



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**RELACIÓN DE LA METILACIÓN DE LOS GENES *AXIN2* Y *DKK1* CON LA  
ACTIVIDAD DE LA VÍA WNT/ $\beta$ -CATENINA EN CÉLULAS TRIPLE NEGATIVO DE  
CÁNCER DE MAMA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**LUIS ÁNGEL SALGADO GARCÍA**

**TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. JULIETA RUBIO LIGHTBOURN**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALTA**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
**DR. ERNESTO SOTO REYES**  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

**MÉXICO, CD. MX.**

**JUNIO, 2019**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**RELACIÓN DE LA METILACIÓN DE LOS GENES *AXIN2* Y *DKK1* CON LA  
ACTIVIDAD DE LA VÍA WNT/ $\beta$ -CATENINA EN CÉLULAS TRIPLE NEGATIVO DE  
CÁNCER DE MAMA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**LUIS ÁNGEL SALGADO GARCÍA**

**TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DRA. JULIETA RUBIO LIGHTBOURN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DR. ERNESTO SOTO REYES  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA**

**MÉXICO, CD. MX.**

**JUNIO, 2019**



OFICIO CPCB/584/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.


**M. en C. Ivonne Ramirez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM.  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 25 de marzo del 2019, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **SALGADO GARCIA LUIS ÁNGEL** con número de cuenta **309325565** con la tesis titulada "Relación de la metilación de los genes *AXIN2* y *DKK1* con la actividad de la vía Wnt/ $\beta$ -catetina en células triple negativo de cáncer de mama", realizada bajo la dirección de la **DRA. JULIETA RUBIO LIGHTBOURN**:

Presidente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE  
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA  
Suplente: DR. RODRIGO GONZÁLEZ BARRIOS DE LA PARRA  
Suplente: DRA. MAYRA FURLAN MAGARIL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 20 de mayo del 2019.

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de formar parte de este Programa de alta calidad siendo parte de la máxima casa de estudios del país ya que ello me permitió formarme como un profesionalista mejor preparado capaz de contribuir con el desarrollo de mi país.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado, ya que gracias a ello pude completar mis estudios durante mi estancia en el posgrado (CVU: 819481).

A la Dra. Julieta Rubio Lightbourn quien fungió como mi tutora principal y a los miembros de mi comité tutor, la Dra. Leticia Rocha Zavaleta y el Dr. Ernesto Soto Reyes por sus comentarios, correcciones y constante apoyo a mi trabajo lo cual permitió mejorar tanto mi proyecto como a mí mismo como científico.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A la Dra. Julieta Rubio Lightbourn por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo desde hace ya 5 años, sin su ayuda no me habría sido posible realizar el presente trabajo además de que a través de este tiempo ha sido mi guía durante mi formación como científico y gracias a usted soy lo que soy actualmente. También quiero agradecer por todo el apoyo y consejos brindados tanto en el ámbito académico como en lo personal.

A la Dra. Celeste Martínez, por ser la primera persona que me apoyo experimentalmente cuando ingresé al laboratorio de la Dra. Rubio, por siempre estar dispuesta a ayudarme, contribuir con sus consejos y enseñarme a hacer uso del kit de metilación de DNA.

Nuevamente a la Dra. Leticia Rocha y el Dr. Ernesto Soto, por haber aceptado formado parte de mi comité tutor ya que también gracias a su guía, comentarios y observaciones durante mis evaluaciones tutorales pude encaminar mi proyecto porque ustedes mejor que nadie conoce las diversas dificultades que se presentaron. De igual forma quiero agradecer por haberme brindado las líneas celulares que se utilizaron en el presente proyecto.

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt, la Dra. Marcela Lizano, el Dr. Rodrigo González Barrios y la Dra. Mayra Furlan por haber aceptado formar parte del jurado para la revisión de la presente tesis así como por sus respectivos comentarios y sugerencias que tuvieron como fin el contribuir para mejorar este trabajo.

A la Dra. María Eugenia Gonsebatt nuevamente, por su apoyo y los consejos brindados de su parte, así como a su grupo de investigación.

Al Dr. Pavel Petrosyan y al Dr. Renato León, por su apoyo durante la realización del proyecto y sus consejos para mejorar la eficiencia de los resultados.

A la M. en C. Clementina Castro Hernández, por el apoyo técnico brindado durante la realización de la presente tesis.

Al Dr. Miguel Tapia, por enseñarme a hacer uso del microscopio y por ayudarme a obtener mejores resultados de las inmunofluorescencias realizadas.

A la biotecnóloga Claudia Huitrón por su ayuda y disposición durante el mantenimiento de los cultivos celulares.

