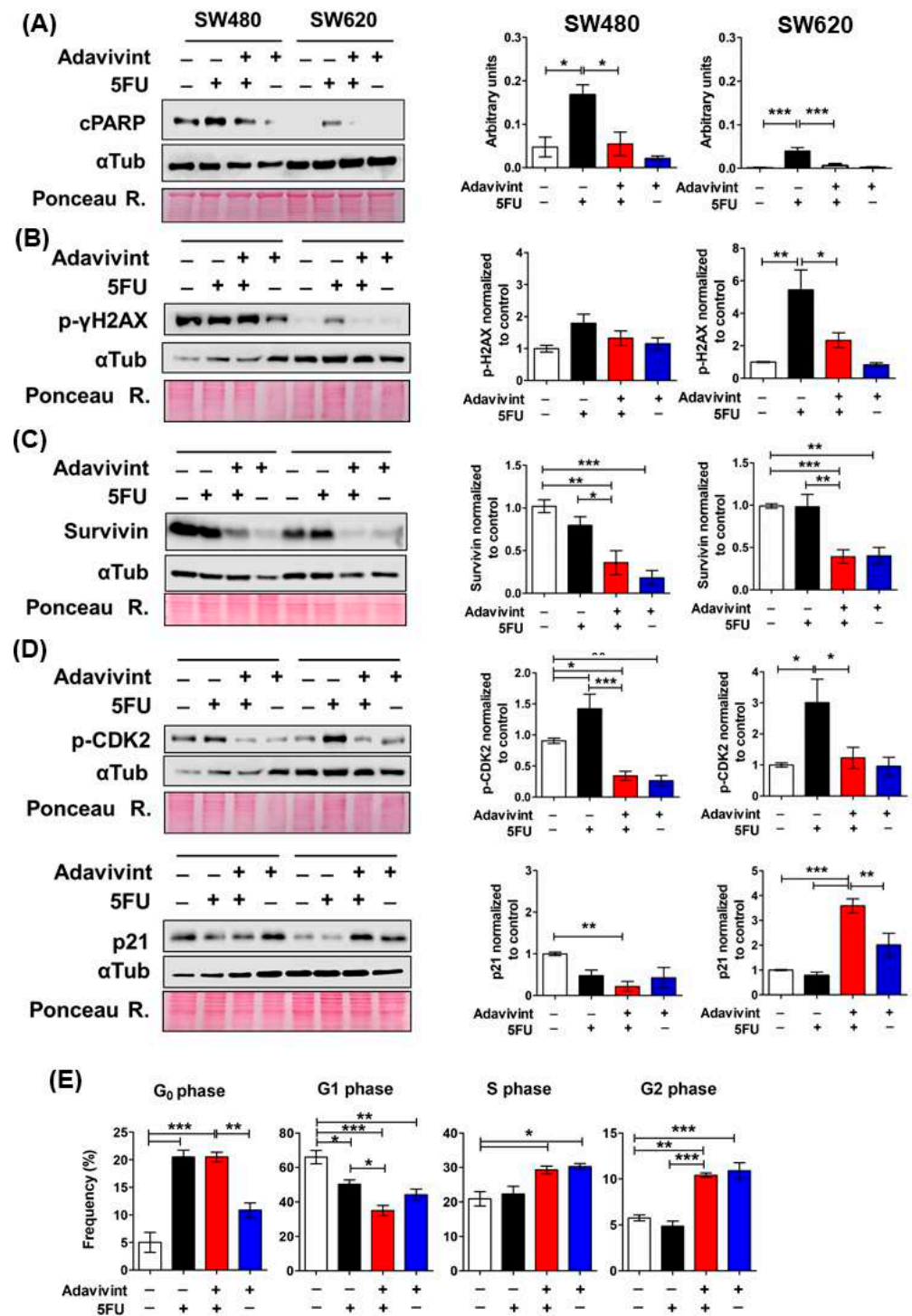


Figure 6. Canonical Wnt pathway inhibition in CRC spheroids increases 5FU resistance by decreasing cell death and inducing cell cycle arrest. SW480 spheroids and SW620 spheroids were pre-treated with or without 1 μM Adavivint for 72 h and subsequently with or without 5FU for 72 h. (A–D) Representative immunoblots of indicated proteins in SW480 spheroids and SW620 spheroids treated with the same conditions as described in (A). Ponceau red staining was used as a loading control (left panels). Quantification of the relative levels of indicated proteins was normalized to control-treated with vehicles of Adavivint and 5FU (right panels). (E) Cell cycle analysis of SW620 spheroids treated with the same conditions as described in (A). Data are represented by the mean ± SEM of at least three independent tests. One-way ANOVA followed by Bonferroni’s multiple comparisons; * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$.

2.5. Canonical Wnt Signaling Inhibition Induces a Reduction in CSCs Markers Expression and Clonogenic Capacity in Tumor Spheroids

To evaluate whether canonical Wnt pathway inhibition affects the proportion of the CSC subpopulation, we determined the expression of cancer stem cell markers such as CD133 and Lgr5 that increased in spheroid cultures, as described before (Figure 1). We found that the inhibitors Adavivint and 5FU (alone or in combination) induced depletion in CD133 expression without affecting the Lgr5 and CD44v6 levels in SW620 and SW480 spheroids (Figure 7A,B and Figure S1E). Moreover, we measured the levels of Oct4 and Sox2, transcription factors involved in the maintenance of embryonic stem cell phenotype [36]. We observed that Adavivint only reduced the Oct4 levels in SW480 spheroids but decreased the levels of Sox2 in both cell lines (Figure 7C,D and Figure S1E) independent of 5FU treatment and particularly when we used the combined Adavivint + 5FU treatment. Consistent with the reduced expression of some cancer stem markers, we found that combined treatment induced the expression of cytokeratin 20 (CK20) in SW620 spheroids (Figure 7E), a differentiation marker of the intestinal epithelium. However, we detected the opposite effect in SW480 spheroids. Thus, data indicate that Adavivint induced a different degree of response in spheroids of SW480 and SW620, probably due to alternative mechanisms of activation.

Because Adavivint reduced the expression of cancer stem cell markers, we used a clonogenic assay to assess its impact on stemness-relevant phenotypes. We treated spheroids with Adavivint for six days, seeded cells from dissociated spheroids under anchorage-dependent conditions, and fixed colonies after eight days of growth. Adavivint reduced the colony formation efficiency of SW620-derived cells from spheroids and depleted the clonogenic capacity of SW480 cells in contrast to cells derived from control spheroids (Figure S1F). Considering that Adavivint had a pronounced effect on SW480 clonogenicity, we only evaluated Adavivint + 5FU's effect on SW620 clonogenicity. We observed a similar trend when we used Adavivint combined with 5FU, but the clonogenicity reduction did not reach significance compared to 5FU alone ($p = 0.0589$) (Figure 7F). In addition, we seeded cells in low-attachment microplates to evaluate their spheroid-forming capacity after treatment with 5FU alone or in combination with Adavivint. We followed the cultures for up to 40 days when we observed established spheroids. Although we found a depletion in the number of spheroids with the use of both drugs compared to 5FU treatment alone (Figure 7G), we detected an increase in Sox2 levels using the combined treatment, which suggests an increase in proliferation rates, consistent with the emergent survival subpopulation with the ability to form spheroids (Figure 7H).

In brief, our data indicate that canonical Wnt signaling activation is involved in sustaining CSCs resistance to 5FU treatment. However, although the inhibition of the canonical β -catenin signaling also improved the survival of spheroids treated with 5FU, it adversely impacted the stemness phenotype, apparently in dependence on the malignancy grade of cancer cells. Remarkably, we found here that combined treatment with 5FU and Adavivint also induced the survival of a small cell subpopulation, probably through a combined effect on the cell cycle, promoting G0 arrest and G2 phase accumulation. This subpopulation could exit the arrest and re-grow after treatment, suggesting, therefore, that other mechanisms participate in resistance induction to 5FU treatment of CSCs.

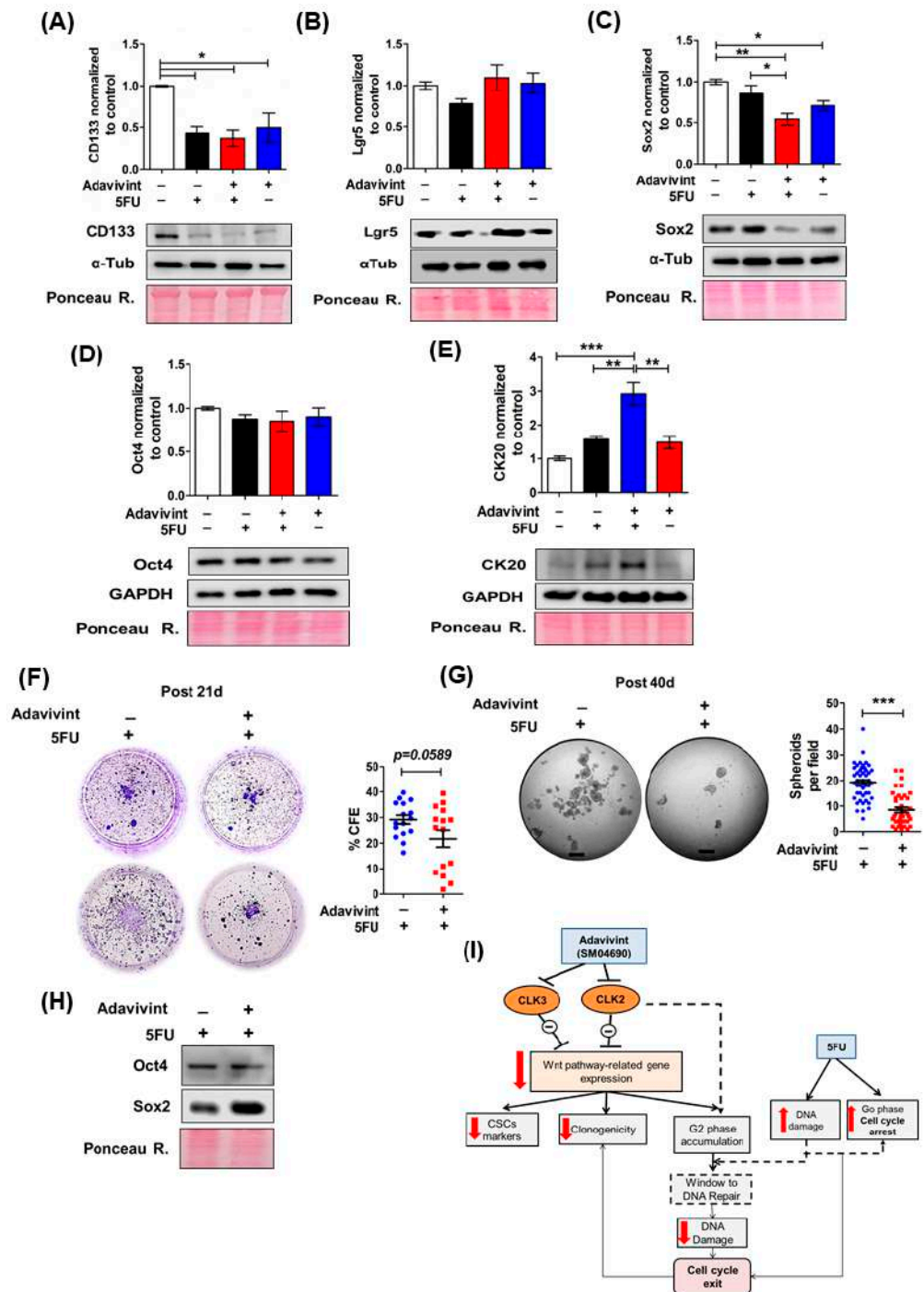


Figure 7. Adavivint Wnt inhibitor reduces clonogenicity and cancer stem-marker expression in SW620 spheroids. (A–D) Representative immunoblots of cancer stem cell markers CD133 (A), Lgr5 (B), Sox2 (C), and Oct4 (D) of SW620 spheroids treated with or without Adavivint for 72 h and subsequently with or without 5FU for 72 h. (E) Representative immunoblot of cytokeratin 20 (CK20) of SW620 spheroids treated as described in (A). Ponceau Red staining for total protein was used as loading control. Quantification of the relative levels of indicated proteins was normalized to control-treated with vehicles of Adavivint and 5FU. Data are represented by the mean \pm SEM of at least three independent tests. The ability to regrowth of SW620 cells from spheroids treated with 5FU alone or in combination with Adavivint was evaluated in anchorage-dependent (F) and independent conditions (G). (F) The clonogenic capacity was evaluated on the 21st-day post-treatment in dependent-anchorage conditions (% CFE, colony formation efficiency). (G) The spheroid-forming capacity was determined by counting spheroids in each field of photographed wells on the 40th day

of post-treatment (free-drug time) (Scale bar: 500 μm) (n: 3). (H) We collected the spheroids established on the 40th day of post-treatment, and levels of Oct4 and Sox2 were determined (n: 1). Ponceau Red staining for total protein was used as loading control * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$. (I) Model of Adavivint's mechanism as a Wnt pathway inhibitor in SW620 spheroids and its effect on 5FU-induced DNA damage. Adavivint inhibits the canonical Wnt pathway by CDC-like kinase (CLK) activity inhibition (CLK2 and CLK3), leading to the formation of unstable transcripts of Wnt pathway-related genes. Canonical Wnt signaling inhibition decreases the expression of CSCs markers (such as Sox2 and CD133) and clonogenic capacity. Adavivint induces G2 phase accumulation, in which cells can repair damaged DNA (endogenous and genotoxic damage caused by 5FU). The balance between Cyclin-CDK complexes and CDK inhibitors at the end of the mitotic phase could be decisive in re-entering the cell cycle after DNA repair. Adavivint reduced c-Myc levels, which suggests a disturbed expression of proteins involved in cell cycle progression. We can rule out the effect of CLK inhibition on other cell signaling pathways. The dotted line depicts the suggested mechanism based on published data.

3. Discussion

Aberrant Wnt signaling is a hallmark of most colorectal cancers. Therefore, targeting the Wnt-signaling pathway has been the focus of cancer research for a long time. The presence of cancer stem cell subpopulations in tumors is the hub of resistance generation. Yet, little is known about the mechanisms that allow CSCs to switch to a latent state in response to stressful environmental conditions, to remain quiescent while retaining their tumor-initiating capacity, and to exit from this state to evolve into aggressive metastasis. Although several Wnt pathway inhibitors have been described with promising efficacy in therapy, how the Wnt pathway is involved in CSCs chemoresistance is not clearly established.

In this work, we investigated the role of the canonical Wnt/ β -catenin pathway in CSCs chemoresistance. We demonstrate that 5FU induces cell death and DNA damage in different grades in the spheroids of the CRC cell lines used. Additionally, 5FU induced the entry to quiescence in a cell subset in spheroids of all cell lines tested, independent of their Wnt signaling status. RKO spheroids exhibited the most responsiveness to 5FU, whereas the metastatic SW620 spheroids exhibited 5FU-chemoresistance, as determined by less cell death and DNA damage at the end of treatment compared with SW480 and RKO spheroids.

Quiescence (G0 phase) is considered a chemoresistance mechanism by which the tumoral cell can evade the cytotoxic action of drugs that target highly proliferating cells [37]. Our data indicate that 5FU treatment induces DNA damage and cell death and, importantly, increases the proportion of CSCs in a quiescent state. However, the capacity of cells to re-grow depends on their ability to exit from quiescence in post-treatment time, resulting in a transient or deep quiescent state. Intrinsic and extrinsic signals are determinants for switching into a proliferating state, such as mitogen levels and the balance between CDK-cyclin complexes and CDK inhibitors (p21, p27, and p57) at the end of the mitotic phase [38,39].

To investigate the role of the canonical Wnt pathway in 5FU-chemoresistance, we used two methodological approaches: (1) Wnt ligand stimulation in RKO spheroids that exhibit normal canonical Wnt signaling to determine whether Wnt signaling activation promotes survival during 5FU treatment. (2) Constitutive active Wnt signaling inhibition in spheroids of cell lines that exhibit aberrant canonical Wnt activation (SW480/SW620). In the first approach, our data clearly showed that canonical Wnt pathway activation, whether induced by ligand (in RKO cells) or already constitutively active (in SW480 and SW620 cells), produced the same effect in colon cancer stem cells: it counteracted the negative effects produced in them by 5-FU. This explains why SW480 and SW620 cells are already resistant to 5-FU and RKO cells are sensitive unless Wnt3a stimulates canonical Wnt in them.

Consistent with our results, several studies have shown that Wnt ligand-dependent β -catenin/TCF activation contributes to chemoresistance through induction of its target

genes such as survivin, ABC transporters, proteins involved in DNA repair, and proteins involved in cell cycle progression [27,40], which allow cells to survive against cytotoxic stress and re-grow once the intrinsic and extrinsic conditions are optimal. In this regard, Cho et al. reported that 5FU promotes stemness in residual tumoral cells through Wnt3a/ β -catenin pathway activation via p53 transcriptional induction in CRC cells harboring wild type p53 [41], resulting in relapse after chemotherapy. Combinatorial treatment with Wnt inhibitor (Porcupine inhibitor) and 5FU abrogated CSCs activation and reduced tumor re-grow during post-treatment (drug free). This evidence, therefore, would be consistent with the hypothesis that canonical Wnt signaling inhibition is a potential therapeutic strategy to inhibit the acquisition of cancer stem phenotype and overcome recurrence after standard chemotherapy. However, contrary to this hypothesis, we found here that the inhibition of the β -catenin transcriptional activity, either mediated by the expression of a dnTCF4, or using the inhibitor Adavivint in combination with 5FU also counteracted the negative effect produced by 5-FU in cell viability, and enhanced survival in SW480 and SW620 spheroids against 5FU-induced damage. However, although the inhibition of the canonical β -catenin signaling improved the survival of spheroids treated with 5FU by decreasing DNA damage and proliferation, it adversely impacted the stemness phenotype through impaired Sox2 and even Oct4 expression, apparently in dependence on the malignancy grade of cancer cells. Remarkably, we found that combined treatment with 5-FU and Adavivint also induced the survival of a small cell subpopulation, probably through a combined effect on the cell cycle, promoting G0 arrest and G2 phase accumulation. This subpopulation persisted after 40 days of culture and remarkably showed an increase in the expression levels of the stem cell marker Sox2, which suggests an increase in proliferation rate, consistent with the emergence of this survival subpopulation with the ability to form spheroids. In agreement with our results, very recently Alvarez-Varela A. and Cañellas-Socias A. from the Eduard Batlle group [42,43] have revealed that drug-tolerant persister colorectal cancer cells that mediate relapse after chemotherapy downregulate the Wnt/stem cell gene program immediately after chemotherapy. Interestingly, while widespread evidence has demonstrated that CRC growth is driven by a subset of LGR5+ stem-cell-like tumor cells, their analyses revealed that high-resistant cancer cells (HRCs) represent a distinct cell population. Their findings revealed that the adaptation of cancer stem cells to suboptimal niche environments protects them from chemotherapy and identifies a candidate cell of origin of relapse after treatment in CRC that they called HRC. Similar findings have been obtained by Wu C. from the Sara M. Weis and David A. Cheresh group, studying how microenvironmental stresses affect tumor initiation and progression of aggressive pancreatic cancer cells [44]. These authors have recently reported that the harsh microenvironments of the body can push certain pancreatic cancer cells to overcome the stress of being isolated and make them more adept at initiating and forming new tumor colonies. And interestingly, they also observed that while tumor-initiating cells or cancer stem cells (TICs) may inherently possess resistance to such stresses, they showed that a few non-TICs might undergo adaptive reprogramming, giving rise to new colonies that will eventually outgrow them.

Regarding the differences observed in some results obtained with the Adavivint compared with the expression of the dnTCF4, we observed that the Adavivint produced a more severe effect on the expression of cell proliferation markers such as p-CDK2 compared to the effect obtained with only the dnTCF4, whose expression did not affect the increase induced by 5FU or the survivin levels. It must be taken into account that Adavivint is a potent inhibitor of canonical Wnt-related gene expression via a β -catenin-independent mechanism, mainly through CLK2 and CLK3 inhibition resulting in unstable transcripts of Wnt-related genes. It reduces not only the expression of Wnt target genes such as c-Myc and survivin but also the expression of Frizzled Wnt receptors, Dvl proteins, and TCF/LEF transcription factors [32,45]. Thus, Adavivint may alter not only the TCF4-mediated gene regulation but also the gene regulation mediated by TCF1 and LEF1, avoiding the compensatory effect that these factors could produce when only the TCF4-mediated transcription is blocked by expressing a dnTCF4. However, because Adavivint can inhibit several other

kinases and CLK is actively involved in pre-mRNA processing, we cannot rule out the impact on other signaling pathways that could explain the overall anti-tumor mechanism of this drug.

In summary, our data indicate that canonical Wnt signaling activation induces CSCs resistance to 5FU treatment, promoting survival in different spheroid cell contexts, which counteracts the negative effects induced by 5FU. However, although the inhibition of the canonical β -catenin signaling also improved the survival of spheroids treated with 5FU, it adversely impacted their stemness phenotype through impaired Sox2 expression and even Oct4 expression, apparently in dependence on the malignancy grade of cancer cells. Remarkably, we also found that combined treatment with 5FU and Adavivint induced cell cycle arrest. Still, a small cell subpopulation persisted, recovered Sox2 expression levels, and began to re-grow after treatment. The mechanisms involved in this CSCs capacity to exit cell cycle arrest and re-grow remain to be elucidated.

4. Materials and Methods

4.1. Reagents and Antibodies

The antibodies used in this study include the following: rabbit anti-phospho-H2AX, rabbit anti-cleaved-PARP, rabbit anti-phospho-CDK2, rabbit anti-p21, rabbit anti-active- β -catenin, rabbit anti-survivin, rabbit anti-TCF1, and rabbit anti-Axin2 were all obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Mouse anti-c-Myc, mouse anti-cyclinD1, mouse anti-Bcl2, mouse anti- β -catenin, rabbit anti-TCF4, mouse anti-Sox2, mouse anti-Oct4, and mouse anti-GAPDH were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Allophycocyanin (APC)-conjugated mouse anti-CD44 were obtained from BD Bioscience. Phycoerythrin (PE)-conjugated mouse anti-CD133, mouse anti-CD44v6, mouse anti-Lgr5, rabbit anti-CD133, and mouse anti-Ki67 were obtained from ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA). APC-Vio770-conjugated mouse anti-Lgr5 was obtained from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). FITC-conjugated goat anti-mouse was obtained from Jackson ImmunoResearch (West Baltimore Pike, PA, USA). Mouse anti- α Tubulin was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Goat anti-mouse and anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase-conjugated were from Pierce (Rockford, IL, USA). AquaZombie dye was obtained from Biolegend (San Diego, CA, USA). 5-fluorouracil (5FU) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Recombinant human Wnt3a and recombinant human Wnt5a ligands were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Adavivint (SM04690) was purchased from Selleckchem (Houston, TX, USA).

4.2. Plasmids

The M50 Super 8x TOPFlash and M51 Super 8x FOPFlash reporter plasmids (Addgene 12456 and 12457) were Randall Moon's gifts. The TOP-GFP-mCherry plasmid used to measure the TOP reporter in spheres was a gift from Ramesh Shivdasani (Addgene 35491). To obtain TOP-GFP reporter cells, lentiviral-transduced cells were cell-single sorted by mCherry fluorescence using the FACsAria sorter and examined for their reporter responsiveness to Wnt ligands (RKO^{TOP-GFP} reporter cells) or their constitutive activity (SW480^{TOP-GFP} reporter cells). The plasmid encoding human dominant-negative TCF4 (dnTCF4) [pPGS dnTcf-4(deltaN41)] was a gift from Eric Fearon (Addgene plasmid 19284).

4.3. Cell Lines

All cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). They were authenticated in June 2018 by Short Tandem Repeat DNA profiling analysis performed at the Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) in Mexico City. We used the human RKO and SW480 cell lines isolated from primary cancer, whereas the SW620 cell line was derived from a lymph node metastasis from the same patient that the SW480 cell line was derived from. The RKO cell line is a prototype of BRAF-driven colon cancer cells that express wild-type p53 and exhibit highly inducible canonical Wnt signaling with no basal activation. SW480 and SW620 cell lines are the prototypes of

KRAS-driven cancer cells. They express KRAS and p53 mutated proteins (TP53 R273H, KRAS G12V) and display constitutive active canonical Wnt signaling because they express a truncated APC protein [46].

4.4. Cell Culture

Monolayer cultures (2D cultures): The RKO cell line was maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 2mM L-glutamine, with antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 25 µg/mL amphotericin). SW480 and SW620 cells were maintained in DMEM F-12 supplemented with 5% FBS and 2 mM L-glutamine with antibiotics and amphotericin. All cell lines were cultured at 37 °C in an atmosphere of 95% humidity and 5% CO₂.

Spheroid cultures (3D cultures): cells from monolayer cultures were dissociated with trypsin, counted, and seeded at 1×10^3 cells/mL in serum-free medium containing DMEM F-12 supplemented with 1X B27 and 20 ng/mL EGF with antibiotics (100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10 µg/mL gentamicin, and 25 µg/mL amphotericin) in low-attachment plates to form first-generation spheroids. Fresh medium was added each fourth day. To sequential passages, established spheroids, from the 11th day of culture, were collected and dissociated to single cells using 1X TrypLETM Express (Gibco, Waltham, MA, USA) according to manufacturer instructions. Experimental treatments were performed on second-generation spheroids (2G). Spheroid-forming efficiency was measured by counting the number of colonies on the 7th day of the spheroid-forming culture.

4.5. Cell Viability

To evaluate the effect of 5FU on the viability of CRC tumor spheres, cells from first-generation CRC spheres were seeded at 1×10^3 cells in 96-well low-attachment plates. On the 11th day of forming spheres, they were treated with different concentrations of 5FU (vehicle, 10, 100, 500, 1000, 2500, and 5000 µM) for up to 72 h. Cell viability was assayed using the CellTiter-Glo 3D Cell Viability Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions, and luminescence was measured using a multimode microplate reader.

4.6. 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 protease and phosphatase inhibitors) for at least 1 h at 4 °C. After centrifugation ($15,000 \times g$ for 10 min), lysates were collected and stored at 70 °C until analysis. Proteins were separated by 8.5, 10, or 13.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The membranes were blocked with 50 mg/mL nonfat dry milk or 3% BSA in Tris-buffered saline for 1 h and incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibodies. The membranes were incubated with the corresponding horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody for 2 h at room temperature. Detection was achieved using the SuperSignal Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) in the C-DiGit Blot scanner (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) and analyzed by Image StudioTM Lite v5.2 Software (LI-COR Biosciences). GAPDH, α -tubulin, or Ponceau Red stain for total protein were used as loading controls.

4.7. Flow Cytometry and Cell Cycle Analysis

For cell surface protein staining, dissociated cells were collected by centrifugation at $5000 \times g$ and incubated with the Aqua Zombie dye (non-permeant to live cells) for 30 min at room temperature in darkness to exclude dead cells during data analysis. Then, the cell pellet was washed with PBS and incubated with anti-CD44-APC-coupled (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), anti-CD133-PE-coupled (eBioscience, San Diego, CA, USA), or anti-Lgr5-APC-Vio770-coupled (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany) antibodies for 30 min at 4 °C in darkness. CD44v6-surface detection was performed by incubating with anti-

CD44v6 primary antibody (eBioscience) for 30 min at 4 °C. The cell pellet was washed with PBS, followed by incubation with FITC-coupled anti-mouse secondary antibody for 30 min at 4 °C in darkness. Samples were acquired on an Attune NXT cytometer.

For cell cycle analysis, resting/quiescent cell populations (Go phase) discrimination and quantification of cell cycle distribution were performed by simultaneous analysis of Ki67 (proliferation marker) and cellular DNA content. Dissociated cells were permeabilized with 70% ice-cold ethanol and stained with anti-Ki67 for 30 min at room temperature. After incubation with FITC-coupled anti-mouse secondary antibody, cells were washed with PBS and incubated with RNase (100 µg/mL) and propidium iodide (20 µg/mL) for 20 min at room temperature in darkness. Cells stained with the secondary antibody alone were used as a negative control. Samples were analyzed on an Attune NXT cytometer. All data obtained were analyzed by FlowJo v10 software (BD, Ashland, OR, USA).

4.8. Anchorage-Dependent and-Independent Growth

Cells from first-generation spheroids were seeded to 1×10^3 cells/mL in low-attachment plates to form second-generation spheroids. On the 11th day of sphere forming, spheroids were treated with a single dose of 5FU or vehicle for 72 h. On the 14th day, the spheroids were dissociated into single cells and seeded at 5000 cells/mL in low-attachment plates and in TC-treated microplates to determine the independent and anchorage-dependent re-grow abilities post-5FU treatment, respectively.

Cells in low-adherence cultures were maintained in a sphere-growth medium (serum-free) for up to 21 days. On the 21st day, cells were collected, dissociated, and viable cell proportion was measured using Aqua zombie dye (non-permeant to live cells). Furthermore, cells that grew under anchorage-dependent conditions were fixed in cold-methanol and stained with crystal violet at the 7, 14, and 21 days of incubation to follow the ability to grow post-5FU treatment. The colony formation efficiency (% CFE) was determined by counting colonies using ImageJ software (version 1.53a obtained from the National Institutes of Health website, <http://imagej.nih.gov/ij/>).

4.9. TOP Reporter Gene Assay

Cells were seeded in 96-well plates at a density of 2.5×10^4 cells per well. At 24 h after seeding, cells were placed in a serum-free medium and transfected with 200 ng of the reporter plasmid (M50 Super 8x TOPFlash) or control plasmid (Super 8x FOPflash) with 20 ng of the pRL luciferase plasmid (transfection control). The reporter activity in the cell lysates was measured 30 h after transfection using the Dual-Luciferase Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA), and the activity was normalized with respect to Renilla luciferase activity.

To assess the β -catenin transcriptional activity in spheroids, transduced cells with TOP-GFP-mCherry plasmid previously sorted were seeded to form spheroids in low-attachment plates. Spheroids stimulated or unstimulated were dissociated, and the reporter activity was analyzed by flow cytometry.

4.10. Wnt Pathway Inhibition

SW480 and SW620 cell lines that exhibit constitutively active Wnt signaling were treated with different concentrations of Adavivint (0.03, 0.1, and 1 µM) for 48 h in monolayer cultures or 72 h in spheroids on the 9th day of culture.

Additionally, the inhibition of the canonical Wnt pathway was performed by the expression of dnTCF4 in the SW620 cell line. Cells were transfected with pPGS/ dnTcf-4(deltaN41) plasmid, and after 48 h post-transfection, cells were selected with the G418 antibiotic for 15 days. Subsequently, a TOP reporter assay was performed in clones to survive the selection process. Cells transfected with an empty pCDNA3 vector coding for the resistance gene to the G418 antibiotic were used as control cells.

4.11. Statistical Analysis

All data is represented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) of at least three independent experiments. Comparative analysis between the two groups was performed by Student's *t*-test. Multiple comparisons between three or more groups were performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple comparison test. A *p*-value of *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24065252/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, M.R.-F. and A.P.M.-L.; formal analysis, A.P.M.-L. and M.R.-F.; funding acquisition, M.R.-F. and M.M.-S.; investigation, A.P.M.-L., M.C.C.-P., M.A.S.-S., M.M.-S. and M.R.-F.; methodology, A.P.M.-L., M.C.C.-P. and M.A.S.-S.; project administration, M.R.-F.; resources, M.R.-F. and M.M.-S.; software, A.P.M.-L. and M.A.S.-S.; supervision, M.R.-F.; validation, A.P.M.-L., M.A.S.-S., M.C.C.-P. and M.R.-F.; visualization A.P.M.-L. and M.A.S.-S.; writing—original draft, A.P.M.-L. and M.R.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

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

Institutional Review Board Statement: This work has been conducted following the ethical standards according to the Declaration of Helsinki and according to national and international guidelines and has been approved by the Faculty of Medicine Ethical Committee at the Universidad Nacional Autónoma de México (in accordance to the Mexican Social Norm NOM-062-ZOO-1999).

Data Availability Statement: The data are available with this article.

Acknowledgments: Angela Patricia Moreno-Londoño is a student in the program “Doctorado en Ciencias Bioquímicas” “Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)”, and was granted with a Fellowship by CONACYT and DGAPA-UNAM (IV200220). We want to thank the LABNALCIT-UNAM technical support in the sorting samples and Eduardo Alvarado Ortiz for his technical assistance during the transduction of CRC cells.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- de Gramont, A.; Hubbard, J.; Shi, Q.; O'Connell, M.J.; Buyse, M.; Benedetti, J.; Bot, B.; O'Callaghan, C.; Yothers, G.; Goldberg, R.M.; et al. Association between disease-free survival and overall survival when survival is prolonged after recurrence in patients receiving cytotoxic adjuvant therapy for colon cancer: Simulations based on the 20,800 patient ACCENT data set. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 460–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Corvaisier, M.; Bauzone, M.; Corfiotti, F.; Renaud, F.; El Amrani, M.; Monté, D.; Truant, S.; Leteurtre, E.; Formstecher, P.; Van Seuning, I.; et al. Regulation of cellular quiescence by YAP/TAZ and Cyclin E1 in colon cancer cells: Implication in chemoresistance and cancer relapse. *Oncotarget* **2016**, *7*, 56699–56712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Glatz, T.; Verst, R.; Kuvendjiska, J.; Bronsert, P.; Becker, H.; Hoepfner, J.; Kulemann, B. Pattern of Recurrence and Patient Survival after Perioperative Chemotherapy with 5FU, Leucovorin, Oxaliplatin and Docetaxel (FLOT) for Locally Advanced Esophagogastric Adenocarcinoma in Patients Treated Outside Clinical Trials. *J. Clin. Med.* **2010**, *9*, 2654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Touil, Y.; Igoudjil, W.; Corvaisier, M.; Dessein, A.F.; Vandomme, J.; Monté, D.; Stechly, L.; Skrypek, N.; Langlois, C.; Gard, G.; et al. Colon cancer cells escape 5FU chemotherapy-induced cell death by entering stemness and quiescence associated with the c-Yes/YAP axis. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 837–846. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Blondy, S.; David, V.; Verdier, M.; Mathonnet, M.; Perraud, A.; Christou, N. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes. *Cancer Sci.* **2020**, *9*, 3142–3154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Walcher, L.; Kistenmacher, A.K.; Suo, H.; Kitte, R.; Dluczek, S.; Strauß, A.; Blanduszun, A.; Yevsa, T.; Fricke, S.; Kossatz-Boehlert, U. Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- García-Mayea, Y.; Mir, C.; Masson, F.; Paciucci, R.; Lleonart, M.E. Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *60*, 166–180. [[CrossRef](#)]
- Ring, A.; Kim, Y.M.; Kahn, M. Wnt/catenin signaling in adult stem cell physiology and disease. *Stem Cell Rev. Rep.* **2014**, *10*, 512–525. [[CrossRef](#)]
- Vermeulen, L.; De Sousa, E.; Melo, F.; van der Heijden, M.; Cameron, K.; de Jong, J.H.; Borovski, T.; Tuynman, J.B.; Todaro, M.; Merz, C.; et al. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 468–476. [[CrossRef](#)]

10. 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. [[CrossRef](#)]
11. Zhang, Y.; Wang, X. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *J. Hematol. Oncol.* **2010**, *13*, 165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Martin-Orozco, E.; Sanchez-Fernandez, A.; Ortiz-Parra, I.; Ayala-San Nicolas, M. WNT Signaling in Tumors: The Way to Evade Drugs and Immunity. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zhong, Z.; Virshup, D.M. Wnt signaling and drug resistance in cancer. *Mol. Pharmacol.* **2019**, *97*, 72–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Sukach, A.N.; Ivanov, E.N. Formation of spherical colonies as a property of stem cells. *Tsitologiya* **2007**, *49*, 916–922. [[CrossRef](#)]
15. Pastrana, E.; Silva-Vargas, V.; Doetsch, F. Eyes wide open: A critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 486–498. [[CrossRef](#)]
16. Qureshi-Baig, K.; Ullmann, P.; Rodriguez, F.; Frasilho, S.; Nazarov, P.V.; Haan, S.; Letellier, E. What Do We Learn from Spheroid Culture Systems? Insights from Tumorspheres Derived from Primary Colon Cancer Tissue. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0146052. [[CrossRef](#)]
17. Vermeulen, L.; Todaro, M.; de Sousa Mello, F.; Sprick, M.R.; Kemper, K.; Perez Alea, M.; Richel, D.J.; Stassi, G.; Medema, J.P. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 13427–13432. [[CrossRef](#)]
18. Ricci-Vitiani, L.; Lombardi, D.G.; Pilozzi, E.; Biffoni, M.; Todaro, M.; Peschle, C.; De Maria, R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **2007**, *445*, 111–115. [[CrossRef](#)]
19. 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*, 1033–1043. [[CrossRef](#)]
20. Taniguchi, H.; Moriya, C.; Igarashi, H.; Saitoh, A.; Yamamoto, H.; Adachi, Y.; Imai, K. Cancer stem cells in human gastrointestinal cancer. *Cancer Sci.* **2016**, *107*, 1556–1562. [[CrossRef](#)]
21. Merlos-Suárez, A.; Barriga, F.M.; Jung, P.; Iglesias, M.; Céspedes, M.V.; Rossell, D.; Sevillano, M.; Hernando-Momblona, X.; da Silva-Diz, V.; Muñoz, P.; et al. The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 511–524. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Shimokawa, M.; Ohta, Y.; Nishikori, S.; Matano, M.; Takano, A.; Fujii, M.; Date, S.; Sugimoto, S.; Kanai, T.; Sato, T. Visualization and targeting of LGR5⁺ human colon cancer stem cells. *Nature* **2017**, *545*, 187–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Todaro, M.; Gaggianesi, M.; Catalano, V.; Benfante, A.; Iovino, F.; Biffoni, M.; Apuzzo, T.; Sperduti, I.; Volpe, S.; Cocorullo, G.; et al. CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. *Cell Stem Cell* **2014**, *14*, 342–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Morgan, R.G.; Molnár, E.; Jones, R.F.; Collard, T.J.; Lane, J.D.; Greenhough, A.; Paraskeva, C.; Williams, A.C. Nutrient stress alters the glycosylation status of LGR5 resulting in reduced protein stability and membrane localisation in colorectal tumour cells: Implications for targeting cancer stem cells. *Br. J. Cancer* **2015**, *112*, 714–719. [[CrossRef](#)]
25. Barzegar Behrooz, A.; Syahir, A.; Ahmad, S. CD133: Beyond a cancer stem cell biomarker. *J. Drug Target* **2019**, *27*, 257–269. [[CrossRef](#)]
26. Kawai, S.; Yamazaki, M.; Shibuya, K.; Yamazaki, M.; Fujii, E.; Nakano, K.; Suzuki, M. Three-dimensional culture models mimic colon cancer heterogeneity induced by different microenvironments. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3156. [[CrossRef](#)]
27. Yuan, S.; Tao, F.; Zhang, X.; Zhang, Y.; Sun, X.; Wu, D. Role of Wnt/ β -Catenin Signaling in the Chemoresistance Modulation of Colorectal Cancer. *Biomed. Res. Int.* **2020**, *2020*, 9390878. [[CrossRef](#)]
28. Flores-Hernández, E.; Velázquez, D.M.; Castañeda-Patlán, M.C.; Fuentes-García, G.; Fonseca-Camarillo, G.; Yamamoto-Furusho, J.K.; Romero-Avila, M.T.; García-Sáinz, J.A.; Robles-Flores, M. Canonical and non-canonical Wnt signaling are simultaneously activated by Wnts in colon cancer cells. *Cell Signal.* **2020**, *72*, 109636. [[CrossRef](#)]
29. Karpurapu, M.; Wang, D.; Van Quyen, D.; Kim, T.K.; Kundumani-Sridharan, V.; Pulusani, S.; Rao, G.N. Cyclin D1 is a bona fide target gene of NFATc1 and is sufficient in the mediation of injury-induced vascular wall remodeling. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 3510–3523. [[CrossRef](#)]
30. Mognol, G.P.; de Araujo-Souza, P.S.; Robbs, B.K.; Teixeira, L.K.; Viola, J.P. Transcriptional regulation of the c-Myc promoter by NFAT1 involves negative and positive NFAT-responsive elements. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 1014–1028. [[CrossRef](#)]
31. Hrckulak, D.; Janeckova, L.; Lanikova, L.; Kriz, V.; Horazna, M.; Babosova, O.; Vojtechova, M.; Galuskova, K.; Sloncova, E.; Korinek, V. Wnt Effector TCF4 is Dispensable for Wnt Signaling in Human Cancer Cells. *Genes* **2018**, *1*, 439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Deshmukh, V.; Hu, H.; Barroga, C.; Bossard, C.; Kc, S.; Dellamary, L.; Stewart, J.; Chiu, K.; Ibanez, M.; Pedraza, M.; et al. A small-molecule inhibitor of the Wnt pathway (SM04690) as a potential disease modifying agent for the treatment of osteoarthritis of the knee. *Osteoarthr. Cartil.* **2018**, *26*, 18–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hirose, Y.; Berger, M.S.; Pieper, R.O. Abrogation of the Chk1-mediated G(2) checkpoint pathway potentiates temozolomide-induced toxicity in a p53-independent manner in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 5843–5849. [[PubMed](#)]
34. Barnaba, N.; LaRocque, J.R. Targeting cell cycle regulation via the G2-M checkpoint for synthetic lethality in melanoma. *Cell Cycle* **2021**, *20*, 1041–1051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Vlatkovic, T.; Veldwijk, M.R.; Giordano, F.A.; Herskind, C. Targeting Cell Cycle Checkpoint Kinases to Overcome Intrinsic Radioresistance in Brain Tumor Cells. *Cancers* **2022**, *14*, 701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Boyer, L.A.; Lee, T.I.; Cole, M.F.; Johnstone, S.E.; Levine, S.S.; Zucker, J.P.; Guenther, M.G.; Kumar, R.M.; Murray, H.L.; Jenner, R.G.; et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **2005**, *122*, 947–956. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Arora, M.; Spencer, S.L. A Cell-Cycle “Safe Space” for Surviving Chemotherapy. *Cell Syst.* **2017**, *5*, 161–162. [[CrossRef](#)]
38. Spencer, S.L.; Cappell, S.D.; Tsai, F.C.; Overton, K.W.; Wang, C.L.; Meyer, T. The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit. *Cell* **2013**, *155*, 369–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Chen, J.Y.; Lin, J.R.; Tsai, F.C.; Meyer, T. Dosage of Dyrk1a shifts cells within a p21-cyclin D1 signaling map to control the decision to enter the cell cycle. *Mol. Cell* **2013**, *52*, 87–100. [[CrossRef](#)]
40. Wickström, M.; Dyberg, C.; Milosevic, J.; Einvik, C.; Calero, R.; Sveinbjörnsson, B.; Sandén, E.; Darabi, A.; Siesjö, P.; Kool, M.; et al. Wnt/ β -catenin pathway regulates MGMT gene expression in cancer and inhibition of Wnt signalling prevents chemoresistance. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8904. [[CrossRef](#)]
41. Cho, Y.H.; Ro, E.J.; Yoon, J.S.; Mizutani, T.; Kang, D.W.; Park, J.C.; Il Kim, T.; Clevers, H.; Choi, K.Y. 5FU promotes stemness of colorectal cancer via p53-mediated WNT/ β -catenin pathway activation. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Álvarez-Varela, A.; Novellasdemunt, L.; Barriga, F.M.; Hernando-Momblona, X.; Cañellas-Socias, A.; Cano-Crespo, S.; Sevillano, M.; Cortina, C.; Stork, D.; Morral, C.; et al. Mex3a marks drug-tolerant persister colorectal cancer cells that mediate relapse after chemotherapy. *Nat. Cancer* **2022**, *3*, 1052–1070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Cañellas-Socias, A.; Cortina, C.; Hernando-Momblona, X.; Palomo-Ponce, S.; Mulholland, E.J.; Turon, G.; Mateo, L.; Conti, S.; Roman, O.; Sevillano, M.; et al. Metastatic recurrence in colorectal cancer arises from residual EMP1+ cells. *Nature* **2022**, *611*, 602–613. [[CrossRef](#)]
44. Wu, C.; Rakhshandehroo, T.; Wettersten, H.I.; Campos, A.; von Schalscha, T.; Jain, S.; Yu, Z.; Tan, J.; Mose, E.; Childers, B.G.; et al. Pancreatic cancer cells upregulate LPAR4 in response to isolation stress to promote an ECM-enriched niche and support tumour initiation. *Nat. Cell Biol.* **2023**, *25*, 309–322. [[CrossRef](#)]
45. Tam, B.Y.; Chiu, K.; Chung, H.; Bossard, C.; Nguyen, J.D.; Creger, E.; Eastman, B.W.; Mak, C.C.; Ibanez, M.; Ghias, A.; et al. The CLK inhibitor SM08502 induces anti-tumor activity and reduces Wnt pathway gene expression in gastrointestinal cancer models. *Cancer Lett.* **2020**, *473*, 186–197. [[CrossRef](#)]
46. Ahmed, D.; Eide, P.W.; Eilertsen, I.A.; Danielsen, S.A.; Eknæs, M.; Hektoen, M.; Lind, G.E.; Lothe, R.A. Epigenetic and Genetic Features of 24 Colon Cancer Cell Lines. *Oncogenesis* **2013**, *2*, e71. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Functional Roles of CD133: More than Stemness Associated Factor Regulated by the Microenvironment

Angela Patricia Moreno-Londoño¹ · Martha Robles-Flores¹

Accepted: 19 October 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

CD133 protein has been one of the most used surface markers to select and identify cancer cells with stem-like features. However, its expression is not restricted to tumoral cells; it is also expressed in differentiated cells and stem/progenitor cells in various normal tissues. CD133 participates in several cellular processes, in part orchestrating signal transduction of essential pathways that frequently are dysregulated in cancer, such as PI3K/Akt signaling and the Wnt/ β -catenin pathway. CD133 expression correlates with enhanced cell self-renewal, migration, invasion, and survival under stress conditions in cancer. Aside from the intrinsic cell mechanisms that regulate CD133 expression in each cellular type, extrinsic factors from the surrounding niche can also impact CD33 levels. The enhanced CD133 expression in cells can confer adaptive advantages by amplifying the activation of a specific signaling pathway in a context-dependent manner. In this review, we do not only describe the CD133 physiological functions known so far, but importantly, we analyze how the microenvironment changes impact the regulation of CD133 functions emphasizing its value as a marker of cell adaptability beyond a cancer-stem cell marker.

Keywords Cancer stem cell · Stemness associated markers · CD133 · Tumor microenvironment

Introduction

One of the primary methodologies employed to identify and select cancer stem-like cells is the utilization of cell surface markers, with CD133 emerging as one of the most robust markers across different cancer types. CD133⁺ cells demonstrate enhanced clonogenic capacity, particularly under anchorage-independent conditions, as well as tumor-initiating potential and resistance to chemotherapy compared to their CD133-negative counterparts within tumor. Moreover, CD133 expression has been linked to the co-expression of pluripotent genes, including Oct4, Sox2, Nanog, and c-Myc, which govern differentiation and self-renewal in pluripotent stem cells. This association has been correlated with long-term self-renewal and the ability of tumors to repopulate in a fraction of tumor samples [1]. Interestingly, the loss of CD133 in embryonic cells does not affect the expression of

pluripotency genes or their capacity to differentiate into the three germ layers. Instead, it adversely impacts proliferation rates and the ability to evade apoptosis, according to findings from various studies on tumor cells. CD133 deficiency disrupts the coordinated regulation of key signaling pathways involved in tumorigenesis and apoptotic resistance, such as PI3K/Akt, WNT, AMPK, and P53 [2]. Similar outcomes have been observed in some cancer types [3, 4]

CD133 facilitates the establishment of signaling platforms at the plasma membrane by recruiting proteins involved in cytoskeleton rearrangement, protein trafficking, and signal transduction. These platforms are essential for regulating protrusion architecture, ciliary dynamics and activating signaling pathways that control cell proliferation, differentiation, migration, and cell survival. It is important to note that CD133 expression is not limited to the cell surface of cancer stem-like cells, suggesting a broader biological function in various cellular contexts. Moreover, the levels of CD133 are dynamic and can be enhanced or restricted depending on the cellular context, intrinsic state, and external stimuli from the surrounding niche. Its expression and processing can fluctuate throughout the cell cycle in different cell types [5, 6], increase under hypoxic conditions,

✉ Martha Robles-Flores
rmartha@unam.mx

¹ Department of Biochemistry, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 04510 Mexico City, Mexico

or be repressed or enhanced in response to nutritional and cytotoxic stress.

In this review, we provide a comprehensive summary of our current knowledge regarding CD133's structure, post-translational modifications, and their impact on its function, subcellular localization, and protein stability. Additionally, we focus on how CD133 is regulated by changes in the tumor microenvironment, including oxygen levels, the extracellular matrix, tumor-associated cells, and chemotherapy, as drugs can impact the entire tumor microenvironment.

CD133: Structure, Localization, and Posttranslational Modifications

CD133 (also called Prominin-1) is a pentaspan transmembrane glycoprotein widely used for stem and progenitor cell identification in several normal tissues and cancer stem-like cells of different types of cancer. CD133 is primarily associated with lipid rafts in the plasma membrane, forming part of a protein complex that regulates the structure and dynamics of protrusions (microvilli and primary cilia) [7–9]. Besides its cell surface localization, CD133 has also been found in the cytoplasm associated with endosomes as part of a cellular mechanism for recycling surface proteins and transporting them to other subcellular compartments. For example, in neuroblastoma, CD133 has been observed at the peri-centrosome region [10] and the nuclei in other cancers, such as rhabdomyosarcoma, hepatocarcinoma, breast cancer, non-small lung cancer, and colon-rectal cancer [11–15]. In addition, Rossi et al. (2019) reported that non-tumoral cells, such as endothelial colony-forming cells (ECFCs), characterized by lacking CD133 in their cell surface, exhibit CD133 intracellular expression, which was associated with revascularization potential after hind limb ischemia in contrast to mature endothelial cells [16]. The cytoplasmic and nuclear levels of CD133 have been associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer and hepatocellular carcinoma [13, 14, 17], but further investigation is needed to understand its role in these subcellular compartments. Additionally, CD133 is secreted by cells in extracellular microvesicles and could potentially influence acceptor cells' phenotype and cellular state [18]. The different subcellular pools of CD133 could participate in specific biological processes such as proliferation, migration, autophagy, and chemoresistance in a cell context-dependent manner.

CD133 consist of five transmembrane domains, two extracellular loops susceptible to glycosylation, two smaller intracellular loops rich in cysteine, and a C-terminal domain. Mammals have at least 12 identified transcript variants of CD133, six of which differ in their C-terminal domain, potentially leading to interactions with different proteins and downstream signaling cascades [19]. While

the C-terminal domain and its posttranslational modifications are crucial for the biological function and specificity of CD133 as a scaffold protein, posttranslational modifications in the extracellular domain are involved in CD133 cellular localization and stability.