Al biólogo Jorge Maciel, el M. en C. Ángel Albarrán, la Dra. Carla Garza, el biólogo Erick Castillo, la M. en C. Daniela Silva y el Dr. Gerardo Vázquez por apoyarme con el aprendizaje de la técnica de Western blot y las extracciones de proteínas y DNA y por los consejos y apoyo brindados durante la realización del proyecto.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>3</b>
-Epidemiología .....	5
-Clasificación .....	8
-Factores de riesgo .....	12
-Epigenética .....	17
-Vía Wnt/ $\beta$ -catenina .....	21
<b>Antecedentes</b> .....	<b>27</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>31</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>32</b>
<b>Objetivo general</b> .....	<b>32</b>
<b>Objetivos particulares</b> .....	<b>32</b>
<b>Metodología</b> .....	<b>33</b>
-Líneas celulares.....	33
-Extracción de DNA .....	34
-Reacción de DNA con bisulfito de sodio .....	35
-PCR sensible a metilación (MSP) .....	36
-Electroforesis en gel de agarosa .....	40
-Inmunofluorescencia .....	41
-Extracción de proteínas totales .....	42
-Extracción de proteínas citoplásmicas y nucleares .....	43
-Cuantificación de proteínas.....	44
-Western blot.....	45
-Tratamiento con la proteína recombinante Wnt1 .....	48
-Análisis estadístico.....	48
<b>Resultados</b> .....	<b>49</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>66</b>
<b>Perspectivas</b> .....	<b>77</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>78</b>
<b>Literatura citada</b> .....	<b>79</b>

## Resumen

El cáncer de mama es el tipo de neoplasia que causa mayor mortalidad en mujeres a nivel mundial mientras que en México ocupa el segundo lugar. Dentro de los fenotipos moleculares conocidos para esta enfermedad, el triple negativo se encuentra entre los más agresivos y es el fenotipo que contribuye con más decesos debido a que actualmente no existe un tratamiento efectivo al que respondan pacientes que lo padecen. Una de las vías de señalización claramente alteradas en el cáncer de mama triple negativo es la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y ésta se asocia con procesos característicos de células malignas como son la proliferación y la migración celular. Por otro lado, la hipermetilación en la región promotora de un gen contribuye con su silenciamiento y la pérdida de su función, y es un proceso que se relaciona con la inestabilidad genómica en células tumorales por lo que en este trabajo nos planteamos determinar si existe una relación entre la metilación presente en regiones promotoras de dos genes que son reguladores negativos de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (*AXIN2* y *DKK1*) con la sobreactivación de dicha vía en líneas celulares triple negativo de cáncer de mama. Se encontró que la cantidad de mRNA transcrito del gen *AXIN2* se reduce conforme se incrementa la metilación en su promotor, pero dicha disminución no es muy evidente al analizar la abundancia de su proteína en células con el promotor metilado (HCC1937), en el caso de células DU4475 con el promotor de *DKK1* metilado, se observó la misma tendencia respecto al mRNA, pero no se encontró su proteína. No obstante, se sugieren otro tipo de alteraciones que pueden contribuir a dicha ausencia de *DKK1*. La activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina mediante un tratamiento con Wnt1 durante 6 horas, induce la expresión y cambios de localización de *AXIN2* y *DKK1* en las líneas celulares MDA-MB231, HCC1937 y DU4475 así como un incremento en la expresión de  $\beta$ -catenina en células MDA-MB231 y un decremento en células HCC1937 lo que sugiere que en lugar de ser un mecanismo de regulación negativo para la vía, *AXIN2* y *DKK1* participan en procesos que favorecen la progresión del cáncer de mama triple negativo conforme las células se encuentran en estadios más avanzados de la enfermedad

## Abstract

Breast cancer is the type of neoplasia with highest mortality in women worldwide while in México, it occupies the second place. Among the molecular phenotypes known for this disease, the triple negative is one of the most aggressive and is the phenotype that contributes to more deaths due to the absence of a successful treatment for these patients. One signaling pathway clearly altered in triple negative breast cancer is the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway which is associated with characteristic processes of malignant cells such as proliferation and cell migration. On the other hand, hypermethylation in the promoter region of a gene contributes to its silencing and loss of its function, and it is a process related to the genomic instability in tumor cells, so in this work it was of interest to determine if there is a relationship between the methylation present in promoter regions of two genes that are negative regulators of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway (*AXIN2* and *DKK1*) with the overactivation of such pathway in triple negative breast cancer cell lines. It was found that the amount of mRNA transcribed from the *AXIN2* gene is reduced as promoter methylation increased, but this decrease is not evident when analyzing the expression of its protein in cells with methylated promoter (HCC1937), in the case of DU4475 cells with *DKK1* methylated promoter, the same tendency was observed in relation to its mRNA but it differed in terms of its protein since no expression was found. However, another type of alterations that contribute with the observed absence of protein is also suggested. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activation through Wnt1 treatment for 6 hours, induces expression and localization changes of *AXIN2* and *DKK1* in MDA-MB231, HCC1937 and DU4475 cells as well as an increased expression of  $\beta$ -catenin in MDA-MB231 cells and a decrease in HCC1937 cells which suggests that rather than a negative regulatory mechanism for the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, *AXIN2* and *DKK1* participate in processes that favor the progression of triple negative breast cancer according to the advance in the stages of the disease.