Among the possible posttranslational modifications of CD133, N-glycosylation plays a critical role in protein folding, molecular trafficking, protein function, and protein stability. CD133 has nine predicted N-glycosylation sites [20], and although the loss of single-N-glycosylation site does not affect CD133 levels or delivery to the plasma membrane, the deficiency of all glycosylation sites impairs cell surface localization and results in endoplasmic reticulum (ER) retention, likely due to improper protein folding [20, 21]. Furthermore, differential glycosylation of CD133 has been associated with cell differentiation rather than decreasing total protein, mRNA levels, or intracellular retention [22]. Different classes of N-glycans attached to the protein can modify its conformation, solubility, antigenicity, activity, recognition by glycan-binding proteins, and susceptibility to proteases [23]. This suggests that differential N-glycosylation of CD133 extracellular domain among tumor sub-populations may be related to specific functions, subcellular localization, and turnover. In line with this, Wei et al. (2022) reported that CD133 C-terminal domain interaction with DNMT1 (DNA methyltransferase 1) depends on CD133 glycosylation status in glioma stem-like cells (GSCs) [24]. High-mannose CD133 maintains GSCs in a slow-cycling state (quiescence) by blocking DNMT1 nuclear translocation. In contrast, induction of complex CD133 N-glycans through MAN1A (Mannosyl-oligosaccharide 1,2- α -mannosidase IA) ectopic expression promotes DNMT1 nuclear translocation and impairs long-term self-renewal and tumorigenesis [24]. The mechanism by which high-mannose N-glycan of CD133 regulates its interaction with DNMT1 remains unclear.

In addition, Liu et al. (2015) found that N-glycosylation at Asn548 of CD133 appears to mediate its interaction with β -catenin and downstream signaling. Mutation of the N-glycosylation at Asn548 reduced CD133- β -catenin interaction, β -catenin levels, and β -catenin signaling in hepatocellular cancer cell lines [20]. However, it is not specified whether the interaction is direct or mediated by other proteins such as HDAC6 (histone deacetylase 6). CD133 can associate with HDAC6 and β -catenin in a ternary complex that regulates the β -catenin stability, resulting in increased β -catenin co-transcriptional activity in ovarian and CRC cancer cell lines [25]. Interestingly Mak et al. (2012) showed that β -catenin interacts exclusively with a lower-molecular-weight form of CD133 and not with CD133 complex-glycans [25]. These findings suggest that N-glycosylation of one or more Asp residues and the type of glycans attached to the CD133

extracellular domain could alter the protein conformation and confers specificity to its intracellular domain, but further investigation is required.

Regulation of CD133 Stability

In addition to glycosylation, there is evidence that CD133 can suffer other post-translational modifications, such as acetylation and sialylation on its extracellular domain. Acetylation of lysine residues (K216, K248, and K255) in the first extracellular loop of CD133 is involved in trafficking from the ER/Golgi to the plasma membrane but also ensures proper protein folding and maturation of the nascent protein [26]. Mak et al. (2014) reported that acetylation disruption in the ER lumen with CD133-K-to-R mutants and ATase1/2 (ER-based acetyltransferases) knockdown severely reduced CD133 surface localization and protein levels [27]. However, it is unclear whether CD133 lysine acetylation in the ER lumen is only a transient event to mark correct protein folding allowing the protein to move along the Golgi apparatus, where it could be deacetylated and complete its maturation. On the other hand, sialylation terminal modification of CD133 N-glycans contributes to protein stability, allowing CD133 to avoid lysosomal degradation [28]. However, it is also unclear how sialylation protects CD133 from degradation and how it could support CD133 function, considering that sialylation of glycoproteins could mediate cell–cell interaction, ECM-interaction, ligand-receptor interaction, and intracellular downstream signaling in several biological processes [29, 30].

Mak et al. (2012) reported that the CD133 protein is endocytosed and degraded via the lysosomal pathway when CD133-HDAC6 interaction is inhibited [25]. But, given that the CD133 intracellular domain does not seem to be an HDAC6 target, and even so, its deacetylase activity is required to maintain CD133 stability, these data suggest the existence of an intermediary protein, an HDAC6 target involved in CD133 regulation on the cell surface in CRC. Gao et al. (2010) found that HDAC6 regulates microtubule-dependent EGFR-endocytic trafficking and degradation through tubulin deacetylation. HDAC6 deficiency induces microtubule hyperacetylation, and consequently, the delivery of EGFR-containing endosomes to the lysosomal compartment is accelerated [31]. Also, HDAC6 could mediate pERK-microtubules association essential to maintain ERK activity and lung cancer cell proliferation via α -tubulin deacetylation [32]. These data suggest that HDAC6 might modulate CD133 association with microtubules close to the cell surface, CD133 endocytic traffic, and subsequent degradation, and even the duration of endosomal CD133-mediated signaling.

Aside from the cell's intrinsic state and cell-autonomous features that can regulate CD133 expression, changes in the

niche, such as oxygen concentration, glucose, and lactate levels, can modulate CD133 levels. For instance, CD133 stability is regulated in hypoxia by GLT8D1 (Glycosyltransferase 8 Domain Containing 1), a transmembrane glycosyltransferase highly expressed under hypoxia by the HIF1 α transcription factor [33]. GLT8D1 co-localizes with CD133 in microvilli of glioma stem-like cells, where it glycosylates CD133, hindering its degradation via the endosomal-lysosomal pathway. Also, Liu K et al. (2022) reported that GLT8D1 mutant with glycosyl transferase activity deficiency can partially rescue GLT8D1 depletion-induced CD133 degradation, suggesting that even GLT8D1 physical association with CD133 irrespectively of its activity, decreases CD133 degradation.

Regardless of oxygen levels, cancer cells have an increased glycolytic metabolism compared to normal cells, which favors proliferation and cell survival. Indeed, cancer-stem-like cells (CSCs) of different types of tumors exhibit a higher expression of glycolytic enzymes resulting in enhanced glycolysis compared to more differentiated cancer cells. Some of these enzymes even can participate in other tumoral functions, including cell cycle progression, tumor immune evasion, stemness, and epigenetic regulation [34, 35]. Recently Wang et al. (2022) demonstrated that HK2 (hexokinase 2) enzyme modulates the CD133 stability through direct binding without subverting CD133 mRNA [36]. Its interaction promotes the recruitment of deubiquitinase ubiquitin-specific protease 11 (USP11), which inhibits CD133 polyubiquitination and its proteasomal degradation in small cell lung cancer (SCLC). By contrast, differentiated SCLC cells showed a lower CD133-USP11 interaction than CSCs, which indicates another CD133 differential regulation between intratumoral subpopulations apart from gene and epigenetic regulation. As well, PFKFB (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3), a key glycolytic enzyme, has been reported to maintain CD133 expression, promote cell cycle progression, cancer stemness, and apoptosis evasion in some cancers via dependent and independent way of its glycolytic activity [37–39]. Lactate, as a subproduct of glycolysis, contributes to enhancing CD133 levels in hepatocellular cancer [40], oral squamous cell carcinoma [41] and colorectal carcinoma cells [42]. High glycolytic cells in the tumor release lactate to the extracellular space, which can be taken by neighbored tumoral or stromal cells through mono-carboxylic acid transporters (MCTs). Lactate conversion into pyruvate in tumoral cells supplies mitochondrial oxidative phosphorylation, serving as an energy source but also as a metabolite that can influence upstream signal activation directly or indirectly through ROS generation, histone lactylation and histone acetylation that could regulate expression of pluripotent genes such as Oct4, Sox2, c-Myc, and also could improve CD133 transcription and acquisition of cancer-stem like features [43].

CD133 Epigenetic Regulation

CD133 protein is coding by the PROM1 gene, whose expression is controlled by at least six alternative promoters in a tissue-dependent manner, three of which include several CpG sites highly susceptible to methylation. In vitro methylation of P1, P2, and P3 promoters suppresses their activity [44–46], indicating that promoter methylation status is associated with the regulation of CD133 expression. The hypomethylation state of these promoters (P1, P2, and P3) has been positively correlated with increased expression of CD133 in several cancers [47–50]. The DNA methylation status can change in dependence on the surrounding niche. For instance, TGF β and BMP proteins, members of the TGF β family secreted by tumoral cells or/ and other cells present in the tumor, have bivalent functions depending on the type of cancer and progression stage, displaying tumor suppressor or oncogenic role. In glioblastoma, whereas TGF β promotes the growth and maintenance of cancer-like stem phenotype, BMP proteins induce differentiation and apoptosis [51]. Both types of proteins regulate CD133 expression, a robust marker of glioma-initiating cells. TGF- β stimulation induces CD133 expression through the downregulation of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) and DNMT3 β expression, leading to significant demethylation of the CD133-promoter 1(P1) [52]. SB431542, a TGF β receptor I inhibitor (ALK5/ALK4 inhibitor), decreased the proportion of CD133+ subpopulation in glioma spheres and the sphere-forming ability [53]. By contrast, BMP4 shows the opposite effect by inducing PROM1 P1 promoter methylation, leading to its reduced activity and low CD133 expression. BMP4 upregulates the paired related homeobox 1 (PRRX1), a transcription factor involved in the development of the nervous system. Whereas both isoforms of this protein can bind to the PROM1 promoter, only the long isoform (PRRX1A) with OAR (otp, aristaless, and rax) domain in its C-terminal region (PRRX1A) interacts with DNMT3A and induces PROM1 promoter P1 methylation. Both PRRX1A and DNMT3A silencing increase CD133+ positive subpopulation even in the presence of BMP-4 and enhance their tumorigenic capacity [54].

Moreover, the poor association between methylation status and CD133 mRNA levels found by some authors suggests the existence of other mechanism that cooperates with DNA methylation on CD133 regulation, such as control of chromatin condensation by histone modifications even when DNA methylation was absent [55]. The balance between active histone modifications (H3K27ac and H3K4me3) and inhibitory histone marks (H3K27me3 and H3K9me3) can be crucial in PROM1 transcription [47, 55, 56]. High levels of H3K9me2 repressive mark in PROM1 P1 promoter inhibit its activity and CD133 expression in glioma cells, whereas G9a (histone-lysine *N*-methyltransferase, H3

lysine-9 specific 3) inhibition by bix01294 increases CD133 and Sox2 expression resulting in improved sphere-forming efficiency [57]. Also, CD133 mRNA overexpression was observed after treatment with trichostatin A, a histone deacetylase (HDAC) inhibitor in primary prostate epithelial cultures [53, 55]. CD133 upregulation correlated with increased levels of H3K27ac and H3K4me3 on P1, P2, and P3 promoters as well as high levels of histone acetyltransferases P300/CBP-associated factor (PACF) and H3K27me3 demethylase (HDM6B) along with reduced levels of H3K4me3 demethylase (LSD1) in LoVo colon-rectal cancer cell line that overexpressed Aldehyde oxidase 1 (AOX1) [56].

Furthermore, PROM1 promoter activity is controlled by cis-regulatory elements such as enhancers in acute lymphoblastic leukemia (ALL). The MLL-AF4 fusion protein, one of the most common rearrangements of the MLL (Mixed Lineage Leukemia) gene that promotes leukemogenesis, regulates promoter-enhancer interaction between PROM1 and its nearby gene TAPT1 by recruitment of DOT1L (Dot1-like, histone H3K79 methyltransferase) and subsequent increase of histone H3K79me2/3 on intragenic enhancer elements present in both genes, which in turn potentiate transcription of PROM1 and TAPT1 genes in some MLLr leukemias [58]. PROM1 promoter repression by polycomb repressive complex 2 (PCR2) in CD133-negative leukemia cells impair the interaction between the PROM1 promoter and the intragenic PROM1 and TAPT1 enhancers, explaining the absence of CD133 expression [58]. In addition, restriction of CD133 expression to immature CD34+ stem/progenitor cells in normal fetal and adult bone marrow cells correlates with relaxing chromatin in the PROM1 locus and MLL binding to the PROM1 promoter. In contrast, mature cells exhibit high levels of H3K27me3 mark on the PROM1 promoter, consistent with its repression by PCR2.

CD133 Biological Function (Signaling Pathways)

CD133-PI3K/Akt Signaling

PI3K/Akt signaling is one of the main pathways that mediate the phenotypic effects correlated with CD133 expression in the cell surface of tumoral cells. Akt signaling promotes proliferation, survival, migration, invasion, and chemoresistance by activating its downstream effectors in different cell types [59, 60]. CD133 mediates Akt activation by recruitment of the p85 regulatory subunit of PI3K to its C-terminal domain previously phosphorylated by Src kinase at Y828 residue, a critical event to allow its interaction with p85 [61]. Once active, PI3K converts PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) into PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate), leading to Akt activation via PDK1

(3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1). Y828F/Y858F mutants and pharmacological inhibition of Src (using PP2) significantly inhibit the CD133-p85 interaction and Akt activation in glioma cells and then its self-renewal and tumor-initiating capacity [61].

Given that CD133 phosphorylation is crucial to mediate PI3K/Akt signaling, its dephosphorylation is an event that could restrict its function; Shimozato et al. (2015) identified that PTPRK (receptor-type protein tyrosine phosphatase K) interacts with CD133 and negatively regulate Akt activation [62], whereas its knockdown enhances tumor growth and survival due to CD133 ectopic expression in CRC under nutritional and cytotoxic stress [63, 64]. Low expression of PTPRK correlates with poor prognosis in patients with CD133 expression, suggesting that PTPRK might abrogate CD133 pro-oncogenic function in CRC. Also, Kim et al. (2018) showed that PTPRF (receptor-type protein tyrosine phosphatase F) negatively modulates cell adhesion, migration, anchorage-independent growth, and cell survival, and its silencing recovered partly the reduced sphere growth induced by CD133 knockdown [65]. Although PTPRF might reduce CD133 function by direct interaction and subsequent tyrosine dephosphorylation, also it can dephosphorylate Src and decrease its activity leading to CD133-dependent and independent downstream signaling inhibition [65, 66]. CD133 promotes TM4SF5 (transmembrane 4L six family member 5) expression through the Akt/ β -catenin axis, and TM4SF5 enhances CD133 function by facilitating Src activation [67] and altering PTPRF stability or even its activity [65]. CD133-TM4SF5 in hepatocellular cancer context establishes a positive feedback loop to maintain proliferation and survival.

Regardless of the ability of CD133 to recruit p85 and facilitate downstream Akt activation, CD133 can also modulate Akt activation through receptor tyrosine kinases stabilization. For instance, CD133 stabilizes EGFR (epidermal growth factor receptor) in the plasma membrane by direct interaction. CD133 avoids EGFR endocytosis and sustains EGFR-mediated Akt activation [68, 69]. CD133 silencing decreases HER3 levels and suppresses EGFR and HER2 activation without disturbing their gene transcription in CRC cell lines [70]. CD133 silencing reduces proliferation, clonogenic capacity, migration, cell invasion, and resistance in CRC in part through decreasing glucose uptake as a result of the low GLUT1 expression because of impaired HER3/Akt pathway involved in protein synthesis via mTOR and mRNA stability, probably through the regulation of RNA-binding proteins [70, 71]. Enrichment RNA analysis showed that CD133+ cells in gastric cancer have high expression of RNA-modifying enzymes that modulate RNA decay, mRNA translation, pre-mRNA processing, and RNA export compared to CD133-negative cells [72]; however, the precise role of CD133 in mRNA processing is unclear.

CD133- Src Signaling

Aside from Src playing an indispensable role in the CD133 function on PI3K/Akt signaling, CD133-Src interaction favors Src activity. Whereas Y828 in the C-terminal domain of CD133 is the target of Src, the region between 845 and 857 amino acids seems essential for its interaction with Src and Src subsequent activation [73]. Although it is unclear how CD133 induces or amplifies Src activity, the binding of CD133 p-Y852 with the Src SH2 domain could trigger Src conformational change that promotes its activation (by autophosphorylation) [74].

CD133-Src signaling may mediate migration, invasion, and metastasis in cancer. CD133-Src-FAK axis promotes cell migration in the SW620 CRC cell line only under serum starvation, whereas CD133 and Src do not seem to interact under optimal culture conditions. CD133 deficiency decreased Src and FAK activation, causing reduced migration ability under serum starvation [73]. These data suggest that the articulation of signaling pathways by CD133 could be context-dependent. Furthermore, CD133 knockdown or Src inhibition abrogates the increasing levels of N-cadherin and vimentin induced by CD133 overexpression in head and neck cancer cell lines, whereas promoting epithelial morphological acquisition characterized by E-cadherin and CK18 epithelial marker upregulation [75]. Also, CD133 silencing has been directly correlated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) inhibition in gastric cancer (downregulation of Snail, Slug, N-cadherin proteins) [76] and with suppressed invasion and metastasis in pancreatic cancer [77].

Src upregulation can promote tumor growth and drive metastasis by linking to several pathways [74, 78]. Src-mediated YAP/TAZ activity and its target genes in melanoma and breast cancer drives tumor growth and metastasis [79]. Oh HT et al. (2022) demonstrated that CD133 regulates TAZ levels and nuclear localization via Src activation without altering YAP levels in cholangiocyte cells after ductal injury. CD133 knockdown and Src inhibitor reduced TAZ levels and fibrosis inducers such as CTGF (connective tissue growth factor), CYR61 (Cysteine Rich Angiogenic Inducer 61) and TGF β 1 (Transforming growth factor beta-1) in cholangiocyte organoids and the HCT116 CRC cell line [80]. Also, YAP/TAZ activity promotes EMT markers expression [38] and TAZ is required to sustain self-renewal in breast cancer stem-like cells [81] and intestinal tumor initiation [82]. This evidence suggests that CD133-src signaling via TAZ stabilization could participate during cancer initiation and aggressive phenotypes in different cancer types by promoting stiffing stroma, EMT acquisition, and maintaining cancer stem-related traits.

On the other hand, CD133-Src could mediate cell proliferation through cdc42 inhibition via phospho-caveolin-1 binding. Aside from participating in actin polymerization

during the formation and maintenance of filopodia, Cdc42 promotes the destabilization of a group of subunits of the BAF complex, leading to BAF complex assembly inhibition [83]. BAF complex is an ATP-dependent chromatin remodeling complex that controls gene expression in cancer [84] and during mammalian development (neural, heart, muscle, and even stem pluripotency). In Ewing sarcoma, EWS-FL1 recruits BAF complex to its target genes to induce their transcription, thereby BAF complex disassembly by Cdc42 activation reduces EWS-FL1 target gene expression and its participation in proliferation and tumor progression [83].

CD133- β -catenin Signaling

Previously, we mentioned that CD133 enhances Wnt signaling by increasing β -catenin levels through GSK3 inhibition mediated by Akt, which allows to β -catenin avoid β -TrCP polyubiquitination and subsequent degradation. Apart from phosphorylation, other posttranslational modifications regulate the Wnt/ β -catenin pathway, such as acetylation, sumoylation, and ubiquitination affecting activity, protein–protein interaction, protein stability, and subcellular localization [85, 86]. Mak et al. (2012) showed that CD133 interaction with HDAC6 promotes β -catenin lysine49 (K49) deacetylation, blocking phosphorylation-dependent degradation. CD133 or HDAC6 downregulation results in β -catenin destabilization and reduced β -catenin/TCF transcriptional activity, which correlates with decreased proliferation and cell differentiation in Caco2 and OVCAR-8 cell lines [25]. Also, TCF-LEF-binding sites are present in the PROM1 gene promoter [87] and inhibition of CBP- β -catenin interaction downregulated CD133 expression in hepatocellular cancer [88], which suggest a feedback loop between CD133 and β -catenin signaling.

In adult tissues, CD133 promotes the long-term self-renewal of pancreatic progenitors in part by increasing the β -catenin/TCF signaling in response to RSPO1 stimulus, a Wnt agonist, by constraining β -catenin phosphorylation mediated by GSK3 β . Curiously, Tremblay et al. (2019) and Brossa et al. (2018) found that CD133 can be physically associated with E-cadherin and β -catenin in pancreatic and renal progenitors. Although this complex might limit β -catenin cytoplasmic degradation, the precise CD133 role is undetermined [89, 90]. Frequently, the β -catenin bound to E-cadherin in adherent junctions has been considered sequestered and unavailable for signaling. Nevertheless, the E-cadherin- β -catenin complex stability is regulated by phosphorylation in response to external stimulus [91]. For instance, growth factor receptors and Src phosphorylate β -catenin, causing its release from the plasma membrane and subsequent nuclear translocation, wherein β -catenin acts as a co-transcriptional activator [92]. Considering that CD133 also can interact with Src and EGFR, CD133 could

coordinate the phosphorylation of β -catenin in the membrane upon specific stimuli and promote its cytoplasm accumulation. In addition, E-cadherin loss in mouse spermatogonial progenitor cells reduces β -catenin levels, resulting in less β -catenin to signaling and increased expression of differentiation markers [93]. In cancer, although E-cadherin downregulation is associated with beta-catenin nuclear localization and increasing β -catenin/TCF transcriptional activity, several reports do not support such correlation and β -catenin signaling requires additional events to assure its activation [94]. CD133 with E-cadherin might be hubs that coordinate the intracellular response to changes in the micro-environment and fine-tune the activation of the pathway in dependence on the cellular state.

CD133- Smad Signaling

TGF β signaling controls various cellular processes during embryonic development and tissue homeostasis in adult tissues. In cancer, TGF β signaling frequently exerts a tumor suppressor function during the early stages of tumorigenesis, but its activation favors cell invasion and metastasis in advanced tumors. Recent studies have found that CD133 regulates TGF β signaling during cell repair processes in neurons and liver cells. CD133 can interact with members of the signaling cascade and activate or contribute to TGF β signaling inhibition in dependence on the cell type.

In mature neurons, CD133 low expression correlates with a less axon regeneration capacity than neurons in the early stages of development. Despite of CD133 downregulation in DRG (dorsal root ganglion) mature neurons, CD133 is required for optimal axon regeneration in mice after sciatic nerve injury, and its overexpression improved axon growth even in non-permissive microenvironments [95]. CD133 controls cholesterol metabolism in injured neurons through R-Smads transcription activity, and cholesterol depletion favors axon regeneration [95, 96]. Mechanistically, CD133 interaction with the ALK4 receptor enhances smad2/3 downstream signaling, leading to the downregulation of gene-associated cholesterol biosynthesis. High cholesterol levels due to pharmacological CD133 and ALK4 inhibition overturned axon regeneration enhancement induced by CD133 upregulation in both embryonic DRG neurons and adult nerves of mice treated with adeno-associated virus-mediated PROM1 gene delivery in a model of sciatic injury [95]. How CD133 interacts with ALK4 and increase the TGF β ligands signal requires further investigation.

By contrast, CD133 negatively regulates TGF β signaling by promoting Smad7 stabilization in hepatocytes after bile duct ligation in mice as a model of fibrosis induction. Smad7 is an inhibitory Smad that induces TGF β receptor I inactivation and degradation through different protein complexes recruitment, hindering Smad2/3 phosphorylation and

downstream signaling [97]. CD133 bound to Smad7 avoids Smad7-SMURF interaction, thereby abolishing Smad7 ubiquitination and subsequent degradation [98]. Whereas CD133 in hepatocytes mitigates collagen deposition and apoptosis during liver fibrosis, other authors have reported that the CD133-Src-TAZ axis has an opposite effect in bile ductal cells, promoting fibrosis inducers secretion, such as TGF β 1 and CTGF that activate hepatic stellate cells to produce extracellular matrix in a model of diet-induced fibrosis [80]. Together, this evidence reinforces the idea that CD133 modulates different responses by recruiting a wide range of proteins in a cell-context manner. It will be interesting to know if CD133 might regulate canonical and non-canonical Smad signaling during cancer progression.

CD133- Hedgehog Signaling

Hedgehog signaling is a cilium-dependent pathway in non-tumoral cells [99] involved in embryonic development, tissue homeostasis, and regeneration, and its deregulation contributes to cancer development [100]. In normal cells, primary cilium allows the spatial regulation of canonical Hedgehog pathway in response to stimulation with Hh ligands, which is necessary for stem cell activation in various tissues [101–103]. In the absence of Hh ligands, the PTCH1 (Patched 1) receptor localizes at the base of the primary cilium, wherein inhibits and excludes Smoothed (Smo) from cilium through an unclear mechanism. PKA (protein kinase A) and SuFu (suppressor of fused) repress Gli transcription factors at the tip of the cilium and promote their cleaved into Gli-R, which acts as a transcriptional repressor. Hh ligands inhibit PTCH1 and, in turn, promote SMO accumulation in the cilium, wherein activated SMO releases Gli proteins from SuFu repression and avoids Gli proteolysis; then, Gli can enter the nucleus and activate gene target expression [104].

Associated CD133 to membrane microdomains can orchestrate signaling in the cilium of the different types of cells. Singer et al. (2019) demonstrated that CD133 is essential to coordinate ciliary dynamics with stem cell activation in cervical incisor loop epithelium (CLE) as a model of stem cell activation. CD133 deficiency impairs self-renewal, transient-amplification (AT) cells proliferation and differentiation, which correlated with a decreasing expression of Gli1-3 in AT cells and loss of Glis2 (Gli-similar 2) localization in the primary cilium of stem population of CLE [9]. Whereas Gli1-3 proteins are the most common terminal downstream effectors of Hedgehog signaling, how Hh ligands could regulate Glis proteins is unknown. Nevertheless, the high homology between their DNA binding domains suggests that they can compete for the same DNA binding site and likely mediate opposite transcriptional activity; indeed, Glis2 appears to play mainly as a transcriptional repressor [105].

Singer and colleagues reported elevated Glis2 levels in AT cells and a minor extent in stem cells in CLE, which correlate with CD133 expression. CD133 seems to control Glis2 localization in response to the Hh ligands; in its absence, CD133 restricts Glis2 to the primary cilium in stem cells to maintain stem cell quiescence; in response to Hh stimulation, CD133-Glis2 complex translocates to the nucleus in a time-dependent manner, and acts as transcriptional repressor of genes involved in stem cell maintenance and self-renewal such as STAT3 during commitment and cell differentiation [9]. Although Glis2 represses STAT3, especially in TA cells, the CD133 function in the nucleus as a partner of Glis2 is unclear, and further investigation is also required to clarify the CD133 function in stem cells and during the transition to TA cells. In addition, the question arise whether CD133 could regulate Glis activity in tumor cells given Glis link with some cancers [106], and how Hh ligands could mediate its function.

CD133 and Autophagy

Autophagy is a degradation/recycling mechanism designed to control protein expression levels, the turnover of damaged organelles, and long-lived proteins to maintain cellular homeostasis [107, 108]. The targeted proteins or components are encapsulated in vesicles and degraded by lysosomal enzymes. The sub-products of degradation are utilized for the biosynthesis of new cellular components or to obtain energy [109]. Autophagy may increase as an adaptive response to stress conditions to enhance survival and re-establish cell homeostasis.