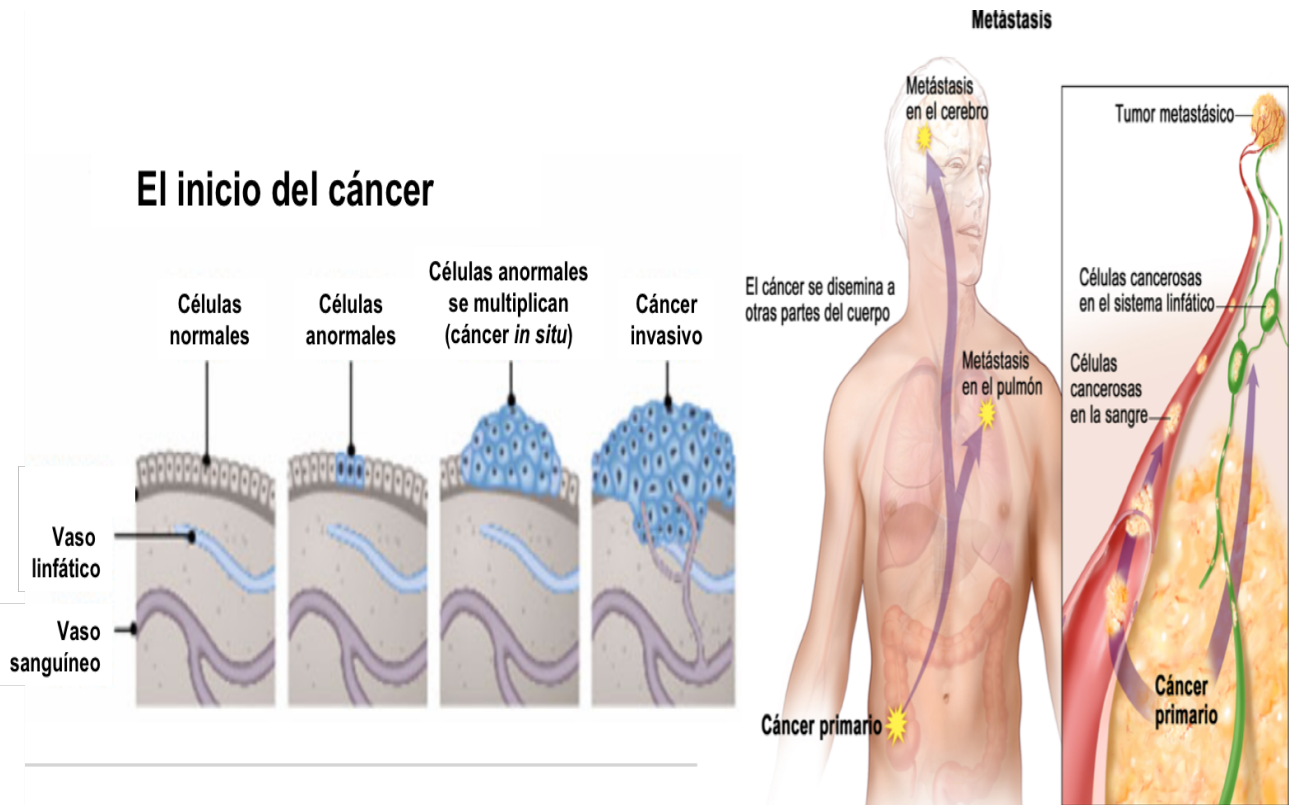
## Introducción

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por un proceso de división celular sin control y que puede desarrollarse en prácticamente cualquier lugar del cuerpo y diseminarse a otras regiones mediante los sistemas linfático y circulatorio (National Institutes of Health, 2015).

En el cáncer ocurren proliferaciones celulares anormales en los tejidos y su se da por modificaciones provocadas en una sola célula por agentes externos (mutágenos y carcinógenos) o por factores genéticos heredados (OMS, 2016). Dichas modificaciones son resultado de mutaciones y cambios en el DNA de células normales, principalmente en las secuencias codificantes de genes que regulan el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis (INC, 2015).

Un tumor en general presenta tres características: 1) forma una masa de células anormales, 2) posee crecimiento independiente, excesivo y sin control debido a que pierde la capacidad de respuesta a los controles normales de crecimiento, y 3) tiene la capacidad de sobrevivir y proliferar aun cuando desaparezca la causa que lo provocó. De acuerdo con el comportamiento clínico que poseen se clasifican en: neoplasias benignas, que se consideran, como su nombre lo dice, no graves ya que el tumor se encuentra bien localizado, no invade otros tejidos y se puede eliminar mediante intervención quirúrgica y neoplasias malignas, que son aquellos tumores que infiltran tejidos adyacentes y pueden propagarse a lugares lejanos generando implantes secundarios (metástasis) (INC, 2014).





**Fig. 1. Esquema de los procesos de cáncer y de metástasis (Modificado de LinktoLife, 2014 y NIH, 2017).**

Debido a que el cáncer puede originarse prácticamente en cualquier tipo de célula y en cualquier tejido corporal, estos pueden agruparse en tres subtipos principales: leucemias y linfomas, que se originan en tejidos formadores de células sanguíneas (ganglios linfáticos, bazo, médula ósea), sarcomas, que proceden de tejido conectivo (huesos, nervios, cartílagos, vasos sanguíneos, etc.), células del músculo y de la grasa y los carcinomas, los cuales provienen de tejidos epiteliales o de tejidos glandulares como son mama y la próstata. Dentro de estos últimos, se encuentran los tipos de cáncer más frecuentes y entre ellos el cáncer de mama del cual trataremos en este trabajo (INC, 2014).

## **-Epidemiología**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer es la segunda causa de muerte a nivel global y el cáncer de mama (CaMa) representa el 16% de los cánceres en la mujer y ocupa el primer lugar de mortalidad por neoplasia en el sexo femenino (OMS, 2016).

En el continente americano, se reporta que una de cada ocho mujeres desarrolla CaMa en alguna etapa de su vida. En México, ocupa el segundo lugar en mortalidad por neoplasia en mujeres y se destaca que afecta todos los niveles socioeconómicos (Knaul *et al.*, 2008 e INEGI, 2014). Además, cabe mencionar que Palacio-Mejía *et al.* en el 2009 reportaron que el 13.24% de las muertes se concentran en la Ciudad de México al analizar la mortalidad por este tipo de carcinoma empleando como fuente de información las estadísticas de mortalidad publicadas por el INEGI y la Secretaría de Salud de México de los años de 1979 a 2006.

En el estudio anterior, también se reporta un incremento de la tasa de mortalidad partiendo de 5.6 mujeres fallecidas por cada 100 mil mujeres hasta una tasa de 10.1 mujeres fallecidas en 2006. De acuerdo con datos nacionales reportados por el INEGI en años posteriores, en el año 2013 la tasa de mortalidad del cáncer de mama para el sexo femenino se incrementó a 14.36 defunciones por cada 100 mil habitantes, superado sólo por tumores en órganos digestivos (31.2) en población de 20 años o más (Tabla 1). Además, en un reporte anual de 2011 a 2016 analizando datos de población de ambos sexos con un rango de edad de 30 a 59 años, el CaMa ocupa el tercer lugar con una tendencia al incremento en la tasa de mortalidad (de 6.83 defunciones por cada 100 mil habitantes en 2011 a 7.61 en 2016 (Tabla 2). Por último, al analizar la tasa de mortalidad observada en mujeres de 20 años y más en una serie anual de 2011 a 2016, también se encuentra una tendencia a incrementar, pasando de 13.92 defunciones por cada 100 mil habitantes en 2011, a 16.12 en el año 2016 (Fig. 2) (INEGI, 2018).

**Tabla 1. Datos nacionales de tasa de mortalidad en población mexicana de 20 años y más por principales tumores malignos en México para el año 2013 (INEGI, 2016).**

Por cada 100 mil habitantes para cada sexo

Principales tumores malignos	Total	Hombres	Mujeres
Órganos digestivos	32.52	33.98	31.20
Órganos respiratorios e intratorácicos	10.58	14.71	6.83
Sistema reproductor masculino	8.44	17.75	NA
Mama <sup>1</sup>	7.59	0.14	14.36
Órganos genitales femeninos	6.78	NA	12.93
Órganos hematopoyéticos <sup>2</sup>	5.68	6.28	5.14
Vías urinarias <sup>2</sup>	4.12	5.51	2.85
Células germinales (testículo u ovario) <sup>1</sup>	3.48	1.30	5.46

Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), códigos: C15-C39, C50-C61, C63-C68, C88-C95.

<sup>1</sup> Para los hombres, el cáncer de mama y tumor de testículo no son una de las principales causas de muerte, pero se incluye el dato para fines de comparación.

<sup>2</sup> Para las mujeres, el cáncer en órganos hematopoyéticos y de vías urinarias no son de las principales causas de muerte, pero se incluye el dato para fines de comparación.

NA No aplicable.