CD133 has become associated with autophagy upregulation in some cancers, such as hepatocarcinoma and glioma cells. CD133 enhanced tolerance to nutritional stress through increased glucose uptake and autophagy. CD133 translocates to cytoplasm and partially colocalizes with LC3-II foci under glucose starvation, whereas CD133 loss attenuates autophagosome formation [110, 111], which suggests that CD133 could participate in autophagy induction and ultimately undergoes lysosomal degradation, but how specifically CD133 contributes to autophagosome assembly is undetermined. Izumi et al. (2022) found that CD133 is preferentially downregulated in the cytoplasm by p62-mediated selective autophagy/lysosomal degradation to control CD133 levels in neuroblastoma cells that exhibit high basal autophagy activity [112].

Recent studies indicate that CD133 could contribute to different processes and exert contrast functions in more primitive cells such as stem/progenitor cells and cancer stem-like cells, where autophagy increasing has been related to differentiation. Izumi et al. (2019) found that CD133 function and localization are regulated by its phosphorylation state. While Src phosphorylation appears to be necessary

to maintain CD133 at plasma membrane localization and mediate CD133-mediated PI3K/Akt signaling under higher availability of mitogens and nutrients, non-phosphorylated CD133 is endocytosed and in dependence on the cellular state can be targeted to degradation or transported to the pericentrosomal region through HDAC6/dynein- based traffic system, in which could mediate other functions and subsequently be recycled. Indeed, CD133 traps GABARAP in the pericentrosomal zone and avoids GABARAP-mediated ULK1 activation (by binding), attenuating autophagy initiation [10]. In line with that, CD133 silencing in SK-N-DZ and Huh-7 cells increased ULK1 kinase activity and autophagosome formation. Surprisingly, CD133 knockdown in SK-N-DZ enhanced neurite outgrowth upon differentiation conditions related to high autophagy induction. These data suggest that CD133-pericentrosomal inhibits cell differentiation in medulloblastoma cancer cells through autophagy modulation under basal and nutritional stress conditions. Disturbed basal autophagy by increasing or depletion (serum starvation, Rapamycin) alters stemness and promotes differentiation and/or senescence [113]. Under this argument, CD133/GABARAP axis and even CD133/Akt/mTOR axis might maintain basal autophagy levels below a threshold that do not compromise cellular identity and functionality.

Furthermore, Izumi and colleagues (2022) demonstrated that unequal CD133-pericentrosomal distribution during asymmetric division contributes to heterogeneity autophagy activity; the daughter cell with CD133 high-pericentrosomal localization maintains low basal autophagy activity and stem-like traits, probably by reinforcing β -catenin nuclear localization and co-transcriptional activity. In contrast, the other daughter cell with less CD133 expression exhibits high basal autophagy activity, and β -catenin remains on the cell surface [112]. Tumoral cells subpopulations with a broad spectrum of autophagy activity and CD133 distribution might confer adaptive capacity upon stress-inducing conditions such as cytotoxic insult and starvation.

Maintenance and Formation of Protrusions

Because of the predominant cellular localization of CD133 in microvilli and primary cilium, its loss or dysfunction by mutations cause degeneration of the outer segment of retinal photoreceptor cells in vertebrate and invertebrate animal models due to loss of ciliary structure in this cell type. Although other functional defects have not been associated with CD133 deficiency, likely because of compensation performed by co-expression of prominin-2 in other tissues, CD133 loss could be related with other ciliopathies beyond retinal degeneration [114–116].

At the molecular level, CD133 association with cholesterol in cytoplasmic membrane determines its retention in protrusions rich in cholesterol [117], while its interaction

with gangliosides in the membrane can affect phospholipid composition driven by PI3K activation at the inner surface of the plasma membrane, and also recruitment of other intracellular proteins involved in the structural maintenance of microvilli and other membrane extensions [116, 118]. Point mutations in its ganglioside (GM1)-binding site in the N-terminal domain increases its interaction with the p85 regulatory subunit of PI3K and its downstream Arp1/2 complex activation that participate in actin-cytoskeleton rearrangement in polarized epithelial (canine kidney cells) and fibroblast-like cells, leading to the formation of branched microvilli or microvilli with knob-like morphology [115]. Y819F/Y828F mutants that impede carboxy-terminal phosphorylation impaired protrusions elongation (microvilli and primary cilia) and overturn the GM1-binding site mutants effect on microvilli architecture [116, 119].

In contrast, Hori et al. (2019) reported that PI3K activity and CD133 Y819/Y828 phosphorylation was not necessary to mediate CD133 function on fiber formation on the plasma membrane in cells of retinal pigmented epithelium (RPE-1 cells). Nevertheless, the KLAKY motif localized between 814 and 818 amino acids in the carboxyl-terminal region was essential and suggests that CD133 participates in maintaining structure and fiber biogenesis of membrane extensions, inducing different downstream signaling [120]. RhoA/ROCK was required to mediate CD133 formation fibers in CD133 overexpressing RPE-1 cells, but no physical interaction was detected. These data suggest a missing intermediary protein that probably triggers RhoA activation; in this case, CD133 might facilitate its recruitment at the membrane point.

In addition, CD133 regulates the assembly-disassembly dynamic of primary cilium through its interaction with Arl13b or HDAC6 in dental epithelial stem cells. Arl13b is a member of the RAS small GTPase family involved in protein traffic in the cilium. Arl13b loss along axoneme could impair protein traffic and disturb cilium elongation [9, 121] in stem cells, whereas HDAC6 induces disassembly of primary cilium through tubulin deacetylation when stem cells transition into transitory amplifying cells.

CD133 Modulation by Microenvironment

Regulation by Hypoxia

Several studies have reported that CD133 is upregulated under hypoxic conditions that emulate the low oxygen supply in the core of overgrown tumors and tissular regions with low microvessel density and leaky capillaries, which limit oxygen delivery. Cancer cells exhibited high tolerance to decreasing oxygen levels because they upregulate the expression of the Hypoxia-inducible Factors (HIFs) 1/2 α

that coordinate the adaptive response to intratumoral oxygen gradients. Loss-of-function mutations of tumor suppressor genes involved in the oxygen-sensing mechanism and oncogenic growth factors signaling contribute to increased gene transcription and translation of HIF1/2- α isoforms even under normoxic conditions [122].

Whereas HIF-1 α and HIF-2 α could activate PROM1 P5 promoter through association with the ETS transcription factors (ETS binding sites in promoter), individual HIF silencing decreases slightly P5 promoter activity in CRC under normoxia. Only double knockdown (of both HIFs) decrease significantly promoter activity resulting in reduced levels of CD133 protein in the WiDr colon cancer cell line [123]. CD133 upregulation in hypoxic conditions has been reported in glioma, pancreatic and renal cancer in part by HIF-1 α -dependent manner [124–126]. In addition, hypoxia promotes CD133 expression through HIF1/2 α -induced Sox2, Oct4, and Klf4 upregulation in several cancers [127–129]. HIF1/2 α can regulate these proteins through direct and indirect mechanisms. For instance, Covello et al. (2006) demonstrated that HIF2 α , but not HIF1 α , activate OCT4 promoters that contain hypoxia response elements (HRE) [130]. Both HIF1 α and HIF2 α indirectly could upregulate Sox2 by promoting mRNA stability. HIF1 α /HIF2 α induce ALKBH5 (alkB homolog 5, RNA demethylase) expression during hypoxic conditions that demethylate Sox2 mRNA (m6A-modified mRNAs), leading to Sox2/CD133 upregulation and maintenance of cancer stem-like traits [131]. In addition, Both HIFs α subunits might promote chromatin accessibility through the upregulation of proteins involved in epigenetic regulation (epigenetic readers, chromatin structure regulators), leading to improved gene transcription [132]. Hao et al. (2022) found that increased ATAD2 (ATPase family AAA domain-containing protein 2) expression by chronic hypoxia-HIF1 α induction enhances CD133 and CD44 levels in lung cancer [133]. ATAD2 plays an essential role in histone dynamics by recruitment of epigenetic modifiers [134] and mediating histone turnover [135].

CD133-negative glioma cells transplanted into brain mice expressed high levels of HIF1/2 α and concomitant expression of CD133, which indicate the strong effect of the tumoral microenvironment on CD133 expression levels and cell phenotype [136]. Double knockout of HIF1 α and HIF2 α produced a superior negative impact on CD133 expression, tumor growth, and increased mice survival compared to the effect of individual knockout. In line with that evidence, Wang et al. (2017) found hyperoxia (95% O₂) promotes cell differentiation of glioma stem-like cells through negative regulation of HIF1 α , resulting in CD133, Nestin, and CD15 reduction, and high levels of GFAP, a marker of astrocytic differentiation [137]. Also, hyperoxia induces apoptosis, impaired clonogenicity growth, and temozolomide responsiveness, the opposite effect triggered by hypoxia.

Furthermore, HIF-1 α could regulate CD133 expression by enhancing Notch, Hedgehog, and Wnt signaling. These pathways control the balance between the maintenance of stem cell subpopulation, its activation, and differentiation status in several adult tissues. Their disturbance is associated with perturbed tissue homeostasis during oncogenesis. HIF1 α and HIF2 α compete to interact with NICD (Notch intracellular domain) and regulate its co-transcriptional function in dependence on oxygen levels. HIF1 α stabilizes NICD by binding and promoting its transactivation activity leading to CD133 increasing levels under hypoxia; Notch inhibitor (GSI) depletes CD133 mRNA levels and promotes neuronal and astrocytic differentiation [138]. Also, Jagged1 (Notch ligand) treatment blunted the HIF1 α reduction effect on CD133, CD44, and ALDH1 levels, sphere forming efficiency, invasion capacity, and proliferation of prostate cancer cell lines exposed to hypoxia [139]. Although HIF2 α represses NICD activity essentially upon normoxia and mild hypoxia, HIF-2 α participates in CD133 regulation and seems independent of Notch signaling in glioma cells [138]. Also, Hedgehog signaling inhibition using cyclopamine (Smoothed SMO receptor inhibitor) and GANT61 (GLI inhibitor), which inhibit different steps along the cascade pathway, abolished hypoxia-enhanced CD133, Oct4, Sox2, Nanog expression, EMT marker expression and invasion capacity of cholangiocarcinoma cancer lines [140]. HIF1 α silencing abrogated Shh ligand expression and downstream signaling during hypoxia. In addition, although PROM1 (CD133) is a Wnt-target gene [87] and HIFs α appear to display a counterbalancing function on β -catenin/TCF transcriptional activity in response to oxygen levels [141, 142], it is unclear how the balance between HIF1 α and HIF2 α during hypoxia contribute to Wnt pathway and CD133 regulation mostly in cancer cells where Wnt pathway plays a crucial role. Miao et al. (2023) reported that hypoxia-induced β -catenin stabilization upregulated CD133 and Nanog expression in CRC cell lines, and that β -catenin knockdown reversed this effect [143]. Also, Mazumdar et al. (2010) found that HIF1 α transactivates LEF1 and TCF1, leading to Wnt/ β -catenin target genes transcription only in ESC (embryonic stem cells), but not in embryonic cell-derived neurons during hypoxia [144]. By contrast Kaidi et al. (2007) reported that HIF1 α has a negative role in β -catenin/TCF transcriptional activity in CRC cell lines by competitive binding with TCF4, in which HIF-1 α / β -catenin transactivates hypoxia responsive target genes to promote an adaptive response to low oxygen levels [141]. These findings suggest that at least HIF1 α exhibits differential function in a cell-context-dependent manner.

Together, this evidence suggests that CD133 expression is synergistically upregulated by different transcription factors in response to hypoxia, in which case HIFs α balance

and HIF1 α /HIF2 α switch during chronic hypoxia could be determinants in the maintenance of CD133⁺ population and expansion (Fig. 1).

Reactive Oxygen Species (ROS)

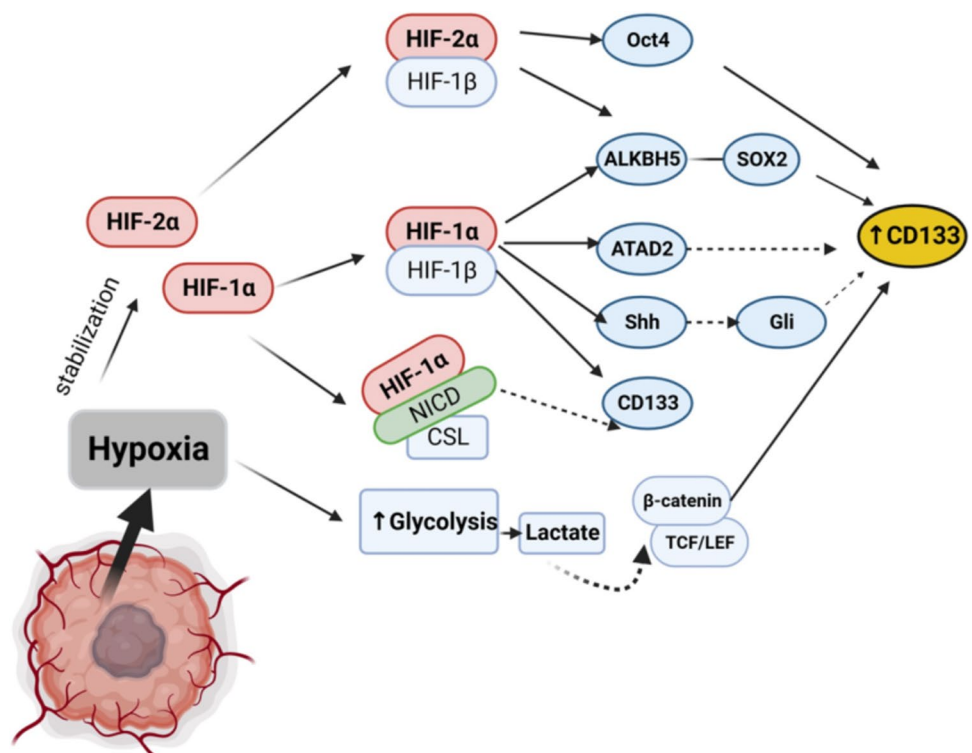
One of the particular characteristics of cancer is the rise in the physiological threshold of reactive oxygen species (ROS) because of high cell proliferation, low oxygen availability, endogenous immune response (inflammation), and antineoplastic therapy that boosts ROS production. In addition, ROS as second messengers are essential for the local and transient regulation of signaling cascades that mediate several cellular functions. Both persistent overproduction and underproduction beyond the thresholds could compromise cell viability and other cellular processes [145].

Tumoral cells can display adaptive mechanisms that restrict ROS levels to tolerable limits, such as increased expression of antioxidant enzymes, restriction of intracellular ROS production (from mitochondria, from NADPH oxidases) by metabolic reprogramming, and the reduction of hydrogen peroxide transporter channels, among others [146]. For instance, CD133 expression correlated with superoxide dismutase (SOD) and cystine/glutamate transporter xCT, crucial to anion superoxide conversion to hydrogen peroxide (less reactive and diffusible) and glutathione levels maintenance, respectively [147, 148]. CD133 depletion negatively impacts xCT induction in response to H₂O₂ treatment and

sensitizes tumoral cells to conventional antineoplastic drugs, but how CD133 promotes an xCT increase is undetermined [148]. Also, Zheng et al. (2020) found that Aquaporin 9, a water channel that facilitates H₂O₂ transport from the extracellular to intracellular space, is downregulated in HCC and that its overexpression disturbed cancer stem-like cell activation and CD133 expression as well as other cancers stem cell markers [149]. AQP9-mediated intracellular ROS disturbed β -catenin-TCF4 association and enhanced β -catenin-FOXO3a interaction, leading to Wnt-target genes downregulation. FOXO transcription factors are known to be regulated by ROS intracellular levels; its activation could determine the cell cycle exit under unfavorable conditions [150, 151]. Consistent with this, NAC treatment rescued β -catenin-TCF4 association and CD133 expression in HCC. In addition, IGF downregulates AQP9, whereby restrains intracellular H₂O₂ levels and promotes cancer stem-like properties.

By contrast, Wang et al. (2019) reported that Aquaporin 3 (AQP3) exhibited an opposite effect on CD133 regulation and stem-like properties in HCC [152]; nevertheless, in this study, Aquaporin-mediated H₂O₂ transporting was not evaluated, and AQP3 could have functions independent on mediated H₂O₂ intracellular levels, such as glycerol uptake and even its cytoplasmic localization could be associated with an intracellular role [153]. AQP3 promotes STAT3 activation, nuclear translocation, and PROM1 promoter activation in HCC [152]. In several models, ROS promotes STAT3 activation probably by thiol oxidation in the active site of tyrosine

Fig. 1 CD133 regulation in hypoxic conditions. Hypoxia-inducible Factors (HIFs) 1/2 α upregulate the levels of Sox2 and Oct4, and also epigenetic regulators such as ATAD2 that favor gene transcription. HIF1 α can stabilize NICD (Notch intracellular domain) in the nucleus and promote NICD/CSL transcriptional activity leading to improve CD133 expression as well as promoting Hedgehog signaling through improved Shh ligand. Also, hypoxia can promote β -catenin stabilization via increased glycolysis and lactate release leading to β -catenin nuclear translocation and CD133 expression. Created with BioRender.com



phosphatases, a negative regulator of STAT3 activity [154]. Activated STAT3 transactivates NOX1, producing a feedback loop that sustains REDOX signaling (STAT3 and PI3K/Akt activation) involved in migration, cell proliferation, and stem-like properties [155, 156] (Fig. 2).

Extracellular Matrix

As part of the cellular microenvironment, the extracellular matrix (ECM) provides mechanical support and plays a critical role in cellular behavior and phenotype. Matrix components and their mechanical properties, such as stiffness, viscoelasticity, and viscoplasticity, influence diverse cellular processes, such as proliferation, migration/invasion, stemness, and cell differentiation. By interaction with ECM, cells sense mechanical cues and respond by triggering the activation of signaling cascades involved in cell survival, rearrangement of the cytoskeleton, activation of transcriptional regulators, and chromatin accessibility [157].

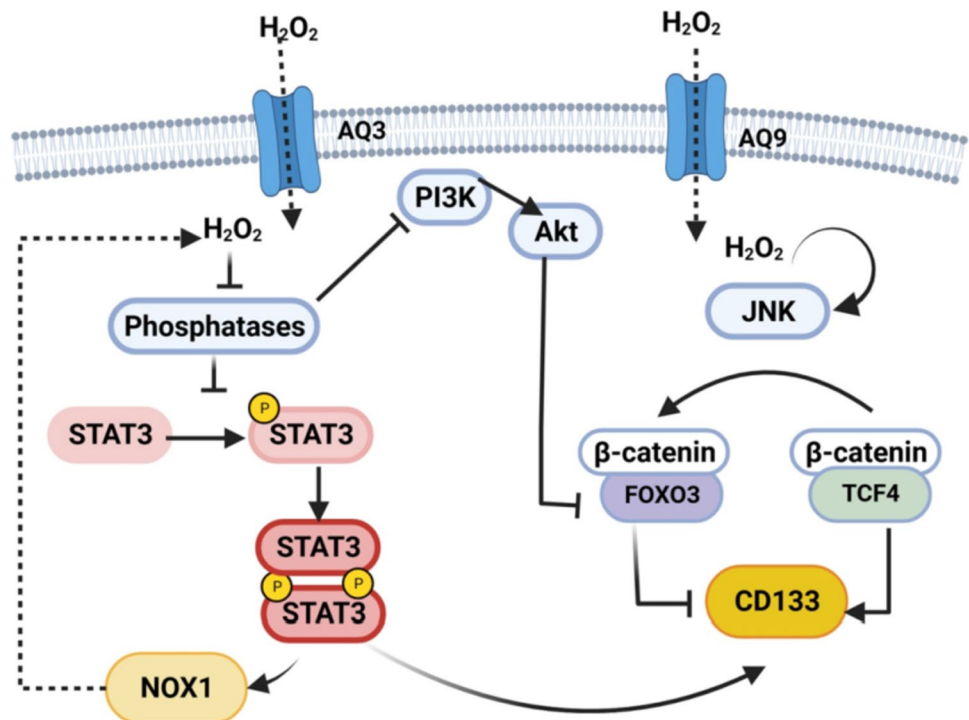
Although there are limited studies about how ECM affects CD133 expression, ECM impact could depend on matrix composition, cell type, and cellular context. Also, mechanotransduction signaling can differ between traditional 2D (monolayer) and 3D in vitro models, and thus its impact on cellular processes could diverge (Fig. 3). For instance, You et al. (2016) found that matrix stiffness enhances CD133 expression in monolayer cultures of HCC cells through the integrin β 1/Akt/mTOR axis [158]. Cells sense mechanical cues using integrin β 1 that bind to Collagene-1 fibers

and trigger downstream signaling (Fig. 3A). By contrast, Ng et al. (2021) suggested that local soft spots in the HCC tumors maintain the CD133+ subpopulation in the 3D matrix gel system and xenograft models. Soft matrix through mechano-epigenetic regulation induces chromatin accessibility on CD133 promoter by activating histone modifications leading to enhanced expression (H3K4me3 and H3K9ac), while repressing THBS2 (thrombospondin 2) promoter through transcriptional silencing markers (H3K9m3 and H3K27m3) [159] (Fig. 3B). THBS2 has been considered an ECM-modifying enzyme that regulates extracellular matrix deposition leading to ECM stiffness. Therefore, CD133+ cells with THBS2 low expression promote a feedback loop that allows them to sustain the surrounding soft microenvironment, thereby facilitating invasion and metastasis by ECM remodeling.

Whereas several studies in 2D models of hepatocellular carcinoma have demonstrated a high correlation between increasing stiffness (that resembles liver fibrosis/cirrhosis) and hepatocellular carcinoma development [160–163], 3D in vitro systems with matrices that resemble physiological ECM (native tissue and tissue disturbed by disease) and studies of mechanical properties of ECM in vivo will allow unveiling the role of ECM-cell interactions that mediate disease evolution.

Without overlooking, 2D culture models have enabled to study the mechanotransduction pathways implicated in different ECM interactions and unveil the cellular behavior under the diverse stimuli. Integrin signaling is the central

Fig. 2 ROS modulates CD133 levels in a context-dependent manner. Increased ROS species by aquaporin (AQ 3 y AQ9) channels can positively or negatively regulate CD133 expression because of its role in signaling modulation. ROS could favor JNK activation and downstream signaling. JNK induces FOXO3a release from 14–3–3 protein and subsequently its entry to the nucleus, wherein it competes with TCF4 to bind to β -catenin, leading to CD133 downregulation. By contrast, ROS also can improve CD133 expression by enhancing STAT3 and PI3K signaling. Created with BioRender.com



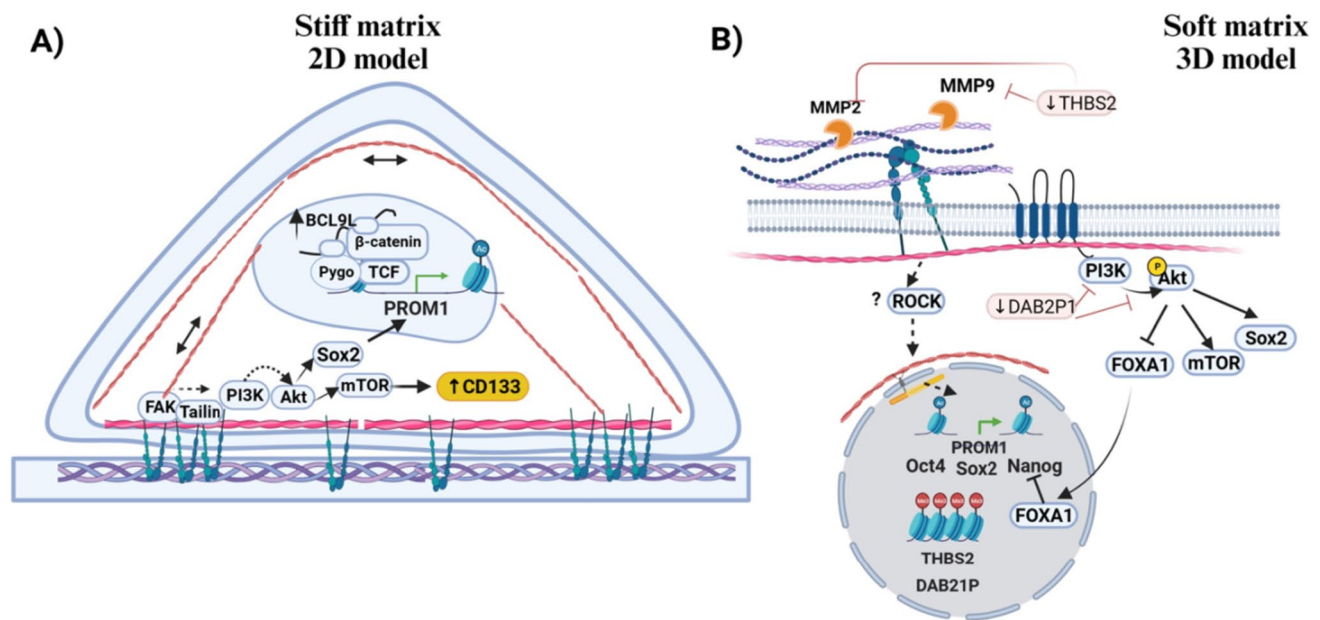


Fig. 3 Mechanotransduction signaling mediated by integrin interaction with extracellular matrix (ECM) modulates CD133 expression in response to stiffness changes. The impact of ECM-cell interaction in CD133 levels can differ between traditional 2D (monolayer) and 3D in vitro models. **A** Monolayer cultures on stiffer matrices promote the establishment of focal adhesions that transduce mechanical forces in signaling activation, such as PI3K signaling. Also, contractile forces transmission to the nucleus can modulate pathways at the transcriptional level modulating transcription coactivators, transcrip-

tion factors, and chromatin accessibility. By contrast, cells embedded in ECM sense mechanical clues such as stiffness via integrins, but the downstream signaling is unclear. **B** Soft matrices in 3D models increased CD133 expression through the improved expression of Sox2, Oct4, and regulation of chromatin accessibility to PROM1 promoter while repressing the expression of THBS2. CD133 in cell surface improves PI3K /Akt signaling, which can increase Sox2 and Nanog levels. Created with BioRender.com

mechanism in 2D models by which cells sense ECM stiffness. While some studies reported the importance of integrins in mediating changes in CD133 levels [158, 164], others do not explore the upstream signals of transcriptional regulators [165, 166]. You et al. (2016) and Tao et al. (2021) reported CD133 upregulation by increasing ECM stiffness in HCC and glioblastoma, respectively. Akt/mTOR activation downstream of integrin-ECM interaction in HCC could increase CD133 synthesis via mTORC1 activation and PROM1 gene expression via Akt-mediated SOX2 protein stabilization [158, 165]. On the other hand, in glioma cell lines, increasing ECM stiffness causes an increase in BCL9L, a transcriptional coactivator of the β-catenin/TCF complex that favors the gene transcription of its target genes, including PROM1 (gene-coding CD133 protein). mTORC1 inhibition and β-catenin signaling inhibition override the CD133 increased levels triggered by the matrix in HCC and glioblastoma, respectively.

Alternatively, soft matrices can also induce changes in the CD133 expression in 3D models of HCC, as previously mentioned. Local soft spot microenvironment enhances CD133 expression via epigenetic modifications; nevertheless, the mechanism that regulates this process is unclear yet, and there are contrasting studies on changes in chromatin

accessibility mediated by mechanical clues [157]. In addition, soft matrices in 3D models compared to rigid plastic plates enhance the CD133 mRNA levels and other cancer stem markers such as Oct4, Sox2, and Nanog in CRC cell lines. Although CD133 levels correlated with Nanog upregulation and low levels of DAB21P [166], a negative regulator of PI3K/Akt signaling, overexpression of DAB21P did not disturb CD133 mRNA levels, which suggest that other mechanisms triggered by matrix mechanical clues could be mediating this effect.

Regulation by Tumor Associated Cells

Tumoral cells constantly are exposed to numerous secreted factors from tumor-associated cells that regulate cell behavior, quiescence, and stem/differentiation state. Numerous studies have demonstrated that CD133 expression increases as an outcome of the cell communication between tumoral cells and its niche in several cancers through cytokines secretion such as interleukins, TNFα/β, HGF, adipokines, and TGFβ (Table 1).

Interleukins appear as the most studied secreted factors involved in CD133 upregulation by macrophages, cancer-associated fibroblasts (CAFs), mesenchymal stem cells

Table 1 CD133 regulation in tumor cells by soluble factors in the microenvironment

Cancer	Tumor-associated cells ¹	Secreted factors	Signaling induced in tumor cells	Reference
HCC	Stellate cells (CAFs transformation)	IL6/HGF	ND	[167, 168]
		HGF	ND	[169]
		SCUBE1	Shh/GLI-1	[170]
	Ectopic	IL6	STAT3/NFkB	[171]
	Ectopic	LPS	NFkB/HIF-1 α	[172]
HBx-infected hepatoma cells	HUEVECs	TGF β	TGF β signaling	[173]
Thyroid cancer	M2-like macrophages	Wnt ligands? (ND)	β -catenin	[174]
	Neurons	Acetylcholine	M3R/p-Src/CD133/Akt	[175]
Glioma	T Regs	TGF beta	NFkB/IL6/STAT	[176]
	Ectopic	Leptin	ObR/STAT/Notch	[177]
Medulloblastoma	Astrocytes	DN	DN	[178]
Colo-rectal cancer (CRC)	Ectopic	IL25	AMPK/SHH/GLI1	[179]
	Myofibroblasts	IL6, IL8	STAT3/Notch	[180]
	Jurkat cells	TNF β	NFkB	[181]
	MSCs (placenta)	IL8	CXCR2/ERK	[182]
	CD206 + macrophages	Cytokines	ND	[183]
	Tumor associated macrophages	TAM-conditioned medium	STAT3	[184]
	Ectopic/CD68 + macrophages	IL17	NFkB	[185]
Ovarian cancer	M2-like macrophages	IL8	ND	[186]
	M1-like macrophages	TNF α , IL6, IL1 β	ND	[187]
Oral Cancer	CAFs	CXCL2/IL6	ND	[188]
	Stellate cells (CAFs transformation)	IL6	STAT3	[189]
Pancreatic cancer	Adypocytes	Conditioned medium	ND	[190]
	BM-MSC	IL6	IL6R/STAT	[191]
Esophageal squamous carcinoma	Ectopic	IL23	STAT3	[192]

¹Soluble factors secreted by tumor-associated cells are referenced; in various studies its effect was evaluated by ectopic expression to resemble tumor-associated cells secretion. ND: no detected or not evaluated

(MSCs), and adipocytes in local niches. Interleukins can induce STAT3 activation and its target genes expression in tumoral cells [180, 189, 191, 192]. STAT3 binds to the PROM1 promoter and increases CD133 protein levels [171]. But also, STAT3 cross-talking with other signaling pathways produces a robust response to external signals to improve CD133 expression and cancer stem features. STAT3 can activate Notch signaling through improved Notch ligands and receptors expression. Kim et al. (2021) reported that IL6/IL8 secreted by myofibroblasts in CRC microenvironment increased CD133 +/CD44 + cell subpopulation [180] probably through STAT3/Jagged1 axis that triggers Notch signaling activation in tumor-adjacent cells [193] which has shown to regulate positively CD133 expression [194, 195].

High-fat diets and an imbalance between energy expenditure and food intake promote fat accumulation leading to adipocyte tissue dysfunction, metabolic disorders, and chronic inflammation associated with cancer development. Leptin is an adipokine secreted predominantly by adipocytes to regulate food intake and metabolism. Its levels are

highly upregulated in obese individuals and linked to the development of several cancers because of its role in cell proliferation, angiogenesis, ECM-remodeling, pro-inflammatory niche maintenance, apoptosis resistance, and cancer stemness [196]. Leptin/STAT3/Notch axis enhances CD133 levels, clonogenic and self-renewal capacity, whereas STAT3 inhibitor, γ -gamma secretase inhibitor, and leptin antagonist (LDFI), abrogated leptin effect on stem cells functions in glioblastoma [177]. CD133 + cells tended to accumulate around adipocytes in pancreatic tumors. Kesh et al. (2022) reported that conditioned media from patient-derived adipocytes increased CD133, Sox2, and Oct4 expression, which suggests that peritumoral adipocytes are part of the homing niche that maintains CD133 + population partially because of interleukins secretion such as IL6 [190].

In addition, high-fat diets are associated with abnormal oxidative stress and hyperlipidemia. ROS overproduction produce higher levels of oxidized low-density lipoproteins (ox-LDL) that promotes tumor-associated macrophage (TAM) activation in cancer. Interleukins produced by

CD206 + macrophage cells could induce STAT signaling in tumoral cells, which upregulate CD133 and CD44 expression [183]. Further, ox-LDL could trigger ROS/NFκβ/interleukins that act in an autocrine manner to activate STAT3 and subsequent target gene expression [197]. Also, other soluble factors such as TGFβ and TNFα/β from T Regs and T cells respectively, activate NFκB/Interleukins axis to probably reinforce STAT signaling in a feedback loop [176, 181]. IL17 promotes CD133 upregulation and enhanced clonogenic capacity, partially via NFκB activation in ovarian cancer cells. IL17 secretion by CD4 + lymphocytes and CD68 + macrophages in the local niche close to CD133 + ovarian cancer cells favor CD133 + cell maintenance [185]. IL17B could enhance CD133 expression via the Akt/β-catenin axis in other cancers [198].

Beyond STAT signaling and its crosstalk with other signaling pathways, stromal cells can induce Hedgehog, and Wnt signaling activation led to CD133 upregulation in tumoral cells. Endothelial cells and CAFs promote CD133 expression through Hedgehog pathway activation through Shh and SCUBE1 secretion in glioblastoma and HCC, respectively [170, 199]. SCUBE1 is a glycoprotein involved in Shh ligand secretion and membrane release; its overexpression in CAFs raises Shh, SMO, and GLI-1 levels with a concomitant increase in CD133 levels, whereas its downregulation displays an opposite effect, resulting in reduced migration and sphere-forming ability in tumoral cells [170]. Also, IL25 in CRC tissues could positively regulate Hedgehog signaling by p-AMPK reduction leading to Gli-1 stabilization and nuclear translocation in cancer cells. However, it is not clear how IL25 disturbed AMPK levels and its phosphorylation in CRC [179]. M2-like macrophages could secrete Wnt ligands that enhance CD133, Oct4, and cMyc expression through β-catenin stabilization and nuclear translocation [200]. M2-like macrophages improved clonogenic anchorage-independent capacity, cell migration, and invasion in thyroid cancer cells, whereas Wnt/β-catenin signaling inhibition abolished it [174].

Endothelial cells also contribute to CD133 + subpopulation maintenance in perivascular niches through TGFβ secretion and downstream signaling activation in hepatoma cells infected with the hepatitis B virus. CD133 appears essential to mediate the TGFβ effect on the EMT process in HBx-infected hepatoma cells [173]. TGFβ signaling regulate CD133 expression in a dose-dependent manner in part through the inhibition of DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3β expression, resulting in CD133 (PROM1) promoter P1 methylation reduction, which favors its activation [51]. On the contrary, CD113 + cells of MHCC97H (HCC cell line) exhibit DNMT1 higher expression than CD133- cells; its knockdown results in stemness loss, miR34a transcription, and subsequent FOXM1 downregulation. DNMT1/miR34a/FOXM1 axis plays an essential role

in cancer stem-like traits in some liver cancer [201]. FOXM1 regulation seems crucial in cancer progression and enhanced stemness in cancer [202–204]. DNMT1 loss could be detrimental to tumoral cells because of the multiple targets that it modulates (Fig. 4).

On the other hand, beyond CD133 levels regulation by tumor-associated cells, CD133 activity can be also modulated by secreted factors. Wang et al. (2020) found that acetylcholine secreted by neurons associated with thyroid cancer cells induces Y828 phosphorylation of CD133 and downstream PI3K/Akt activation, which enhances self-renewal and restrains CD8 + T cell cytotoxicity [175]. Acetylcholine binding to the M3R receptor and subsequent Src activation was essential to mediate CD133 function. Also, Wei et al. (2019) reported that CD133 + cells interact preferentially with lymphatic endothelial cells in HCC tissues, and its interaction promotes IL17 secretion by endothelial cells that stimulate STAT3 signaling and subsequent PD-L1 upregulation in tumoral cells. This interaction seems to depend on high-mannose glycans expressed on CD133 + cells and mannose receptors on endothelial cells; inhibition of this physical interaction abolished IL17 secretion and CD133 + cells' resistance to CD8 + T cells [205]. This evidence suggests that hindering the CD133 function in tumor cells could impair not only self-renewal and tumorigenicity, but also the ability of CD133 + cells to modify their niche. LDN193189 small molecule interacts with the C-terminus of CD133 and hampers p85 recruitment and downstream signaling, impairing self-renewal and tumorigenicity of CD133 + cells in HCC. Also, LDN193189 downregulates galectin-3 transcription by impairing Y828/Y852 phosphorylation of CD133 in HCC cells, leading to CD8 + T cells activation [206].

Cytotoxic Stress (Chemotherapy and Radiotherapy)

The acquisition of CD133 or pre-existence of CD133 + cells in the tumors is frequently associated with cancer stem-like cells with enhanced resistance to conventional therapy. CD133 promotes chemoresistance partially through Akt activation, which can modulate the activation of several proteins involved in drug efflux, apoptosis, and cell survival. CD133/Akt inhibits pro-apoptotic proteins and promotes antiapoptotic proteins and MDR1 expression via NFκB [208–210]. Also, CD133/Akt inhibits JNK and p38 downstream signaling involved in drug-induced apoptosis and promotes p53 degradation through MDM2 stabilization [211]. Whereas P53 could restrict CD133 expression under normal and stress conditions, CD133 upregulation abolishes p53 tumor suppressive function, indicating a mutual negative regulation that depends partially on the mutational background.

CD133 loss in different cancers can sensitize resistant cells to conventional chemotherapy by inducing PI3K/Akt

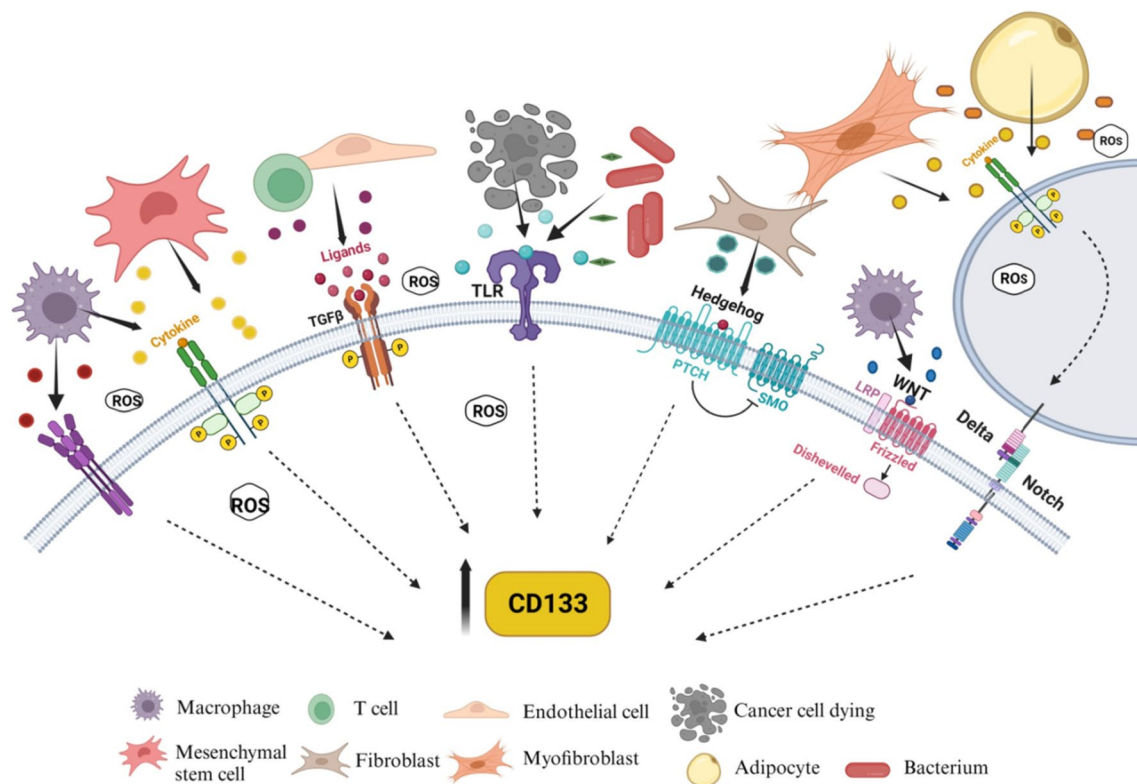


Fig. 4 The tumor microenvironment regulates CD133. Tumor-associated cells modulate CD133 levels in cancer cells through the secretion of cytokines, growth factors, HMGB1, Shh, and Wnt ligands, and so forth. Also, toxins secreted such as LPS by bacteria could

modulate CD133 expression [172, 184, 207]. These factors induce signaling pathways that positively regulate CD133 expression. Created with BioRender.com

signaling reduction [212–214]. In addition, CD133 depletion frequently is accompanied by the suppressed expression of the pluripotent stem genes and slow proliferation phenotype in cancer [4, 215, 216], which suggests that CD133 downregulation could impact several cellular processes via dependent and independent of PI3K/Akt signaling in a context-dependent manner. CD133 acquisition during therapy emerges in response to cytotoxic stress as an adaptation mechanism to promote survival. Hereafter we will focus on the possible mechanisms triggered in the tumoral cell by its surrounding niche that promotes CD133 expression during or after drug treatment.

Tissue damage, inflammatory response, and cell death caused by chemotherapy or radiotherapy, can induce pathways activation or inhibition that promotes cell survival and tumor progression. Hou et al. (2020) reported that irradiated mesenchymal cells (IR-MSCs) increase CD133 expression and tumor growth in HCC through autocrine Wnt3a/ β -catenin signaling activation. Disrupting CBP- β -catenin interaction abolishes the IR-MSCs effect, but how IR-MSCs stimulate Wnt ligand secretion in tumoral cells is still unclear [217]. Cytokines secreted by stromal or cancer cells contribute to chemotherapy differential

outcomes. Colony-stimulating factor (GM-CSF) upregulation and secretion after 5FU and cisplatin treatment trigger STAT3 activation in residual gastric cancer cells. GM-CSF increased miR-877-3p expression, which suppresses SOCS2 (suppressor of cytokine signaling 2), a negative JAK/STAT3 signaling regulator, driving CD133+ cells to expansion and Sox2, Oct4, KLF4, and h-TERT upregulation [218]. IL6 upregulation induced by MUC1/EGFR axis in tumoral cells results in CD133+ subpopulation expansion after chronic and acute paclitaxel treatment. MUC1 increased expression after paclitaxel treatment supports acquired chemoresistance via MUC1-C/EGFR complex nuclear activity, thereby EGFR inhibition by Erlonitib sensitized cells to paclitaxel, abrogated CD133+ cells enrichment and prevented disease relapse of cervical cancer [219].

HCC early recurrence after radio-frequency ablation (RFA) treatment was associated with CD133+ cell growth partially due to VEGF and CXCL10 elevated levels after the treatment [220, 221]. Microvascular and tissue damage after RFA treatment could trigger HIF1 α stabilization and subsequent VEGF expression to promote local angiogenesis and residual cell expansion characterized by CD133 enhanced expression [222]. Nanog increased expression induced by

VEGF raises the frequency of CD133+ cells and enhances its clonogenic capacity [221]. Disturbing VEGF-VEGFR2 interaction abrogates CD133 expansion driven by VEGF. Blocking CXCL10-CXCR3 interaction, CXCL10 fails to increase the c-Myc levels and proportion of CD133+ cells [220], but the molecular mechanism downstream VEGFR and CXCR3 after RFA treatment is unclear. In addition, Adini et al. (2013) demonstrated that CD133 interacts with VEGF, promoting its stabilization and dimerization, which favors VEGF binding to its receptor in endothelial cells and tumoral cells, indicating a possible feedback wherein CD133 potentiates VEGF pro-angiogenic function in endothelial cells, and survival in tumoral cells via VEGF/Bcl-2 axis [223].

Tumors undergoing chemotherapy or radiotherapy display HMGB1 increased levels in the extracellular space that favors the acquisition of cancer stem-like features. HMGB1, a non-histone nuclear DNA binding protein involved in chromatin remodeling and gene transcription, also acts as an inflammation mediator by binding to TLR receptors. HMGB1 can be released by damaged, dying cells, stromal cells or actively secreted by cancer cells in response to an external stimulus such as hypoxia and cytokines [224, 225]. Zhang et al. (2019) demonstrated that CD133-negative tumoral cells acquired CD133 expression after exposure to HMGB1-released by irradiated-tumoral cells. HMGB1 binds to TLR2 and induces YAP stabilization and YAP/HIF-1 α nuclear association, leading to pluripotency gene transcription. YAP binding to pluripotent gene promoters was dependent on HIF1 α upon HMGB1 stimulus. Deficiency of TLR2 and HIF-1 α , abolished CD133 expression and clonogenic ability induced by HMGB1. TLR2/YAP/HIF1 α inhibitors delayed pancreatic tumor relapse in mice undergoing X-ray irradiation treatment [226]. Also, in response to temozolomide, GBM cells secrete HMGB1 that triggers lncRNA NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1) upregulation favoring β -catenin/TCF signaling [227]. NEAT1 could regulate positively or negatively the Wnt signaling through mRNA or protein stabilization of proteins involved in the signaling cascade and the transcriptional complex [228–230].

Conclusions and Perspectives for Therapeutic Strategies

The accuracy of CD133 as a biomarker for cancer stem-like cells remains controversial, primarily due to the presence of CD133-negative cells that also possess a tumorigenic potential and enhanced chemoresistance in several tumors [83, 231, 232]; and plasticity of stemness markers expression [233]. These findings suggest the existence

of various subpopulations with distinct surface marker expressions with potential for tumor initiation and probably with a differential contribution to cancer progression, such as proliferation, latency, migration, and invasiveness. Additionally, the tumor microenvironment influences CD133 expression in tumoral cells and its modulation could be part of an adaptive response.

Remarkably, CD133 has been regarded as a therapeutic target for eradicating drug-tolerant cancer cells and preventing cancer recurrence in various cancer types. Targeting CD133 enhances cell sensitivity to conventional chemotherapy by suppressing the overexpression of CD133 or preventing the enrichment of CD133+ cells in response to cytotoxic stress. In gastric cancer, the combined treatment of cisplatin and anti-CD133 CAR-T cells has demonstrated significant antineoplastic activity compared to individual therapeutic strategies [234].

Targeted immunotherapy utilizing antibodies that engage NK cells and T cells to CD133+ subpopulation has shown reduced outgrowth of CD133-overexpressing glioblastoma (GBM) tumors and decreased tumor burden in mice with myeloid leukemia, without impairing hematopoietic stem cells, at concentrations effective against tumor cells [235, 236]. Furthermore, the development of vaccines incorporating modified CD133 mRNA into dendritic cells (DCs) has induced cytotoxic activity of both CD4+ and CD8+ T cells against triple-negative breast cancer (TNBC) and GBM cells, resulting in reduced tumor growth and increased survival in vaccinated mice [237, 238]. Other drug delivery systems that employ CD133 antibodies and CD133 peptides to eliminate CD133+ cells have shown heterogeneous efficacy and discrete responses in different *in vitro* and *in vivo* cancer models [239–241], likely due to the initial antigen expression on the cell surface and changes in its expression during treatment [242].

As these therapeutic strategies rely on CD133 extracellular domain recognition on the cell surface, understanding its internalization and potential functions in other cellular compartments may enable the development of more reliable CD133-targeted therapies with fewer limitations. Since CD133 expression is not limited to cancer stem-like cells and also stem/progenitor cells and mature cells of various tissues, such as bone marrow, brain, kidney, liver, pancreas, and retina exhibit CD133, it is of paramount importance to elucidate the structural differences caused by post-translational modifications and alternative splicing variants that may mediate diverging functions between tumor and non-tumor cells, which is essential for designing precise therapeutic strategies against cancer and particularly CD133+ subpopulations. Additionally, the potential compensation by prominin-2 should be considered when developing therapies for particular cancer types.

Acknowledgements Angela Patricia Moreno-Londoño 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 and DGAPA-UNAM (IV200220).

Author Contributions All authors contributed to the study conception and design. Specifically, their contributions were: Conceptualization: A.P.M-L and M.R-F; investigation and figure design A.P.M-L. The first draft was performed by A.P.M-L. The final draft was written by A.P.M-L and M.R-F. All authors read and approved the final manuscript.

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

Data Availability Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analyzed during the current study. Other materials such as Figures are within the article.

Declarations

Ethics Approval Not applicable.