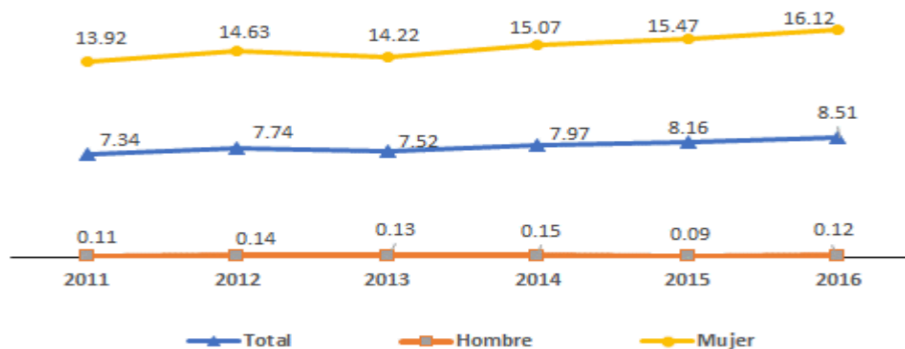
**Tabla 2. Datos nacionales de tasa de mortalidad en población mexicana de 30 a 59 años por principales tumores malignos en México de 2011 a 2016 (INEGI, 2018).**

Por cada 100 000 habitantes

Principales tumores malignos	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Órganos digestivos (C15-C26)	14.64	14.71	15.38	15.77	16.07	15.68
Hombres	15.29	16.14	16.29	16.85	17.40	16.99
Mujeres	14.06	13.42	14.57	14.80	14.87	14.51
Órganos genitales femeninos (C51-C58)	8.04	7.99	7.95	8.30	8.26	8.52
Hombres	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Mujeres	15.32	15.21	15.12	15.76	15.67	16.15
Mama (C50)	6.83	7.29	6.84	7.37	7.36	7.61
Hombres	0.07	0.08	0.05	0.10	0.06	0.07
Mujeres	12.96	13.81	12.97	13.90	13.90	14.36
Órganos hematopoyéticos (C88-C95)	3.63	3.72	3.88	3.87	3.88	3.96
Hombres	3.75	3.96	4.06	4.20	4.23	4.06
Mujeres	3.52	3.51	3.73	3.58	3.56	3.87
Órganos respiratorios e intratorácicos (C30-C39)	4.03	3.63	4.00	3.72	3.81	3.65
Hombres	5.05	4.81	4.99	4.69	4.63	4.51
Mujeres	3.10	2.57	3.11	2.84	3.07	2.88

Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10). Excluye defunciones con residencia habitual en el extranjero y edad no especificada.

Por cada 100 000 habitantes



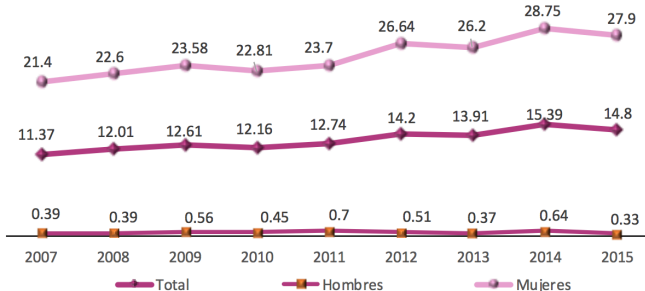
Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), código C50. Excluye defunciones con residencia habitual en el extranjero y edad no especificada.

**Figura 2. Datos nacionales de tasa de mortalidad registrada en mujeres mexicanas de 20 años y más con cáncer de mama en México de 2011 a 2016 (INEGI, 2018).**

En cuanto a los datos de incidencia reportados también por el INEGI en población de 20 años y más, se observa un incremento para el sexo femenino durante el periodo de 2007 a 2015, pasando de una incidencia de 21.4 casos por cada 100 mil habitantes en 2007 a 27.9 casos en el año 2015.

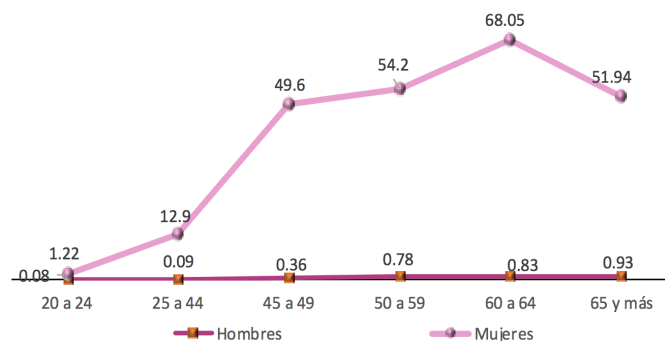
Además, al analizar la tasa de incidencia por grupos de edad, en el año 2015 se observa que la tasa se incrementa a partir de los 25 años hasta los 64 años en el sexo femenino (12.9 a 68.05 respectivamente), disminuyendo a 51.94 a partir de los 65 años (Fig. 3).

**Incidencia de tumor maligno de mama en población de 20 años y más, por sexo**  
Serie anual de 2007 a 2015  
Por 100 000 habitantes de cada sexo



Nota: Se utilizó la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), código C50. Excluye casos con edad no especificada.

**Incidencia de tumor maligno de mama en población de 20 años y más por grupo de edad según sexo 2015**  
Por 100 000 habitantes de cada sexo



**Figura 3. Datos nacionales de incidencia de cáncer de mama en población mexicana de 20 años y más. Datos registrados de 2007 a 2015 en la figura de la izquierda, y datos del año 2015 en la figura de la derecha (INEGI, 2016).**

## **-Clasificación**

En el CaMa la proliferación celular anormal se lleva a cabo en el seno y puede desarrollarse en distintas zonas dentro de éste, debido a ello existen dos clasificaciones: una basada en su histología donde los tipos principales son el ductal y lobulillar (Fig. 4), y otra que se basa en características moleculares del tumor dadas por la presencia o ausencia de receptor de estrógenos (RE), receptor de progesterona (RP) y receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) (Viale, 2012).

La primera clasificación del CaMa se da en función de la forma que presentan las células cancerosas al observarse en el microscopio y además del lugar donde se encuentran. También se toma en cuenta dependiendo de si es *in situ* o invasivo lo que resulta en 4 combinaciones principales:

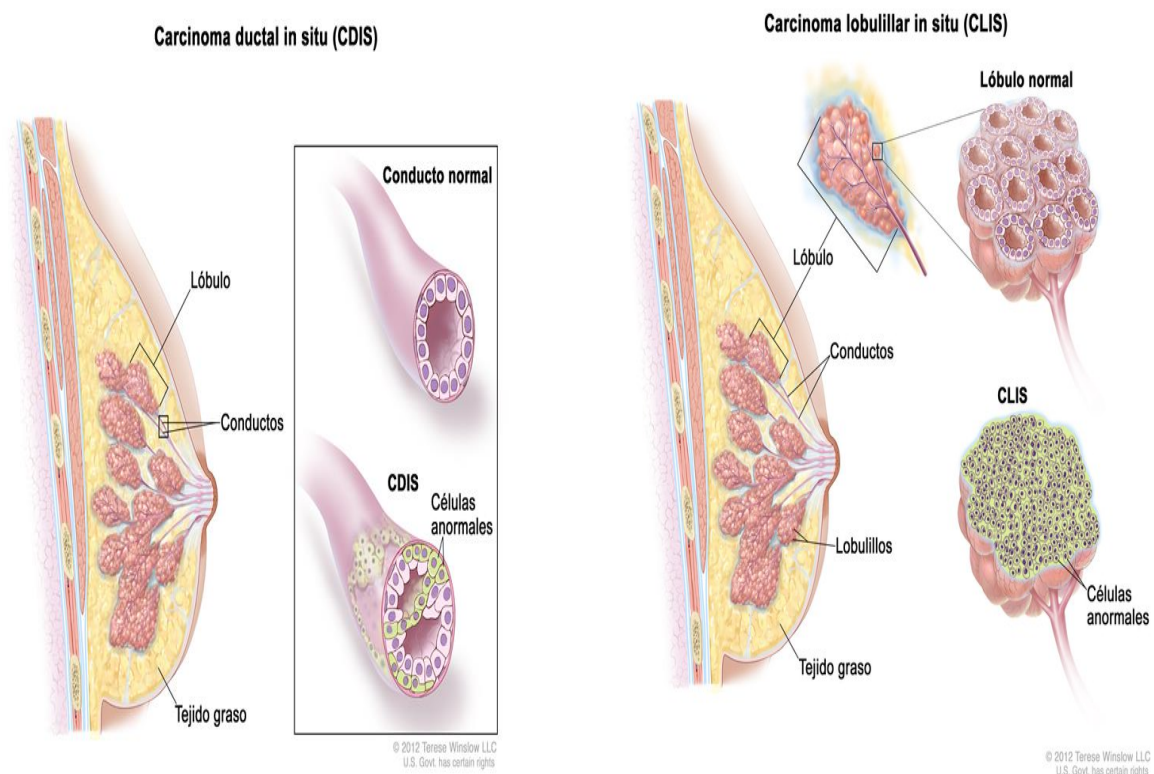
-Carcinoma ductal *in situ*: es el tipo más común de CaMa no invasivo, las células malignas se desarrollan dentro de los conductos que transportan la leche hacia el pezón y no se han propagado fuera de los conductos ni hacia el tejido que los rodea; en algunos casos, este tipo de cáncer se convierte en invasivo. Se considera que uno de cada cinco casos nuevos de CaMa será de este tipo y mujeres con este diagnóstico tienen altas probabilidades de curarse (ACS, 2016).