Competing Interests 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

- Hatina, J., Kripnerová, M., Houdek, Z., Pešta, M., & Tichánek, F. (2022). Pluripotency stemness and cancer: More questions than answers. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1376, 77–100. https://doi.org/10.1007/5584_2021_663
- Wang, H., Gong, P., Li, J., Fu, Y., Zhou, Z., & Liu, L. (2020). Role of CD133 in human embryonic stem cell proliferation and teratoma formation. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 208. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01729-0>
- Roudi, R., Ebrahimi, M., Sabet, M. N., Najafi, A., Nourani, M. R., Fomeshi, M. R., Samadikuchaksaraei, A., Shariftabrizi, A., & Madjd, Z. (2015). Comparative gene-expression profiling of CD133(+) and CD133(-) D10 melanoma cells. *Future Oncology*, 11(17), 2383–2393. <https://doi.org/10.2217/fon.15.174>
- Liu, C. L., Chen, Y. J., Fan, M. H., Liao, Y. J., & Mao, T. L. (2020). Characteristics of CD133-sustained chemoresistant cancer stem-like cells in human ovarian carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6467. <https://doi.org/10.3390/ijms21186467>
- Jaksch, M., Múnera, J., Bajpai, R., Terskikh, A., & Oshima, R. G. (2008). Cell cycle-dependent variation of a CD133 epitope in human embryonic stem cell, colon cancer, and melanoma cell lines. *Cancer Research*, 68(19), 7882–7886. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0723>
- Barrantes-Freer, A., Renovanz, M., Eich, M., Braukmann, A., Sprang, B., Spirin, P., Pardo, L. A., Giese, A., & Kim, E. L. (2015). CD133 expression is not synonymous to immunoreactivity for AC133 and fluctuates throughout the cell cycle in glioma stem-Like Cells. *PLoS ONE*, 10(6), e0130519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130519>
- Corbeil, D., Röper, K., Hellwig, A., Tavian, M., Miraglia, S., Watt, S. M., Simmons, P. J., Peault, B., Buck, D. W., & Huttner, W. B. (2000). The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5512–5520. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.8.5512>
- Corbeil, D., Marzesco, A. M., Wilsch-Bräuninger, M., & Huttner, W. B. (2010). The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation. *FEBS Letters*, 584(9), 1659–1664. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.050>
- Singer, D., Thamm, K., Zhuang, H., Karbanová, J., Gao, Y., Walker, J. V., Jin, H., Wu, X., Coveney, C. R., Marangoni, P., Lu, D., Grayson, P. R. C., Gulsen, T., Liu, K. J., Ardu, S., Wann, A. K., Luo, S., Zambon, A. C., Jetten, A. M., ... Hu, B. (2019). Prominin-1 controls stem cell activation by orchestrating ciliary dynamics. *The EMBO Journal*, 38(2), e99845. <https://doi.org/10.15252/embj.201899845>
- Izumi, H., Li, Y., Shibaki, M., Mori, D., Yasunami, M., Sato, S., Matsunaga, H., Mae, T., Kodama, K., Kamijo, T., Kaneko, Y., & Nakagawara, A. (2019). Recycling endosomal CD133 functions as an inhibitor of autophagy at the pericentrosomal region. *Science and Reports*, 9(1), 2236. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39229-8>
- Cantile, M., Collina, F., D’Aiuto, M., Rinaldo, M., Pirozzi, G., Borsellino, C., Franco, R., Botti, G., & Di Bonito, M. (2013). Nuclear localization of cancer stem cell marker CD133 in triple-negative breast cancer: A case report. *Tumori*, 99(5), e245–e250. <https://doi.org/10.1177/030089161309900523>
- Nunukova, A., Neradil, J., Skoda, J., Jaros, J., Hampl, A., Sterba, J., & Veselska, R. (2015). Atypical nuclear localization of CD133 plasma membrane glycoprotein in rhabdomyosarcoma cell lines. *International Journal of Molecular Medicine*, 36(1), 65–72. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2210>
- Huang, M., Zhu, H., Feng, J., Ni, S., & Huang, J. (2015). High CD133 expression in the nucleus and cytoplasm predicts poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Disease Markers*, 2015, 986095. <https://doi.org/10.1155/2015/986095>
- Yu, G. F., Lin, X., Luo, R. C., & Fang, W. Y. (2018). Nuclear CD133 expression predicts poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 11(4), 2092–2099.
- Lee, Y. M., Yeo, M. K., Seong, I. O., & Kim, K. H. (2018). Nuclear expression of CD133 Is associated with good prognosis in patients with colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Research*, 38(8), 4819–4826. <https://doi.org/10.21873/anticancer.12792>
- Rossi, E., Poirault-Chassac, S., Bieche, I., Chocron, R., Schnitzler, A., Lokajczyk, A., Bourdoncle, P., Dizier, B., Bacha, N. C., Gendron, N., Blandinieres, A., Guerin, C. L., Gaussem, P., & Smadja, D. M. (2019). Human endothelial Colony forming cells express intracellular CD133 that modulates their vasculogenic properties. *Stem Cell Reviews and Reports*, 15(4), 590–600. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09881-8>
- Chen, Y. L., Lin, P. Y., Ming, Y. Z., Huang, W. C., Chen, R. F., Chen, P. M., & Chu, P. Y. (2017). The effects of the location of cancer stem cell marker CD133 on the prognosis of

- hepatocellular carcinoma patients. *BMC Cancer*, 17(1), 474. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3460-9>
18. Yang, F., Xing, Y., Li, Y., Chen, X., Jiang, J., Ai, Z., & Wei, Y. (2018). Monoubiquitination of cancer stem cell marker CD133 at lysine 848 regulates its secretion and promotes cell migration. *Molecular and Cellular Biology*, 38(15), e00024-e118. <https://doi.org/10.1128/MCB.00024-18>
 19. Fargeas, C. A., Huttner, W. B., & Corbeil, D. (2007). Nomenclature of prominin-1 (CD133) splice variants - an update. *Tissue Antigens*, 69(6), 602–606. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2007.00825.x>
 20. Liu, Y., Ren, S., Xie, L., Cui, C., Xing, Y., Liu, C., Cao, B., Yang, F., Li, Y., Chen, X., Wei, Y., Lu, H., & Jiang, J. (2015). Mutation of N-linked glycosylation at Asn548 in CD133 decreases its ability to promote hepatoma cell growth. *Oncotarget*, 6(24), 20650–60. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4115>
 21. Mak, A. B., Blakely, K. M., Williams, R. A., Penttilä, P. A., Shukalyuk, A. I., Osman, K. T., Kasimer, D., Ketela, T., & Moffat, J. (2011). CD133 protein N-glycosylation processing contributes to cell surface recognition of the primitive cell marker AC133 epitope. *Journal of Biological Chemistry*, 286(47), 41046–41056. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.261545>
 22. Kemper, K., Sprick, M. R., de Bree, M., Scopelliti, A., Vermeulen, L., Hoek, M., Zeilstra, J., Pals, S. T., Mehmet, H., Stassi, G., & Medema, J. P. (2010). The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Research*, 70(2), 719–729. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1820>
 23. Stanley, P., Moremen, K. W., Lewis, N. E., et al. (2022). N-Glycans. In A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, et al. (Eds.), *Essentials of glycobiology* (4th ed., Internet). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <https://doi.org/10.1101/glycobiology.4e.9>. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579964/>
 24. Wei, Y., Chen, Q., Huang, S., Liu, Y., Li, Y., Xing, Y., Shi, D., Xu, W., Liu, W., Ji, Z., Wu, B., Chen, X., & Jiang, J. (2022). The interaction between DNMT1 and high-mannose CD133 maintains the slow-cycling state and tumorigenic potential of glioma stem cell. *Advanced Science (Weinh)*, 9(26), e2202216. <https://doi.org/10.1002/advs.202202216>
 25. Mak, A. B., Nixon, A. M., Kittanakom, S., Stewart, J. M., Chen, G. I., Curak, J., Gingras, A. C., Mazitschek, R., Neel, B. G., Stagljar, I., & Moffat, J. (2012). Regulation of CD133 by HDAC6 promotes β -catenin signaling to suppress cancer cell differentiation. *Cell Reports*, 2(4), 951–963. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.09.016>
 26. Ding, Y., Dellisanti, C. D., Ko, M. H., Czajkowski, C., & Puglielli, L. (2014). The endoplasmic reticulum-based acetyltransferases, ATase1 and ATase2, associate with the oligosaccharyltransferase to acetylate correctly folded polypeptides. *Journal of Biological Chemistry*, 289(46), 32044–32055. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.585547>
 27. Mak, A. B., Pehar, M., Nixon, A. M., Williams, R. A., Uetrecht, A. C., Puglielli, L., & Moffat, J. (2014). Post-translational regulation of CD133 by ATase1/ATase2-mediated lysine acetylation. *Journal of Molecular Biology*, 426(11), 2175–2182. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.02.012>
 28. Zhou, F., Cui, C., Ge, Y., Chen, H., Li, Q., Yang, Z., Wu, G., Sun, S., Chen, K., Gu, J., Jiang, J., & Wei, Y. (2010). Alpha 2,3-sialylation regulates the stability of stem cell marker CD133. *Journal of Biochemistry*, 148(3), 273–280. <https://doi.org/10.1093/jb/mvq062>
 29. Dobie, C., & Skropeta, D. (2021). Insights into the role of sialylation in cancer progression and metastasis. *British Journal of Cancer*, 124(1), 76–90. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01126-7>
 30. Pietrobono, S., & Stecca, B. (2021). Aberrant sialylation in cancer: Biomarker and potential target for therapeutic intervention? *Cancers (Basel)*, 13(9), 2014. <https://doi.org/10.3390/cancers13092014>
 31. Gao, Y. S., Hubbert, C. C., & Yao, T. P. (2010). The microtubule-associated histone deacetylase 6 (HDAC6) regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytic trafficking and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11219–11226. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.042754>
 32. Wattanathamsan, O., Chantaravisoot, N., Wongkongkathep, P., Kungsukool, S., Chetprayoon, P., Chanvorachote, P., Vinayanuwattikun, C., & Pongrakhananon, V. (2023). Inhibition of histone deacetylase 6 destabilizes ERK phosphorylation and suppresses cancer proliferation via modulation of the tubulin acetylation-GRP78 interaction. *Journal of Biomedical Science*, 30(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00898-3>
 33. Liu, K., Jiang, L., Shi, Y., Liu, B., He, Y., Shen, Q., Jiang, X., Nie, Z., Pu, J., Yang, C., & Chen, Y. (2022). Hypoxia-induced GLT8D1 promotes glioma stem cell maintenance by inhibiting CD133 degradation through N-linked glycosylation. *Cell Death and Differentiation*, 29(9), 1834–1849. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00969-2>
 34. Xu, D., Shao, F., Bian, X., Meng, Y., Liang, T., & Lu, Z. (2021). The evolving landscape of noncanonical functions of metabolic enzymes in cancer and other pathologies. *Cell Metabolism*, 33(1), 33–50. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.12.015>
 35. He, H., Xiao, L., Wang, J., Guo, D., & Lu, Z. (2023). Aerobic glycolysis promotes tumor immune evasion and tumor cell stemness through the noncanonical function of hexokinase 2. *Cancer Communications (Lond)*, 43(3), 387–390. <https://doi.org/10.1002/cac2.12404>
 36. Wang, J., Shao, F., Yang, Y., Wang, W., Yang, X., Li, R., Cheng, H., Sun, S., Feng, X., Gao, Y., He, J., & Lu, Z. (2022). A non-metabolic function of hexokinase 2 in small cell lung cancer: Promotes cancer cell stemness by increasing USP11-mediated CD133 stability. *Cancer Communications (Lond)*, 42(10), 1008–1027. <https://doi.org/10.1002/cac2.12351>
 37. Shi, L., Pan, H., Liu, Z., Xie, J., & Han, W. (2017). Roles of PFKFB3 in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 17044. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.44>
 38. Thirusangu, P., Ray, U., Sarkar Bhattacharya, S., Oien, D. B., Jin, L., Staub, J., Kannan, N., Molina, J. R., & Shridhar, V. (2022). PFKFB3 regulates cancer stemness through the hippo pathway in small cell lung carcinoma. *Oncogene*, 41(33), 4003–4017. <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02391-x>. Erratum in: *Oncogene*. 2023 Jan;42(1):79-82.
 39. Sarkar Bhattacharya, S., Thirusangu, P., Jin, L., Staub, J., Shridhar, V., & Molina, J. R. (2022). PFKFB3 works on the FAK-STAT3-SOX2 axis to regulate the stemness in MPM. *British Journal of Cancer*, 127(7), 1352–1364. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01867-7>
 40. Song, K., Kwon, H., Han, C., Zhang, J., Dash, S., Lim, K., & Wu, T. (2015). Active glycolytic metabolism in CD133(+) hepatocellular cancer stem cells: regulation by MIR-122. *Oncotarget*, 6(38), 40822–35. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5812>
 41. Zhao, H., Hu, C. Y., Chen, W. M., & Huang, P. (2019). Lactate promotes cancer stem-like property of Oral squamous cell carcinoma. *Current Medical Science*, 39(3), 403–409. <https://doi.org/10.1007/s11596-019-2050-2>
 42. Zhao, H., Yan, C., Hu, Y., Mu, L., Liu, S., Huang, K., Li, Q., Li, X., Tao, D., & Qin, J. (2020). Differentiated cancer cell-originated lactate promotes the self-renewal of cancer stem cells in patient-derived colorectal cancer organoids. *Cancer Letters*, 493, 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.08.044>
 43. Shegay, P. V., Zabolotneva, A. A., Shatova, O. P., Shestopalov, A. V., & Kaprin, A. D. (2022). Evolutionary view on lactate-dependent mechanisms of maintaining cancer cell stemness and

- reprimativization. *Cancers (Basel)*, 14(19), 4552. <https://doi.org/10.3390/cancers14194552>
44. Shmelkov, S. V., Jun, L., St Clair, R., McGarrigle, D., Derderian, C. A., Usenko, J. K., Costa, C., Zhang, F., Guo, X., & Rafii, S. (2004). Alternative promoters regulate transcription of the gene that encodes stem cell surface protein AC133. *Blood*, 103(6), 2055–2061. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-1881>
 45. Tabu, K., Sasai, K., Kimura, T., Wang, L., Aoyanagi, E., Kohsaka, S., Tanino, M., Nishihara, H., & Tanaka, S. (2008). Promoter hypomethylation regulates CD133 expression in human gliomas. *Cell Research*, 18(10), 1037–1046. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.270>
 46. Sompallae, R., Hofmann, O., Maher, C. A., Gedye, C., Behren, A., Vitezic, M., Daub, C. O., Devalle, S., Caballero, O. L., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Lawlor, E. R., Cebon, J., & Hide, W. (2013). A comprehensive promoter landscape identifies a novel promoter for CD133 in restricted tissues, cancers, and stem cells. *Frontiers in Genetics*, 4, 209. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00209>
 47. Yi, J. M., Tsai, H. C., Glöckner, S. C., Lin, S., Ohm, J. E., Easwaran, H., James, C. D., Costello, J. F., Riggins, G., Eberhart, C. G., Laterra, J., Vescovi, A. L., Ahuja, N., Herman, J. G., Schuebel, K. E., & Baylin, S. B. (2008). Abnormal DNA methylation of CD133 in colorectal and glioblastoma tumors. *Cancer Research*, 68(19), 8094–8103. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6208>
 48. Baba, T., Convery, P. A., Matsumura, N., Whitaker, R. S., Kondoh, E., Perry, T., Huang, Z., Bentley, R. C., Mori, S., Fujii, S., Marks, J. R., Berchuck, A., & Murphy, S. K. (2009). Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133+ ovarian cancer cells. *Oncogene*, 28(2), 209–218. <https://doi.org/10.1038/ncr.2008.374>
 49. Friel, A. M., Zhang, L., Curley, M. D., Therrien, V. A., Sergeant, P. A., Belden, S. E., Borger, D. R., Mohapatra, G., Zukerberg, L. R., Foster, R., & Rueda, B. R. (2010). Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133 positive and negative endometrial cancer cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8, 147. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-147>
 50. Geddert, H., Braun, A., Kayser, C., Dimmler, A., Faller, G., Agaimy, A., Haller, F., & Moskalev, E. A. (2017). Epigenetic regulation of CD133 in gastrointestinal stromal tumors. *American Journal of Clinical Pathology*, 147(5), 515–524. <https://doi.org/10.1093/ajcp/axq028>
 51. Caja, L., Bellomo, C., & Moustakas, A. (2015). Transforming growth factor β and bone morphogenetic protein actions in brain tumors. *FEBS Letters*, 589(14), 1588–1597. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.058>
 52. You, H., Ding, W., & Rountree, C. B. (2010). Epigenetic regulation of cancer stem cell marker CD133 by transforming growth factor-beta. *Hepatology*, 51(5), 1635–1644. <https://doi.org/10.1002/hep.23544>
 53. Ikushima, H., Todo, T., Ino, Y., Takahashi, M., Miyazawa, K., & Miyazono, K. (2009). Autocrine TGF-beta signaling maintains tumorigenicity of glioma-initiating cells through Sry-related HMG-box factors. *Cell Stem Cell*, 5(5), 504–514. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.08.018>. Erratum in: *Cell Stem Cell*. 2009;5(6):666.
 54. Tanabe, R., Miyazono, K., Todo, T., Saito, N., Iwata, C., Komuro, A., Sakai, S., Raja, E., Koinuma, D., Morikawa, M., Westermark, B., & Heldin, C. H. (2022). PRRX1 induced by BMP signaling decreases tumorigenesis by epigenetically regulating glioma-initiating cell properties via DNA methyltransferase 3A. *Molecular Oncology*, 16(1), 269–288. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13051>
 55. Pellacani, D., Packer, R. J., Frame, F. M., Oldridge, E. E., Berry, P. A., Labarthe, M. C., Stower, M. J., Simms, M. S., Collins, A. T., & Maitland, N. J. (2011). Regulation of the stem cell marker CD133 is independent of promoter hypermethylation in human epithelial differentiation and cancer. *Molecular Cancer*, 10, 94. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-94>
 56. Zhang, W., Chai, W., Zhu, Z., & Li, X. (2020). Aldehyde oxidase 1 promoted the occurrence and development of colorectal cancer by up-regulation of expression of CD133. *International Immunopharmacology*, 85, 106618. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106618>
 57. Tao, H., Li, H., Su, Y., Feng, D., Wang, X., Zhang, C., Ma, H., & Hu, Q. (2014). Histone methyltransferase G9a and H3K9 dimethylation inhibit the self-renewal of glioma cancer stem cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 394(1–2), 23–30. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2077-4>
 58. Godfrey, L., Crump, N. T., O'Byrne, S., Lau, I. J., Rice, S., Harman, J. R., Jackson, T., Elliott, N., Buck, G., Connor, C., Thorne, R., Knapp, D. J. H. F., Heidenreich, O., Vyas, P., Menendez, P., Ingloft, S., Ancliff, P., Geng, H., Roberts, I., ... Milne, T. A. (2021). H3K79me2/3 controls enhancer-promoter interactions and activation of the pan-cancer stem cell marker PROM1/CD133 in MLL-AF4 leukemia cells. *Leukemia*, 35(1), 90–106. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0808-y>
 59. Eyler, C. E., Foo, W. C., LaFiura, K. M., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. (2008). Brain cancer stem cells display preferential sensitivity to Akt inhibition. *Stem Cells*, 26(12), 3027–3036. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1073>
 60. He, Y., Sun, M. M., Zhang, G. G., Yang, J., Chen, K. S., Xu, W. W., & Li, B. (2021). Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 425.
 61. Wei, Y., Jiang, Y., Zou, F., Liu, Y., Wang, S., Xu, N., Xu, W., Cui, C., Xing, Y., Liu, Y., Cao, B., Liu, C., Wu, G., Ao, H., Zhang, X., & Jiang, J. (2013). Activation of PI3K/Akt pathway by CD133-p85 interaction promotes tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 6829–6834. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217002110>
 62. Shimozato, O., Waraya, M., Nakashima, K., Souda, H., Takiguchi, N., Yamamoto, H., Takenobu, H., Uehara, H., Ikeda, E., Matsushita, S., Kubo, N., Nakagawara, A., Ozaki, T., & Kamijo, T. (2015). Receptor-type protein tyrosine phosphatase κ directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation. *Oncogene*, 34(15), 1949–1960.
 63. Matsushita, M., Mori, Y., Uchiumi, K., Ogata, T., Nakamura, M., Yoda, H., Soda, H., Takiguchi, N., Nabeya, Y., Shimozato, O., & Ozaki, T. (2019). PTPRK suppresses progression and chemo-resistance of colon cancer cells via direct inhibition of pro-oncogenic CD133. *FEBS Open Bio*, 9(5), 935–946. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12636>
 64. Mori, Y., Takeuchi, A., Miyagawa, K., Yoda, H., Soda, H., Nabeya, Y., Watanabe, N., Ozaki, T., & Shimozato, O. (2021). CD133 prevents colon cancer cell death induced by serum deprivation through activation of Akt-mediated protein synthesis and inhibition of apoptosis. *FEBS Open Bio*, 11(5), 1382–1394. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13145>
 65. Kim, S., Cho, C. Y., Lee, D., Song, D. G., Kim, H. J., Jung, J. W., Kim, J. E., Park, D., Lee, H., Um, H., Park, J., Choi, Y., Kim, Y., Nam, S. H., & Lee, J. W. (2018). CD133-induced TM4SF5 expression promotes sphere growth via recruitment and blocking of protein tyrosine phosphatase receptor type F (PTPRF). *Cancer Letters*, 438, 219–231. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.09.009>

66. Bera, R., Chiou, C. Y., Yu, M. C., Peng, J. M., He, C. R., Hsu, C. Y., Huang, H. L., Ho, U. Y., Lin, S. M., Lin, Y. J., & Hsieh, S. Y. (2014). Functional genomics identified a novel protein tyrosine phosphatase receptor type F-mediated growth inhibition in hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, *59*(6), 2238–2250. <https://doi.org/10.1002/hep.27030>
67. Song, H. E., Lee, Y., Kim, E., Cho, C. Y., Jung, O., Lee, D., Lee, E. G., Nam, S. H., Kang, M., Macalino, S. J. Y., Kim, J. E., Jung, J. W., Kwon, S. W., Choi, S., & Lee, J. W. (2021). N-terminus-independent activation of c-Src via binding to a tetraspan(in) TM4SF5 in hepatocellular carcinoma is abolished by the TM4SF5 C-terminal peptide application. *Theranostics*, *11*(16), 8092–8111. <https://doi.org/10.7150/thno.58739>
68. Weng, C. C., Kuo, K. K., Su, H. T., Hsiao, P. J., Chen, Y. W., Wu, D. C., Hung, W. C., & Cheng, K. H. (2016). Pancreatic tumor progression associated with CD133 overexpression: involvement of increased TERT expression and epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation. *Pancreas*, *45*(3), 443–457. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000460>
69. Jang, J. W., Song, Y., Kim, S. H., Kim, J. S., Kim, K. M., Choi, E. K., Kim, J., & Seo, H. R. (2017). CD133 confers cancer stem-like cell properties by stabilizing EGFR-AKT signaling in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, *389*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.12.023>
70. Kim, H., Ju, J. H., Son, S., & Shin, I. (2020). Silencing of CD133 inhibits GLUT1-mediated glucose transport through downregulation of the HER3/Akt/mTOR pathway in colon cancer. *FEBS Letters*, *594*(6), 1021–1035. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13686>
71. Graham, J. R., Hendershott, M. C., Terragni, J., & Cooper, G. M. (2010). mRNA degradation plays a significant role in the program of gene expression regulated by phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(22), 5295–5305. <https://doi.org/10.1128/MCB.00303-10>
72. Li, H., Wang, C., Lan, L., Yan, L., Li, W., Evans, I., Ruiz, E. J., Su, Q., Zhao, G., Wu, W., Zhang, H., Zhou, Z., Hu, Z., Chen, W., Oliveira, J. M., Behrens, A., Reis, R. L., & Zhang, C. (2022). METTL3 promotes oxaliplatin resistance of gastric cancer CD133+ stem cells by promoting PARP1 mRNA stability. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *79*(3), 135. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04129-0>
73. Liu, C., Li, Y., Xing, Y., Cao, B., Yang, F., Yang, T., Ai, Z., Wei, Y., & Jiang, J. (2016). The interaction between cancer stem cell marker CD133 and Src protein promotes focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation and cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(30), 15540–15550. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.712976>
74. Ortiz, M. A., Mikhailova, T., Li, X., et al. (2021). Src family kinases, adaptor proteins and the actin cytoskeleton in epithelial-to-mesenchymal transition. *Cell Communication and Signaling: CCS*, *19*, 67. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00750-x>
75. Chen, Y. S., Wu, M. J., Huang, C. Y., Lin, S. C., Chuang, T. H., Yu, C. C., & Lo, J. F. (2011). CD133/Src axis mediates tumor initiating property and epithelial-mesenchymal transition of head and neck cancer. *PLoS ONE*, *6*(11), e28053. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028053>
76. Cai, C., Yu, J. W., Wu, J. G., Lu, R. Q., Ni, X. C., Wang, S. L., & Jiang, B. J. (2013). CD133 promotes the invasion and metastasis of gastric cancer via epithelial-mesenchymal transition. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi*, *16*(7), 662–667.
77. Ding, Q., Miyazaki, Y., Tsukasa, K., Matsubara, S., Yoshimitsu, M., & Takao, S. (2014). CD133 facilitates epithelial-mesenchymal transition through interaction with the ERK pathway in pancreatic cancer metastasis. *Molecular Cancer*, *13*, 15. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-15>
78. Patel, A., Sabbineni, H., Clarke, A., & Somanath, P. R. (2016). Novel roles of Src in cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition, vascular permeability, microinvasion and metastasis. *Life Sciences*, *157*, 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.05.036>
79. Lamar, J. M., Xiao, Y., Norton, E., Jiang, Z. G., Gerhard, G. M., Kooner, S., Warren, J. S. A., & Hynes, R. O. (2019). SRC tyrosine kinase activates the YAP/TAZ axis and thereby drives tumor growth and metastasis. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(7), 2302–2317. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004364>
80. Oh, H. T., Heo, W., Yoo, G. D., Kim, K. M., Hwang, J. H., Hwang, E. S., Ko, J., Ko, Y. G., & Hong, J. H. (2022). CD133-Src-TAZ signaling stimulates ductal fibrosis following DDC diet-induced liver injury. *Journal of Cellular Physiology*, *237*(12), 4504–4516. <https://doi.org/10.1002/jcp.30899>
81. Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., Inui, M., Montagner, M., Parenti, A. R., Poletti, A., Daidone, M. G., Dupont, S., Basso, G., Bicciato, S., & Piccolo, S. (2011). The hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell*, *147*(4), 759–772. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.048>
82. Byun, M. R., Hwang, J. H., Kim, A. R., Kim, K. M., Park, J. I., Oh, H. T., Hwang, E. S., & Hong, J. H. (2017). SRC activates TAZ for intestinal tumorigenesis and regeneration. *Cancer Letters*, *410*, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.09.003>
83. Jayabal, P., Zhou, F., Lei, X., Ma, X., Blackman, B., Weintraub, S. T., Houghton, P. J., & Shiao, Y. (2021). NELL2-cdc42 signaling regulates BAF complexes and Ewing sarcoma cell growth. *Cell Reports*, *36*(1), 109254. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109254>
84. Alfert, A., Moreno, N., & Kerl, K. (2019). The BAF complex in development and disease. *Epigenetics & Chromatin*, *12*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13072-019-0264-y>
85. Gao, C., Xiao, G., & Hu, J. (2014). Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by posttranslational modifications. *Cell & Bioscience*, *4*(1), 13. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-13>
86. You, H., Li, Q., Kong, D., Liu, X., Kong, F., Zheng, K., & Tang, R. (2022). The interaction of canonical Wnt/ β -catenin signaling with protein lysine acetylation. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *27*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s11658-021-00305-5>
87. Katoh, Y., & Katoh, M. (2007). Comparative genomics on PROM1 gene encoding stem cell marker CD133. *International Journal of Molecular Medicine*, *19*(6), 967–970.
88. Tang, Y., Berling, J., & Mavila, N. (2018). Inhibition of CREB binding protein-beta-catenin signaling down regulates CD133 expression and activates PP2A-PTEN signaling in tumor initiating liver cancer cells. *Cell Communication and Signaling: CCS*, *16*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0222-5>
89. Tremblay, J. R., Lopez, K., & Ku, H. T. (2019). A GLIS3-CD133-WNT-signaling axis regulates the self-renewal of adult murine pancreatic progenitor-like cells in colonies and organoids. *The Journal of Biological Chemistry*, *294*(45), 16634–16649. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002818>. Erratum in: *J Biol Chem.*, *295*(15):5175.
90. Brossa, A., Papadimitriou, E., Collino, F., Incarnato, D., Oliviero, S., Camussi, G., & Bussolati, B. (2018). Role of CD133 molecule in Wnt response and renal repair. *Stem Cells Translational Medicine*, *7*(3), 283–294. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0158>
91. Nelson, W. J., & Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*, *303*(5663), 1483–1487. <https://doi.org/10.1126/science.1094291>
92. Shah, K., & Kazi, J. U. (2022). Phosphorylation-dependent regulation of WNT/BETA-catenin signaling. *Frontiers in Oncology*, *12*, 858782. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.858782>
93. Song, W., Zhang, D., Mi, J., Du, W., Yang, Y., Chen, R., Tian, C., Zhao, X., & Zou, K. (2022). E-cadherin maintains the undifferentiated state of mouse spermatogonial progenitor cells via