-Carcinoma ductal invasivo: también llamado infiltrante, éste es el tipo más común de CaMa ya que ocho de 10 cánceres invasivos, son de este tipo. En este carcinoma, las células cancerosas tienen la capacidad de hacer metástasis (propagarse a otras partes del organismo) por lo que inicialmente penetran la pared de los conductos y crecen en el tejido adiposo del seno para después llegar a distintos puntos a través del sistema linfático y el torrente sanguíneo (Breast cancer, 2016). Este carcinoma resulta ser más común a medida que una mujer envejece ya que aproximadamente dos tercios de pacientes diagnosticadas con CaMa invasivo tienen 55 años o más (ACS, 2016)

-Carcinoma lobulillar *in situ*: se desarrolla en las células de los lobulillos (glándulas productoras de leche) y se presenta en una o en varias áreas, también se puede considerar como precáncer y se estima que un 25% de estos casos desarrollarán

un carcinoma invasor. Aproximadamente de entre el 3 al 5% de los carcinomas de mama son de este tipo (Gallego, 2001). Se desarrolla generalmente antes de la menopausia, entre los 40 y 50 años de edad, y sólo menos del 10% de mujeres con esta patología ya han pasado la menopausia (Breast cancer, 2016)

-Carcinoma lobulillar invasivo: como el anterior, se desarrolla inicialmente en los lobulillos y se puede propagar a distintas partes del cuerpo. Se considera el segundo tipo de CaMa más común después del carcinoma ductal invasivo y alrededor de 1 de cada 10 casos de CaMa invasivo son de este tipo. Este carcinoma tiende a aparecer en edades más avanzadas que los ductales invasivos (60 años en adelante y entre 55 a 60 años, respectivamente) (ACS, 2016).



**Figura 4. Clasificación histológica del cáncer de mama. En el carcinoma ductal (izquierda) las células malignas se desarrollan dentro de los conductos cuya función es el transporte de la leche producida en los lobulillos. En el carcinoma lobulillar (derecha) las células malignas se originan dentro de los lóbulos de la mama cuya función es la producción de leche. Ambos tejidos malignos se comparan con su respectivo tejido sano y se consideran *in situ* porque no han invadido tejidos adyacentes (Modificado de NIH, 2012).**

En la segunda clasificación, se analiza la biopsia para determinar si es positiva para receptores de estrógenos, de progesterona y/o de HER2/neu. Los receptores son proteínas que pueden encontrarse sobre la superficie de la membrana celular o en el interior de la célula y su función es unirse específicamente a ciertas sustancias que circulan por el torrente sanguíneo. Las células cancerosas que se desarrollan en el seno pueden tener receptores de unión a estrógenos y a progesterona, hormonas cuya función es fomentar la elongación y ramificación de los ductos mamarios y el desarrollo y diferenciación de los lobulillos, respectivamente, por lo que ambos inducen una actividad proliferativa ya sea en tejido normal o maligno (Pearson, 2000).

El receptor de estrógenos (RE) se encuentra presente en más del 75% de pacientes con CaMa, se encuentra asociado con células cancerosas bien diferenciadas, menos agresivas y con una mejor prognosis comparada con la de pacientes con ausencia de este receptor (Anderson *et al.*, 2002 y Dunnwald *et al.*, 2007).

El receptor de progesterona (RP) se encuentra entre el 65 y 75% de los casos de CaMa, se asocia fuertemente con la presencia del RE así como con cánceres en edad avanzada, tamaño del tumor pequeño y baja tasa de mortalidad (Ravdin *et al.*, 1992, Elledge *et al.*, 2000, Bardou *et al.*, 2003, Olivotto *et al.*, 2004 y Stendahl *et al.*, 2006).

Las células cancerosas pueden tener uno o los dos receptores por lo que se clasifican como carcinomas luminales si son positivos para receptor de estrógenos (RE+), receptor de progesterona (RP+) o positivos para ambos receptores (RE+, RP+). Alrededor de dos de cada tres casos de CaMa tienen al menos uno de estos dos receptores (ACS, 2016).

Por otro lado, en algunas células el receptor HER2/neu se encuentra sobreexpresado por lo que también se emplea para clasificar este tipo de casos como positivos para HER2 (ACS, 2016) y su importancia se debe a que dentro de las funciones de este receptor está estimular proliferación, angiogénesis y la metástasis por medio de la activación de distintas vías de señalización. Por lo tanto,

este receptor suele estar presente en cánceres agresivos debido a que favorece el crecimiento y propagación celular con mayor rapidez (Abeloff *et al.*, 2005). Los tumores HER2 positivos tienen una frecuencia del 13 al 20% y se caracterizan por tener un alto grado histológico, de tamaño grande y se asocian con una expresión elevada de genes relacionados con proliferación celular, como el receptor del factor de crecimiento epidermal humano (EGFR), así como con una prognosis pobre (Wolff *et al.*, 2007 y Chia *et al.*, 2008).