- β -catenin. *Cell & Bioscience*, 12(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00880-w>
94. Mendonsa, A. M., Na, T. Y., & Gumbiner, B. M. (2018). E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene*, 37(35), 4769–4780. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0304-2>
 95. Lee, J., Shin, J. E., Lee, B., Kim, H., Jeon, Y., Ahn, S. H., Chi, S. W., & Cho, Y. (2020). The stem cell marker Prom1 promotes axon regeneration by down-regulating cholesterol synthesis via Smad signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(27), 15955–15966. <https://doi.org/10.1073/pnas.1920829117>
 96. Roselló-Busquets, C., de la Oliva, N., Martínez-Mármol, R., Hernaiz-Llorens, M., Pascual, M., Muhaisen, A., Navarro, X., Del Valle, J., & Soriano, E. (2019). Cholesterol depletion regulates axonal growth and enhances central and peripheral nerve regeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 40. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00040>
 97. Yan, X., & Chen, Y. G. (2011). Smad7: Not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- β signalling. *The Biochemical Journal*, 434(1), 1–10. <https://doi.org/10.1042/BJ20101827>
 98. Lee, H., Yu, D. M., Bahn, M. S., Kwon, Y. J., Um, M. J., Yoon, S. Y., Kim, K. T., Lee, M. W., Jo, S. J., Lee, S., Koo, S. H., Jung, K. H., Lee, J. S., & Ko, Y. G. (2022). Hepatocyte-specific Prominin-1 protects against liver injury-induced fibrosis by stabilizing SMAD7. *Experimental & Molecular Medicine*, 54(8), 1277–1289. <https://doi.org/10.1038/s12276-022-00831-y>
 99. Wheway, G., Nazlamova, L., & Hancock, J. T. (2018). Signaling through the primary cilium. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00008>
 100. Skoda, A. M., Simovic, D., Karin, V., Kardum, V., Vranic, S., & Serman, L. (2018). The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(1), 8–20. <https://doi.org/10.17305/bjbm.2018.2756>
 101. Ferent, J., Cochard, L., Faure, H., Taddei, M., Hahn, H., Ruat, M., & Traiffort, E. (2014). Genetic activation of hedgehog signaling unbalances the rate of neural stem cell renewal by increasing symmetric divisions. *Stem Cell Reports*, 3(2), 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.016>
 102. Pyczek, J., Buslei, R., Schult, D., Hölsken, A., Buchfelder, M., Heß, I., Hahn, H., & Uhmman, A. (2016). Hedgehog signaling activation induces stem cell proliferation and hormone release in the adult pituitary gland. *Science and Reports*, 6, 24928. <https://doi.org/10.1038/srep24928>
 103. Shimada, I. S., & Kato, Y. (2022). Ciliary signaling in stem cells in health and disease: Hedgehog pathway and beyond. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 129, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.04.011>
 104. Kong, J. H., Siebold, C., & Rohatgi, R. (2019). Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Development*, 146(10), dev166892. <https://doi.org/10.1242/dev.166892>
 105. Jetten, A. M. (2018). GLIS1-3 transcription factors: Critical roles in the regulation of multiple physiological processes and diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(19), 3473–3494. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2841-9>
 106. Jetten, A. M. (2019). Emerging roles of GLI-similar Krüppel-like zinc finger transcription factors in leukemia and other cancers. *Trends Cancer*, 5(9), 547–557. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.07.005>
 107. Zhao, L., Zhao, J., Zhong, K., Tong, A., & Jia, D. (2022). Targeted protein degradation: Mechanisms, strategies and application. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 113. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00966-4>
 108. Galluzzi, L., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cecconi, F., Choi, A. M., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E. L., Fimia, G. M., Fulda, S., Gewirtz, D. A., Green, D. R., ... Kroemer, G. (2017). Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*, 36(13), 1811–1836. <https://doi.org/10.15252/embj.201796697>
 109. Kim, K. H., & Lee, M. S. (2014). Autophagy a key player in cellular and body metabolism. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(6), 322–337. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2014.35>
 110. Chen, H., Luo, Z., Dong, L., Tan, Y., Yang, J., Feng, G., Wu, M., Li, Z., & Wang, H. (2013). CD133/prominin-1-mediated autophagy and glucose uptake beneficial for hepatoma cell survival. *PLoS ONE*, 8(2), e56878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056878>
 111. Sun, H., Zhang, M., Cheng, K., Li, P., Han, S., Li, R., Su, M., Zeng, W., Liu, J., Guo, J., Liu, Y., Zhang, X., He, Q., & Shen, L. (2016). Resistance of glioma cells to nutrient-deprived microenvironment can be enhanced by CD133-mediated autophagy. *Oncotarget*, 7(46), 76238–76249. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12803>
 112. Izumi, H., Li, Y., Yasunami, M., Sato, S., Mae, T., Kaneko, Y., & Nakagawara, A. (2022). Asymmetric pericentrosomal CD133 endosomes induce the unequal autophagic activity during cytokinesis in CD133-positive human neuroblastoma cells. *Stem Cells*, 40(4), 371–384.
 113. Sharif, T., Martell, E., Dai, C., Kennedy, B. E., Murphy, P., Clements, D. R., Kim, Y., Lee, P. W., & Gujar, S. A. (2017). Autophagic homeostasis is required for the pluripotency of cancer stem cells. *Autophagy*, 13(2), 264–284. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1260808>
 114. Fargeas, C. A., Florek, M., Huttner, W. B., & Corbeil, D. (2003). Characterization of prominin-2, a new member of the prominin family of pentaspan membrane glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8586–8596. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210640200>
 115. Fargeas, C. A., Büttner, E., & Corbeil, D. (2015). Commentary: “prom1 function in development, intestinal inflammation, and intestinal tumorigenesis.” *Frontiers in Oncology*, 5, 91. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00091>
 116. Thamm, K., Šimaitė, D., Karbanová, J., Bermúdez, V., Reichert, D., Morgenstern, A., Bornhäuser, M., Huttner, W. B., Wilsch-Bräuninger, M., & Corbeil, D. (2019). Prominin-1 (CD133) modulates the architecture and dynamics of microvilli. *Traffic*, 20(1), 39–60. <https://doi.org/10.1111/tra.12618>
 117. Röper, K., Corbeil, D., & Huttner, W. (2000). Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid microdomains in the apical plasma membrane. *Nature Cell Biology*, 2, 582–592. <https://doi.org/10.1038/35023524>
 118. Stilling, S., Kalliakoudas, T., Benninghoven-Frey, H., Inoue, T., & Falkenburger, B. H. (2022). PIP2 determines length and stability of primary cilia by balancing membrane turnovers. *Communications Biology*, 5(1), 93. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03028-1>
 119. Jászai, J., Thamm, K., Karbanová, J., Janich, P., Fargeas, C. A., Huttner, W. B., & Corbeil, D. (2020). Prominins control ciliary length throughout the animal kingdom: New lessons from human prominin-1 and zebrafish prominin-3. *Journal of Biological Chemistry*, 295(18), 6007–6022. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011253>
 120. Hori, A., Nishide, K., Yasukuni, Y., Haga, K., Kakuta, W., Ishikawa, Y., Hayes, M. J., Ohnuma, S. I., Kiyonari, H., Kimura, K., Kondo, T., & Sasai, N. (2019). Prominin-1 modulates RHO/ROCK-mediated membrane morphology and calcium-dependent intracellular chloride flux. *Science and Reports*, 9(1), 15911. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52040-9>

121. Larkins, C. E., Aviles, G. D., East, M. P., Kahn, R. A., & Caspary, T. (2011). Arl13b regulates ciliogenesis and the dynamic localization of Shh signaling proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 22(23), 4694–4703. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-12-0994>
122. Iommarini, L., Porcelli, A. M., Gasparre, G., & Kurelac, I. (2017). Non-canonical mechanisms regulating hypoxia-inducible factor 1 alpha in cancer. *Frontiers in Oncology*, 7, 286. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00286>
123. Ohnishi, S., Maehara, O., Nakagawa, K., Kameya, A., Otaki, K., Fujita, H., Higashi, R., Takagi, K., Asaka, M., Sakamoto, N., Kobayashi, M., & Takeda, H. (2013). Hypoxia-inducible factors activate CD133 promoter through ETS family transcription factors. *PLoS ONE*, 8(6), e66255. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066255>
124. Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R. D., Engh, J., Iwama, T., Kunisada, T., Kassam, A. B., Pollack, I. F., & Park, D. M. (2009). Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene*, 28(45), 3949–3959. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.252>
125. Hashimoto, O., Shimizu, K., Semba, S., Chiba, S., Ku, Y., Yokozaki, H., & Hori, Y. (2011). Hypoxia induces tumor aggressiveness and the expansion of CD133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1 α -dependent manner in pancreatic cancer cells. *Pathobiology*, 78(4), 181–192. <https://doi.org/10.1159/000325538>
126. Liu, H., Liu, C., & Qu, Y. (2021). The effect and molecular mechanism of hypoxia on proliferation and apoptosis of CD133+ renal stem cells. *Bosnian Journal of Basic Medical Science*, 21(3), 313–322. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2020.4887>
127. Lida, H., Suzuki, M., Goitsuka, R., & Ueno, H. (2012). Hypoxia induces CD133 expression in human lung cancer cells by up-regulation of OCT3/4 and SOX2. *International Journal of Oncology*, 40(1), 71–79. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1207>
128. Wang, P., Zhao, L., Gong, S., Xiong, S., Wang, J., Zou, D., Pan, J., Deng, Y., Yan, Q., Wu, N., & Liao, B. (2021). HIF1 α /HIF2 α -Sox2/Klf4 promotes the malignant progression of glioblastoma via the EGFR-PI3K/AKT signalling pathway with positive feedback under hypoxia. *Cell Death & Disease*, 12(4), 312. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03598-8>
129. Xiong, S., Wang, D., Tang, Y., Lu, S., Huang, L., Wu, Z., Lei, S., Liang, G., Yang, D., Li, D., & Li, Y. (2023). HIF1 α and HIF2 α regulate non-small-cell lung cancer dedifferentiation via expression of Sox2 and Oct4 under hypoxic conditions. *Gene*, 863, 147288. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147288>
130. Covelto, K. L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J. D., Arsham, A. M., Hu, C. J., Labosky, P. A., Simon, M. C., & Keith, B. (2006). HIF-2alpha regulates Oct-4: Effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & Development*, 20(5), 557–570. <https://doi.org/10.1101/gad.1399906>
131. Chen, G., Liu, B., Yin, S., Li, S., Guo, Y., Wang, M., Wang, K., & Wan, X. (2020). Hypoxia induces an endometrial cancer stem-like cell phenotype via HIF-dependent demethylation of SOX2 mRNA. *Oncogenesis*, 9(9), 81. <https://doi.org/10.1038/s41389-020-00265-z>
132. Nayak, A., Roy, A. D., Rout, N., Singh, S. P., Bhattacharyya, A., & Roychowdhury, A. (2020). HIF1 α -dependent upregulation of ATAD2 promotes proliferation and migration of stomach cancer cells in response to hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 523(4), 916–923. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.130>
133. Hao, S., Li, F., Jiang, P., & Gao, J. (2022). Effect of chronic intermittent hypoxia-induced HIF-1 α /ATAD2 expression on lung cancer stemness. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27(1), 44. <https://doi.org/10.1186/s11658-022-00345-5>
134. Fu, J., Zhang, J., Chen, X., Liu, Z., Yang, X., He, Z., Hao, Y., Liu, B., & Yao, D. (2023). ATPase family AAA domain-containing protein 2 (ATAD2): From an epigenetic modulator to cancer therapeutic target. *Theranostics*, 13(2), 787–809. <https://doi.org/10.7150/thno.78840>
135. Wang, T., Perazza, D., Boussouar, F., Cattaneo, M., Bougdour, A., Chuffart, F., Barral, S., Vargas, A., Liakopoulou, A., Puthier, D., Bargier, L., Morozumi, Y., Jamshidikia, M., Garcia-Saez, I., Petosa, C., Rousseaux, S., Verdel, A., & Khochbin, S. (2021). ATAD2 controls chromatin-bound HIRA turnover. *Life Science Alliance*, 4(12), e202101151. <https://doi.org/10.26508/lsa.202101151>
136. Wang, P., Gong, S., Liao, B., Pan, J., Wang, J., Zou, D., Zhao, L., Xiong, S., Deng, Y., Yan, Q., & Wu, N. (2022). HIF1 α /HIF2 α induces glioma cell dedifferentiation into cancer stem cells through Sox2 under hypoxic conditions. *Journal of Cancer*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.7150/jca.54402>
137. Wang, P., Wan, W., Xiong, S., Wang, J., Zou, D., Lan, C., Yu, S., Liao, B., Feng, H., & Wu, N. (2017). HIF1 α regulates glioma chemosensitivity through the transformation between differentiation and dedifferentiation in various oxygen levels. *Science and Reports*, 7(1), 7965. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06086-2>
138. Hu, Y. Y., Fu, L. A., Li, S. Z., Chen, Y., Li, J. C., Han, J., Liang, L., Li, L., Ji, C. C., Zheng, M. H., & Han, H. (2014). Hif-1 α and Hif-2 α differentially regulate Notch signaling through competitive interaction with the intracellular domain of Notch receptors in glioma stem cells. *Cancer Letters*, 349(1), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.03.035>
139. Wu, K., Wu, M., Yang, H., Diao, R., & Zeng, H. (2023). Hypoxia promotes conversion to a stem cell phenotype in prostate cancer cells by activating HIF-1 α /Notch1 signaling pathway. *Clinical and Translational Oncology*, 25(7), 2138–2152. <https://doi.org/10.1007/s12094-023-03093-w>
140. Bhuria, V., Xing, J., Scholta, T., Bui, K. C., Nguyen, M. L. T., Malek, N. P., Bozko, P., & Plentz, R. R. (2019). Hypoxia induced Sonic Hedgehog signaling regulates cancer stemness, epithelial-to-mesenchymal transition and invasion in cholangiocarcinoma. *Experimental Cell Research*, 385(2), 111671. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111671>
141. Kaidi, A., Williams, A. C., & Paraskeva, C. (2007). Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nature Cell Biology*, 9(2), 210–217. <https://doi.org/10.1038/ncb1534>
142. Choi, H., Chun, Y. S., Kim, T. Y., & Park, J. W. (2010). HIF-2alpha enhances beta-CATENIN/TCF-driven transcription by interacting with beta-catenin. *Cancer Research*, 70(24), 10101–10111. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0505>
143. Miao, Z., Zhao, X., & Liu, X. (2023). Hypoxia induced β -catenin lactylation promotes the cell proliferation and stemness of colorectal cancer through the wnt signaling pathway. *Experimental Cell Research*, 422(1), 113439. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2022.113439>
144. Mazumdar, J., O'Brien, W. T., Johnson, R. S., LaManna, J. C., Chavez, J. C., Klein, P. S., & Simon, M. C. (2010). O2 regulates stem cells through Wnt/ β -catenin signalling. *Nature Cell Biology*, 12(10), 1007–1013. <https://doi.org/10.1038/ncb2102>
145. Knaus, U. G. (2021). Oxidants in physiological processes. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 264, 27–47. https://doi.org/10.1007/164_2020_380
146. Tang, Y., Zhang, Z., Chen, Y., Qin, S., Zhou, L., Gao, W., & Shen, Z. (2022). Metabolic adaptation-mediated cancer survival and progression in oxidative stress. *Antioxidants (Basel)*, 11(7), 1324. <https://doi.org/10.3390/antiox11071324>
147. Chien, C. H., Chuang, J. Y., Yang, S. T., Yang, W. B., Chen, P. Y., Hsu, T. I., Huang, C. Y., Lo, W. L., Yang, K. Y., Liu, M. S.,

- Chu, J. M., Chung, P. H., Liu, J. J., Chou, S. W., Chen, S. H., & Chang, K. Y. (2019). Enrichment of superoxide dismutase 2 in glioblastoma confers to acquisition of temozolomide resistance that is associated with tumor-initiating cell subsets. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0565-2>
148. Song, Y., Park, I. S., Kim, J., & Seo, H. R. (2019). Actinomycin D inhibits the expression of the cystine/glutamate transporter xCT via attenuation of CD133 synthesis in CD133+ HCC. *Chemico-Biological Interactions*, 309, 108713. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.06.026>
149. Zheng, X., Li, C., Yu, K., Shi, S., Chen, H., Qian, Y., & Mei, Z. (2020). Aquaporin-9, mediated by IGF2, suppresses liver cancer stem cell properties via augmenting ROS/B-Catenin/FOXO3a signaling. *Molecular Cancer Research*, 18(7), 992–1003. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-1180>
150. Essers, M. A., de Vries-Smits, L. M., Barker, N., Polderman, P. E., Burgering, B. M., & Korswagen, H. C. (2005). Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science*, 308(5725), 1181–1184. <https://doi.org/10.1126/science.1109083>
151. Boccitto, M., & Kalb, R. G. (2011). Regulation of Foxo-dependent transcription by post-translational modifications. *Current Drug Targets*, 12(9), 1303–1310. <https://doi.org/10.2174/138945011796150316>
152. Wang, Y., Wu, G., Fu, X., Xu, S., Wang, T., Zhang, Q., & Yang, Y. (2019). Aquaporin 3 maintains the stemness of CD133+ hepatocellular carcinoma cells by activating STAT3. *Cell Death & Disease*, 10(6), 465. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1712-0>
153. Wang, R., Wang, X., Zhao, J., Jin, J., Fan, W., Zhu, X., Chen, Q., Zhang, B., Lan, L., Qu, K., Zhu, L., & Wang, J. (2022). Clinical value and molecular mechanism of AQP3s in different tumors. *Medical Oncology*, 39(11), 174. <https://doi.org/10.1007/s12032-022-01766-0>
154. Linher-Melville, K., & Singh, G. (2017). The complex roles of STAT3 and STAT5 in maintaining redox balance: Lessons from STAT-mediated xCT expression in cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 451, 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.014>
155. Wang, C., Wang, Z., Liu, W., & Ai, Z. (2019). ROS-generating oxidase NOX1 promotes the self-renewal activity of CD133+ thyroid cancer cells through activation of the Akt signaling. *Cancer Letters*, 447, 154–163. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.028>
156. Wu, Q., Li, L., Miao, C., Hasnat, M., Sun, L., Jiang, Z., & Zhang, L. (2022). Osteopontin promotes hepatocellular carcinoma progression through inducing JAK2/STAT3/NOX1-mediated ROS production. *Cell Death & Disease*, 13(4), 341. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04806-9>
157. Saraswathibhatla, A., Indana, D., & Chaudhuri, O. (2023). Cell-extracellular matrix mechanotransduction in 3D. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 24(7), 495–516. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00583-1>
158. You, Y., Zheng, Q., Dong, Y., Xie, X., Wang, Y., Wu, S., Zhang, L., Wang, Y., Xue, T., Wang, Z., Chen, R., Wang, Y., Cui, J., & Ren, Z. (2016). Matrix stiffness-mediated effects on stemness characteristics occurring in HCC cells. *Oncotarget*, 7(22), 32221–31. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8515>
159. Ng, K. Y., Shea, Q. T., Wong, T. L., Luk, S. T., Tong, M., Lo, C. M., Man, K., Yun, J. P., Guan, X. Y., Lee, T. K., Zheng, Y. P., & Ma, S. (2021). Chemotherapy-enriched THBS2-deficient cancer stem cells drive hepatocarcinogenesis through matrix softness induced histone H3 modifications. *Advanced Science (Weinh)*, 8(5), 2002483. <https://doi.org/10.1002/advs.202002483>
160. Dong, Y., Xie, X., Wang, Z., Hu, C., Zheng, Q., Wang, Y., Chen, R., Xue, T., Chen, J., Gao, D., Wu, W., Ren, Z., & Cui, J. (2014). Increasing matrix stiffness upregulates vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma cells mediated by integrin $\beta 1$. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 444(3), 427–432. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.01.079>
161. Pang, M., Teng, Y., Huang, J., Yuan, Y., Lin, F., & Xiong, C. (2017). Substrate stiffness promotes latent TGF- $\beta 1$ activation in hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(1), 553–558. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.107>
162. Zhang, R., Ma, M., Dong, G., Yao, R. R., Li, J. H., Zheng, Q. D., Dong, Y. Y., Ma, H., Gao, D. M., Cui, J. F., Ren, Z. G., & Chen, R. X. (2017). Increased matrix stiffness promotes tumor progression of residual hepatocellular carcinoma after insufficient heat treatment. *Cancer Science*, 108(9), 1778–1786. <https://doi.org/10.1111/cas.13322>
163. Wang, C., Jiang, X., Huang, B., Zhou, W., Cui, X., Zheng, C., Liu, F., Bi, J., Zhang, Y., Luo, H., Yuan, L., Yang, J., & Yu, Y. (2021). Inhibition of matrix stiffness relating integrin $\beta 1$ signaling pathway inhibits tumor growth in vitro and in hepatocellular cancer xenografts. *BMC Cancer*, 21(1), 1276. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08982-3>
164. Gardelli, C., Russo, L., Cipolla, L., Moro, M., Andriani, F., Rondinone, O., Nicotra, F., Sozzi, G., Bertolini, G., & Roz, L. (2021). Differential glycosylation of collagen modulates lung cancer stem cell subsets through $\beta 1$ integrin-mediated interactions. *Cancer Science*, 112(1), 217–230. <https://doi.org/10.1111/cas.14700>
165. Tao, B., Song, Y., Wu, Y., Yang, X., Peng, T., Peng, L., Xia, K., Xia, X., Chen, L., & Zhong, C. (2021). Matrix stiffness promotes glioma cell stemness by activating BCL9L/Wnt/ β -catenin signaling. *Aging (Albany NY)*, 13(4), 5284–5296. <https://doi.org/10.18632/aging.202449>
166. Zhang, M., Xu, C., Wang, H. Z., Peng, Y. N., Li, H. O., Zhou, Y. J., Liu, S., Wang, F., Liu, L., Chang, Y., Zhao, Q., & Liu, J. (2019). Soft fibrin matrix downregulates DAB2IP to promote cell-dependent growth of colon tumor-repopulating cells. *Cell Death & Disease*, 10(3), 151. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1309-7>
167. Wen, Q., Xu, C., Zhou, J., Liu, N. M., Cui, Y. H., Quan, M. F., Cao, J. G., & Ren, K. Q. (2019). 8-bromo-7-methoxychrysin suppress stemness of SMMC-7721 cells induced by co-culture of liver cancer stem-like cells with hepatic stellate cells. *BMC Cancer*, 19(1), 224. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5419-5>
168. Cui, Y., Sun, S., Ren, K., Quan, M., Song, Z., Zou, H., Li, D., & Cao, J. (2016). Reversal of liver cancer-associated stellate cell-induced stem-like characteristics in SMMC-7721 cells by 8-bromo-7-methoxychrysin via inhibiting STAT3 activation. *Oncology Reports*, 35(5), 2952–2962. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4637>
169. Chen, A., Xu, C., Luo, Y., Liu, L., Song, K., Deng, G., Yang, M., Cao, J., Yuan, L., & Li, X. (2019). Disruption of crosstalk between LX-2 and liver cancer stem-like cells from MHCC97H cells by DFOG via inhibiting FOXM1. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*, 51(12), 1267–1275. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmz129>
170. Zhao, J., Li, R., Li, J., Chen, Z., Lin, Z., Zhang, B., Deng, L., Chen, G., & Wang, Y. (2022). CAFs-derived SCUBE1 promotes malignancy and stemness through the Shh/Gli1 pathway in hepatocellular carcinoma. *Journal of Translational Medicine*, 20(1), 520. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03689-w>
171. Won, C., Kim, B. H., Yi, E. H., Choi, K. J., Kim, E. K., Jeong, J. M., Lee, J. H., Jang, J. J., Yoon, J. H., Jeong, W. I., Park, I. C., Kim, T. W., Bae, S. S., Factor, V. M., Ma, S., Thorgeirsson, S. S., Lee, Y. H., & Ye, S. K. (2015). Signal transducer and activator

- of transcription 3-mediated CD133 up-regulation contributes to promotion of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 62(4), 1160–1173. <https://doi.org/10.1002/hep.27968>
172. Lai, F. B., Liu, W. T., Jing, Y. Y., Yu, G. F., Han, Z. P., Yang, X., Zeng, J. X., Zhang, H. J., Shi, R. Y., Li, X. Y., Pan, X. R., Li, R., Zhao, Q. D., Wu, M. C., Zhang, P., Liu, J. F., & Wei, L. X. (2016). Lipopolysaccharide supports maintaining the stemness of CD133(+) hepatoma cells through activation of the NF-KB/HIF-1 α pathway. *Cancer Letters*, 378(2), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.05.014>
 173. Rawal, P., Siddiqui, H., Hassan, M., Choudhary, M. C., Tripathi, D. M., Nain, V., Trehanpati, N., & Kaur, S. (2019). Endothelial cell-derived TGF- β promotes epithelial-mesenchymal transition via CD133 in HBx-infected hepatoma cells. *Frontiers in Oncology*, 9, 308. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00308>
 174. Lv, J., Chen, F. K., Liu, C., Liu, P. J., Feng, Z. P., Jia, L., Yang, Z. X., Hou, F., & Deng, Z. Y. (2020). Zoledronic acid inhibits thyroid cancer stemness and metastasis by repressing M2-like tumor-associated macrophages induced wnt/ β -catenin pathway. *Life Sciences*, 256, 117925. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117925>
 175. Wang, Z., Liu, W., Wang, C., Li, Y., & Ai, Z. (2020). Acetylcholine promotes the self-renewal and immune escape of CD133+ thyroid cancer cells through activation of CD133-Akt pathway. *Cancer Letters*, 471, 116–124. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.12.009>
 176. Liu, S., Zhang, C., Wang, B., Zhang, H., Qin, G., Li, C., Cao, L., Gao, Q., Ping, Y., Zhang, K., Lian, J., Zhao, Q., Wang, D., Zhang, Z., Zhao, X., Yang, L., Huang, L., Yang, B., & Zhang, Y. (2021). Regulatory T cells promote glioma cell stemness through TGF- β -NF- κ B-IL6-STAT3 signaling. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 70(9), 2601–2616. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-02872-0>
 177. Panza, S., Russo, U., Giordano, F., Leggio, A., Barone, I., Bonofiglio, D., Gelsomino, L., Malivindi, R., Conforti, F. L., Naimo, G. D., Giordano, C., Catalano, S., & Andò, S. (2020). Leptin and notch signaling cooperate in sustaining glioblastoma multiforme progression. *Biomolecules*, 10(6), 886. <https://doi.org/10.3390/biom10060886>
 178. Gronseth, E., Gupta, A., Koceja, C., Kumar, S., Kutty, R. G., Rarick, K., Wang, L., & Ramchandran, R. (2020). Astrocytes influence medulloblastoma phenotypes and CD133 surface expression. *PLoS ONE*, 15(7), e0235852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235852>
 179. Liu, J., Qian, B., Zhou, L., Shen, G., Tan, Y., Liu, S., Zhao, Z., Shi, J., Qi, W., Zhou, T., Yang, X., Gao, G., & Yang, Z. (2022). IL25 enhanced colitis-associated tumorigenesis in mice by upregulating transcription factor GLI1. *Frontiers in Immunology*, 13, 837262. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.837262>
 180. Kim, B., Seo, Y., Kwon, J. H., Shin, Y., Kim, S., Park, S. J., Park, J. J., Cheon, J. H., Kim, W. H., & Il, K. T. (2021). IL-6 and IL-8, secreted by myofibroblasts in the tumor microenvironment, activate HES1 to expand the cancer stem cell population in early colorectal tumor. *Molecular Carcinogenesis*, 60(3), 188–200. <https://doi.org/10.1002/mc.23283>
 181. Buhrmann, C., Yazdi, M., Popper, B., Shayan, P., Goel, A., Aggarwal, B. B., & Shakibaei, M. (2018). Resveratrol chemosensitizes TNF- β -induced survival of 5-FU-treated colorectal cancer cells. *Nutrients*, 10(7), 888. <https://doi.org/10.3390/nu10070888>
 182. Ma, X., Liu, J., Yang, X., Fang, K., Zheng, P., Liang, X., & Liu, J. (2020). Mesenchymal stem cells maintain the stemness of colon cancer stem cells via interleukin-8/mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 245(6), 562–575. <https://doi.org/10.1177/1535370220910690>
 183. Zheng, S. M., Chen, H., Sha, W. H., Chen, X. F., Yin, J. B., Zhu, X. B., Zheng, Z. W., & Ma, J. (2022). Oxidized low-density lipoprotein stimulates CD206 positive macrophages upregulating CD44 and CD133 expression in colorectal cancer with high-fat diet. *World Journal of Gastroenterology*, 28(34), 4993–5006. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i34.4993>
 184. Wang, L., Choi, H. S., Su, Y., Lee, B., Song, J. J., Jang, Y. S., & Seo, J. W. (2021). 7S,15R-dihydroxy-16S,17S-epoxy-docosapentaenoic acid, a novel DHA epoxy derivative, inhibits colorectal cancer stemness through repolarization of tumor-associated macrophage functions and the ROS/STAT3 signaling pathway. *Antioxidants (Basel)*, 10(9), 1459. <https://doi.org/10.3390/antiox10091459>
 185. Xiang, T., Long, H., He, L., Han, X., Lin, K., Liang, Z., Zhuo, W., Xie, R., & Zhu, B. (2015). Interleukin-17 produced by tumor microenvironment promotes self-renewal of CD133+ cancer stem-like cells in ovarian cancer. *Oncogene*, 34(2), 165–176. <https://doi.org/10.1038/ncr.2013.537>
 186. Ning, Y., Cui, Y., Li, X., Cao, X., Chen, A., Xu, C., Cao, J., & Luo, X. (2018). Co-culture of ovarian cancer stem-like cells with macrophages induced SKOV3 cells stemness via IL-8/STAT3 signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 262–271. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.022>
 187. Pradhan, R., Chatterjee, S., Hembram, K. C., Sethy, C., Mandal, M., & Kundu, C. N. (2021). Nano formulated resveratrol inhibits metastasis and angiogenesis by reducing inflammatory cytokines in oral cancer cells by targeting tumor associated macrophages. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 92, 108624. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108624>
 188. Pradhan, R., Paul, S., Das, B., Sinha, S., Dash, S. R., Mandal, M., & Kundu, C. N. (2023). Resveratrol nanoparticle attenuates metastasis and angiogenesis by deregulating inflammatory cytokines through inhibition of CAFs in oral cancer by CXCL-12/IL-6-dependent pathway. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 113, 109257. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.109257>
 189. Kesh, K., Garrido, V. T., Dosch, A., Durden, B., Gupta, V. K., Sharma, N. S., Lyle, M., Nagathihalli, N., Merchant, N., Saluja, A., & Banerjee, S. (2020). Stroma secreted IL6 selects for “stem-like” population and alters pancreatic tumor microenvironment by reprogramming metabolic pathways. *Cell Death & Disease*, 11(11), 967. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03168-4>
 190. Kesh, K., Mendez, R., Mateo-Victoriano, B., Garrido, V. T., Durden, B., Gupta, V. K., Oliveras Reyes, A., Merchant, N., Datta, J., Banerjee, S., & Banerjee, S. (2022). Obesity enriches for tumor protective microbial metabolites and treatment refractory cells to confer therapy resistance in PDAC. *Gut Microbes*, 14(1), 2096328. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2096328>
 191. Lin, W. H., Chang, Y. W., Hong, M. X., Hsu, T. C., Lee, K. C., Lin, C., & Lee, J. L. (2021). STAT3 phosphorylation at Ser727 and Tyr705 differentially regulates the EMT-MET switch and cancer metastasis. *Oncogene*, 40(4), 791–805. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01566-8>
 192. Zhou, Y., Su, Y., Zhu, H., Wang, X., Li, X., Dai, C., Xu, C., Zheng, T., Mao, C., & Chen, D. (2019). Interleukin-23 receptor signaling mediates cancer dormancy and radioresistance in human esophageal squamous carcinoma cells via the Wnt/notch pathway. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 97(2), 177–188. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1724-8>
 193. Yang, Z., Guo, L., Liu, D., Sun, L., Chen, H., Deng, Q., Liu, Y., Yu, M., Ma, Y., Guo, N., & Shi, M. (2015). Acquisition of resistance to trastuzumab in gastric cancer cells is associated with activation of IL-6/STAT3/Jagged-1/Notch positive feedback loop. *Oncotarget*, 6(7), 5072–87. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3241>
 194. Konishi, H., Asano, N., Imatani, A., Kimura, O., Kondo, Y., Jin, X., Kanno, T., Hatta, W., Ara, N., Asanuma, K., Koike, T., &

- Shimosegawa, T. (2016). Notch1 directly induced CD133 expression in human diffuse type gastric cancers. *Oncotarget*, *7*(35), 56598–56607. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10967>
195. Sansone, P., Berishaj, M., Rajasekhar, V. K., Ceccarelli, C., Chang, Q., Strillacci, A., Savini, C., Shapiro, L., Bowman, R. L., Mastroleo, C., De Carolis, S., Daly, L., Benito-Martin, A., Perna, F., Fabbri, N., Healey, J. H., Spisni, E., Cricca, M., Lyden, D., ... Bromberg, J. (2017). Evolution of cancer stem-like cells in endocrine-resistant metastatic breast cancers is mediated by stromal microvesicles. *Cancer Research*, *77*(8), 1927–1941. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2129>. Erratum In: *CancerRes*.2017;77(19):5438
 196. Candelaria, P. V., Rampoldi, A., Harbuzariu, A., & Gonzalez-Perez, R. R. (2017). Leptin signaling and cancer chemoresistance: Perspectives. *World Journal of Clinical Oncology*, *8*(2), 106–119. <https://doi.org/10.5306/wjco.v8.i2.106>
 197. Duprat, F., Robles, C., Castillo, M. P., Rivas, Y., Mondaca, M., Jara, N., Roa, F., Bertinat, R., Toledo, J., Paz, C., & González-Chavarría, I. (2023). LOX-1 activation by oxLDL induces AR and AR-V7 expression via NF- κ B and STAT3 signaling pathways reducing enzalutamide cytotoxic effects. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6), 5082. <https://doi.org/10.3390/ijms24065082>
 198. Bie, Q., Sun, C., Gong, A., Li, C., Su, Z., Zheng, D., Ji, X., Wu, Y., Guo, Q., Wang, S., & Xu, H. (2016). Non-tumor tissue derived interleukin-17B activates IL-17RB/AKT/ β -catenin pathway to enhance the stemness of gastric cancer. *Science and Reports*, *6*, 25447. <https://doi.org/10.1038/srep25447>
 199. Yan, G. N., Yang, L., Lv, Y. F., Shi, Y., Shen, L. L., Yao, X. H., Guo, Q. N., Zhang, P., Cui, Y. H., Zhang, X., Bian, X. W., & Guo, D. Y. (2014). Endothelial cells promote stem-like phenotype of glioma cells through activating the hedgehog pathway. *The Journal of Pathology*, *234*(1), 11–22. <https://doi.org/10.1002/path.4349>
 200. Lv, J., Feng, Z. P., Chen, F. K., Liu, C., Jia, L., Liu, P. J., Yang, C. Z., Hou, F., & Deng, Z. Y. (2021). M2-like tumor-associated macrophages-secreted Wnt1 and Wnt3a promotes dedifferentiation and metastasis via activating β -catenin pathway in thyroid cancer. *Molecular Carcinogenesis*, *60*(1), 25–37. <https://doi.org/10.1002/mc.23268>
 201. Cao, X., Liu, L., Cao, X., Cui, Y., Zou, C., Chen, A., Qiu, Y., Quan, M., Ren, K., Chen, X., & Cao, J. (2020). The DNMT1/miR-34a/FOXM1 Axis contributes to stemness of liver cancer cells. *Journal of Oncology*, *2020*, 8978930. <https://doi.org/10.1155/2020/8978930>
 202. Kalathil, D., John, S., & Nair, A. S. (2021). FOXM1 and cancer: faulty cellular signaling derails homeostasis. *Frontiers in Oncology*, *10*, 626836. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.626836>
 203. Sher, G., Masoodi, T., Patil, K., Akhtar, S., Kuttikrishnan, S., Ahmad, A., & Uddin, S. (2022). Dysregulated FOXM1 signaling in the regulation of cancer stem cells. *Seminars in Cancer Biology*, *86*(Pt 3), 107–121. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.07.009>
 204. Fu, Y., Bai, C., Wang, S., Chen, D., Zhang, P., Wei, H., Rong, F., Zhang, C., Chen, S., & Wang, Z. (2023). AKT1 phosphorylates RBM17 to promote Sox2 transcription by modulating alternative splicing of FOXM1 to enhance cancer stem cell properties in colorectal cancer cells. *The FASEB Journal*, *37*(1), e22707. <https://doi.org/10.1096/fj.202201255R>
 205. Wei, Y., Shi, D., Liang, Z., Liu, Y., Li, Y., Xing, Y., Liu, W., Ai, Z., Zhuang, J., Chen, X., Gao, Q., & Jiang, J. (2019). IL-17A secreted from lymphatic endothelial cells promotes tumorigenesis by upregulation of PD-L1 in hepatoma stem cells. *Journal of Hepatology*, *71*(6), 1206–1215. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.08.034>
 206. Liang, Z., Wu, B., Ji, Z., Liu, W., Shi, D., Chen, X., Wei, Y., & Jiang, J. (2021). The binding of LDN193189 to CD133 C-terminus suppresses the tumorigenesis and immune escape of liver tumor-initiating cells. *Cancer Letters*, *513*, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.05.003>
 207. Hu, J., Shi, B., Liu, X., Jiang, M., Yuan, C., Jiang, B., Song, Y., Zeng, Y., & Wang, G. (2018). The activation of Toll-like receptor 4 reverses tumor differentiation in human glioma U251 cells via Notch pathway. *International Immunopharmacology*, *64*, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.08.019>
 208. Yuan, Z., Liang, X., Zhan, Y., Wang, Z., Xu, J., Qiu, Y., Wang, J., Cao, Y., Le, V. M., Ly, H. T., Xu, J., Li, W., Yin, P., & Xu, K. (2020). Targeting CD133 reverses drug-resistance via the AKT/NF- κ B/MDR1 pathway in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, *122*(9), 1342–1353. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0783-0>
 209. Zhan, Y., Qiu, Y., Wang, H., Wang, Z., Xu, J., Fan, G., Xu, J., Li, W., Cao, Y., Le, V. M., Ly, H. T., Yuan, Z., Xu, K., & Yin, P. (2020). Bufalin reverses multidrug resistance by regulating stemness through the CD133/nuclear factor- κ B/MDR1 pathway in colorectal cancer. *Cancer Science*, *111*(5), 1619–1630. <https://doi.org/10.1111/cas.14345>
 210. Simbulan-Rosenthal, C. M., Haribabu, Y., Vakili, S., Kuo, L. W., Clark, H., Dougherty, R., Alobaidi, R., Carney, B., Sykora, P., & Rosenthal, D. S. (2022). Employing CRISPR-Cas9 to generate CD133 synthetic lethal melanoma stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(4), 2333. <https://doi.org/10.3390/ijms23042333>
 211. Jamal, S. M. E., Alamodi, A., Wahl, R. U., Grada, Z., Shareef, M. A., Hassan, S. Y., Murad, F., Hassan, S. L., Santourlidis, S., Gomez, C. R., Haikel, Y., Megahed, M., & Hassan, M. (2020). Melanoma stem cell maintenance and chemo-resistance are mediated by CD133 signal to PI3K-dependent pathways. *Oncogene*, *39*(32), 5468–5478. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1373-6>
 212. Zhu, Y., Yu, J., Wang, S., Lu, R., Wu, J., & Jiang, B. (2014). Overexpression of CD133 enhances chemoresistance to 5-fluorouracil by activating the PI3K/Akt/p70S6K pathway in gastric cancer cells. *Oncology Reports*, *32*(6), 2437–2444. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3488>
 213. Song, S., Pei, G., Du, Y., Wu, J., Ni, X., Wang, S., Jiang, B., Luo, M., & Yu, J. (2018). Interaction between CD133 and PI3K-p85 promotes chemoresistance in gastric cancer cells. *American Journal of Translational Research*, *10*(1), 304–314.
 214. Aghajani, M., Mokhtarzadeh, A., Aghabati-Maleki, L., Mansoori, B., Mohammadi, A., Safaei, S., Asadzadeh, Z., Hajiasgharzadeh, K., Khaze Shahgoli, V., & Baradaran, B. (2020). CD133 suppression increases the sensitivity of prostate cancer cells to paclitaxel. *Molecular Biology Reports*, *47*(5), 3691–3703. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05411-9>
 215. Park, E. K., Lee, J. C., Park, J. W., Bang, S. Y., Yi, S. A., Kim, B. K., Park, J. H., Kwon, S. H., You, J. S., Nam, S. W., Cho, E. J., & Han, J. W. (2015). Transcriptional repression of cancer stem cell marker CD133 by tumor suppressor p53. *Cell Death & Disease*, *6*(11), e1964. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.313>
 216. Asadzadeh, Z., Mansoori, B., Mohammadi, A., Kazemi, T., Mokhtarzadeh, A., Shanehbandi, D., Hemmat, N., Derakhshani, A., Brunetti, O., Safaei, S., Aghajani, M., Najafi, S., Silvestris, N., & Baradaran, B. (2021). The combination effect of Prominin1 (CD133) suppression and oxaliplatin treatment in colorectal cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *137*, 111364. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111364>
 217. Hou, J., Zhao, N., Zhu, P., Chang, J., Du, Y., & Shen, W. (2020). Irradiated mesenchymal stem cells support stemness maintenance of hepatocellular carcinoma stem cells through Wnt/ β -catenin

- signaling pathway. *Cell & Bioscience*, 10, 93. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00449-5>
218. Xiang, X., Ma, H. Z., Chen, Y. Q., Zhang, D. Z., Ma, S. X., Wang, H. J., Liu, D. M., Yuan, Y., & Cai, H. (2022). GM-CSF-miRNA-Jak2/Stat3 signaling mediates chemotherapy-induced cancer cell stemness in gastric cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 855351. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.855351>
 219. Lv, Y., Cang, W., Li, Q., Liao, X., Zhan, M., Deng, H., Li, S., Jin, W., Pang, Z., Qiu, X., Zhao, K., Chen, G., Qiu, L., & Huang, L. (2019). Erlotinib overcomes paclitaxel-resistant cancer stem cells by blocking the EGFR-CREB/GR β -IL-6 axis in MUC1-positive cervical cancer. *Oncogenesis*, 8(12), 70. <https://doi.org/10.1038/s41389-019-0179-2>
 220. Ouyang, Y., Liu, K., Hao, M., Zheng, R., Zhang, C., Wu, Y., Zhang, X., Li, N., Zheng, J., & Chen, D. (2016). Radiofrequency ablation-increased CXCL10 is associated with earlier recurrence of hepatocellular carcinoma by promoting stemness. *Tumor Biology*, 37(3), 3697–3704. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4035-5>
 221. Liu, K., Hao, M., Ouyang, Y., Zheng, J., & Chen, D. (2017). CD133+ cancer stem cells promoted by VEGF accelerate the recurrence of hepatocellular carcinoma. *Science and Reports*, 7, 41499. <https://doi.org/10.1038/srep41499>
 222. Kong, J., Kong, J., Pan, B., Ke, S., Dong, S., Li, X., Zhou, A., Zheng, L., & Sun, W. B. (2012). Insufficient radiofrequency ablation promotes angiogenesis of residual hepatocellular carcinoma via HIF-1 α /VEGFA. *PLoS ONE*, 7(5), e37266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037266>
 223. Adini, A., Adini, I., Ghosh, K., Benny, O., Pravda, E., Hu, R., Luyindula, D., & D'Amato, R. J. (2013). The stem cell marker prominin-1/CD133 interacts with vascular endothelial growth factor and potentiates its action. *Angiogenesis*, 16(2), 405–416. <https://doi.org/10.1007/s10456-012-9323-8>
 224. Kang, R., Zhang, Q., Zeh, H. J., 3rd., Lotze, M. T., & Tang, D. (2013). HMGB1 in cancer: Good, bad, or both? *Clinical Cancer Research*, 19(15), 4046–4057. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0495>
 225. He, S., Cheng, J., Sun, L., Wang, Y., Wang, C., Liu, X., Zhang, Z., Zhao, M., Luo, Y., Tian, L., Li, C., & Huang, Q. (2018). HMGB1 released by irradiated tumor cells promotes living tumor cell proliferation via paracrine effect. *Cell Death & Disease*, 9(6), 648. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0626-6>
 226. Zhang, L., Shi, H., Chen, H., Gong, A., Liu, Y., Song, L., Xu, X., You, T., Fan, X., Wang, D., Cheng, F., & Zhu, H. (2019). Dedifferentiation process driven by radiotherapy-induced HMGB1/TLR2/YAP/HIF-1 α signaling enhances pancreatic cancer stemness. *Cell Death & Disease*, 10(10), 724. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1956-8>
 227. Gao, X. Y., Zang, J., Zheng, M. H., Zhang, Y. F., Yue, K. Y., Cao, X. L., Cao, Y., Li, X. X., Han, H., Jiang, X. F., & Liang, L. (2021). Temozolomide treatment induces HMGB1 to promote the formation of glioma stem cells via the TLR2/NEAT1/Wnt pathway in glioblastoma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 620883. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.620883>
 228. Zhang, M., Weng, W., Zhang, Q., Wu, Y., Ni, S., Tan, C., Xu, M., Sun, H., Liu, C., Wei, P., & Du, X. (2018). The lncRNA NEAT1 activates Wnt/ β -catenin signaling and promotes colorectal cancer progression via interacting with DDX5. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0656-7>
 229. Yan, H., Wang, Z., Sun, Y., Hu, L., & Bu, P. (2021). Cytoplasmic NEAT1 suppresses AML stem cell self-renewal and leukemogenesis through inactivation of Wnt signaling. *Advanced Science (Weinh)*, 8(22), e2100914. <https://doi.org/10.1002/advs.20210914>
 230. Zhou, Z., Ren, X., Zheng, L., Li, A., & Zhou, W. (2022). LncRNA NEAT1 stabilized Wnt3a via U2AF2 and activated Wnt/ β -catenin pathway to alleviate ischemia stroke induced injury. *Brain Research*, 1788, 147921. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.147921>
 231. Joo, K. M., Kim, S. Y., Jin, X., Song, S. Y., Kong, D. S., Lee, J. I., Jeon, J. W., Kim, M. H., Kang, B. G., Jung, Y., Jin, J., Hong, S. C., Park, W. Y., Lee, D. S., Kim, H., & Nam, D. H. (2008). Clinical and biological implications of CD133-positive and CD133-negative cells in glioblastomas. *Laboratory Investigation*, 88(8), 808–815. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.57>
 232. Navarro-Alvarez, N., Kondo, E., Kawamoto, H., Hassan, W., Yuasa, T., Kubota, Y., Seita, M., Nakahara, H., Hayashi, T., Nishikawa, Y., Hassan, R. A., Javed, S. M., Noguchi, H., Matsu moto, S., Nakaji, S., Tanaka, N., Kobayashi, N., & Soto-Gutierrez, A. (2010). Isolation and propagation of a human CD133(-) colon tumor-derived cell line with tumorigenic and angiogenic properties. *Cell Transplantation*, 19(6), 865–877. <https://doi.org/10.3727/096368910X508997>
 233. Innes, J. A., Lowe, A. S., Fonseca, R., Aley, N., El-Hassan, T., Constantinou, M., Lau, J., Eddaoudi, A., Marino, S., & Brandner, S. (2022). Phenotyping clonal populations of glioma stem cell reveals a high degree of plasticity in response to changes of microenvironment. *Laboratory Investigation*, 102(2), 172–184. <https://doi.org/10.1038/s41374-021-00695-2>
 234. Han, Y., Sun, B., Cai, H., & Xuan, Y. (2021). Simultaneously target of normal and stem cells-like gastric cancer cells via cisplatin and anti-CD133 CAR-T combination therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 70(10), 2795–2803. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-02891-x>
 235. Prasad, S., Gaedicke, S., Machein, M., Mittler, G., Braun, F., Hettich, M., Firat, E., Klingner, K., Schuler, J., Wider, D., Wäscher, R. M., Herold-Mende, C., Elsässer-Beile, U., & Niedermann, G. (2015). Effective eradication of glioblastoma stem cells by local application of an AC133/CD133-specific T-cell-engaging antibody and CD8 T cells. *Cancer Research*, 75(11), 2166–2176. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2415>
 236. Koerner, S. P., André, M. C., Leibold, J. S., Kousis, P. C., Kübler, A., Pal, M., Haen, S. P., Bühring, H. J., Grosse-Hovest, L., Jung, G., & Salih, H. R. (2017). An Fc-optimized CD133 antibody for induction of NK cell reactivity against myeloid leukemia. *Leukemia*, 31(2), 459–469. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.194>
 237. Do, A. S. S., Amano, T., Edwards, L. A., Zhang, L., De Peralta-Venturina, M., & Yu, J. S. (2020). CD133 mRNA-loaded dendritic cell vaccination abrogates glioma stem cell propagation in humanized glioblastoma mouse model. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 18, 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.06.019>
 238. Tay, A. S. S., Amano, T., Edwards, L. A., & Yu, J. S. (2021). CD133 mRNA-transfected dendritic cells induce coordinated cytotoxic and helper T cell responses against breast cancer stem cells. *Molecular Therapy - Oncolytics*, 22, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2021.05.006>
 239. Alibolandi, M., Abnous, K., Anvari, S., Mohammadi, M., Ramezani, M., & Taghdisi, S. M. (2018). (2018) CD133-targeted delivery of self-assembled PEGylated carboxymethylcellulose-SN38 nanoparticles to colorectal cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup1), 1159–1169. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1446969>
 240. Yan, S., Tang, D., Hong, Z., Wang, J., Yao, H., Lu, L., Yi, H., Fu, S., Zheng, C., He, G., Zou, H., Hou, X., He, Q., Xiong, L., Li, Q., & Deng, X. (2021). CD133 peptide-conjugated pyropheophorbide-a as a novel photosensitizer for targeted photodynamic therapy in colorectal cancer stem cells. *Biomaterials Science*, 9(6), 2020–2031.

241. Jing, H., Weidensteiner, C., Reichardt, W., Gaedicke, S., Zhu, X., Grosu, A. L., Kobayashi, H., & Niedermann, G. (2016). Imaging and selective elimination of glioblastoma stem cells with theranostic near-infrared-labeled CD133-specific antibodies. *Theranostics*, *6*(6), 862–874. <https://doi.org/10.7150/thno.12890>
242. Feldman, E. J., Brandwein, J., Stone, R., Kalaycio, M., Moore, J., O'Connor, J., Wedel, N., Roboz, G. J., Miller, C., Chopra, R., Jurcic, J. C., Brown, R., Ehmann, W. C., Schulman, P., Frankel, S. R., De Angelo, D., & Scheinberg, D. (2005). Phase III randomized multicenter study of a humanized anti-CD33 monoclonal antibody, lintuzumab, in combination with chemotherapy, versus chemotherapy alone in patients with refractory or first-relapsed acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(18), 4110–4116. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.09.133>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.