Por último, el fenotipo triple negativo se denomina así ya que los 3 receptores mencionados anteriormente (RE, RP y HER2) están ausentes. Dentro de sus características se encuentra un comportamiento agresivo, así como una edad de inicio temprana, tamaño del tumor grande, de alto grado y en ocasiones se asocia con una alta tasa de invasión en nodos linfáticos (Dent *et al.*, 2007) Su comportamiento agresivo se relaciona con una alta capacidad de metástasis la cual ocurre principalmente en pulmón y cerebro, y en menor medida, en hueso (Criscitiello *et al.*, 2012).

Pacientes con CaMa diagnosticados con este fenotipo tienen la peor prognosis y una tasa de sobrevivencia reducida en comparación con pacientes con otro fenotipo (Sorlie *et al.*, 2001).

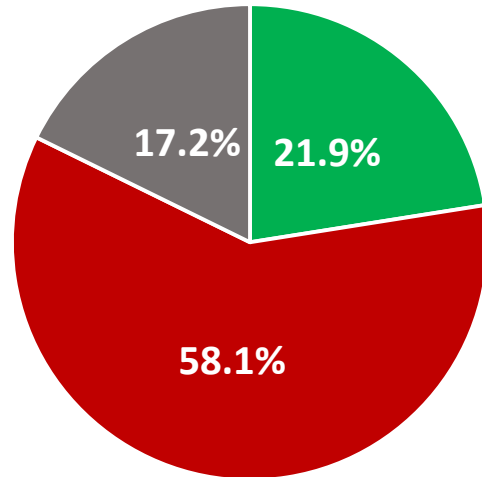
Respecto a la epidemiología, estudios indican que en pacientes afroamericanas con este fenotipo tienen una probabilidad de hasta 3 veces mayor, de ocurrir en mujeres premenopáusicas. Además, también se ha visto que mujeres jóvenes hispanas y afroamericanas diagnosticadas con CaMa triple negativo, tienen tumores más agresivos y una tasa de sobrevivencia desfavorable independiente del estado del tumor al momento del diagnóstico (Bauer *et al.*, 2007).

En México, datos reportados en el año 2015 con base en 3109 pacientes diagnosticadas con CaMa que ingresaron al Instituto Nacional de Cancerología en la ciudad de México (Mohar *et al.*, 2015), indican una frecuencia del 58.1% para el fenotipo luminal, 21.9% para el fenotipo HER2+ y 17.2% para el fenotipo triple negativo (Fig. 5).



### Tipos moleculares de cáncer de mama

	RE	RP	HER2
Luminal A	+	+	-
Luminal B	+	-	+
HER2 +	-	-	+
Triple negativo	-	-	-



■ HER2 ■ Luminal ■ Triple negativo

Figura 5. Clasificación molecular del cáncer de mama y porcentajes de cada fenotipo encontrado en una muestra de población mexicana de 3109 pacientes diagnosticadas con esta enfermedad en un periodo de 2007 a 2013 (Mohar *et al.*, 2015). RE= receptor de estrógenos, RP= receptor de progesterona, HER2= receptor 2 de factor de crecimiento epidermal humano.

### -Factores de riesgo

El CaMa es el cáncer más frecuente en mujeres tanto de países desarrollados como los que se encuentran en vías de desarrollo. En estos últimos, su incidencia viene en aumento debido a factores como la creciente urbanización y la mayor esperanza de vida, aunado con una detección tardía lo que ocasiona detectar el cáncer en etapas avanzadas e impide mejorar las tasas de supervivencia, por lo tanto, también es en estos países donde ocurren la mayoría de las defunciones (69%) (De la Vara-Salazar *et al.*, 2011)

Así como otros tipos de cáncer, el cáncer mamario no tiene una razón única que provoque su aparición y desarrollo por lo que se considera de origen multifactorial, las causas que lo originan son conocidas como factores de riesgo y dentro de éstos se encuentran:

### Factores biológicos

El sexo femenino es el principal factor de riesgo para desarrollar la enfermedad ya que aunque también se presenta en los hombres, las células mamarias de las

mujeres crecen y cambian constantemente influenciadas principalmente por la actividad de hormonas como estrógenos y progesterona, las cuales estimulan el crecimiento de estas células y aumenta notablemente el riesgo a desarrollar cáncer resultando en una relación de CaMa entre hombres y mujeres de aproximadamente 1 a 100 (Hulka y Moorman, 2001 y ACS, 2015).

El envejecimiento también es un factor de riesgo importante ya que a mayor edad se tiene un mayor riesgo, por lo que este tipo de cáncer se presenta mayormente en mujeres de edad avanzada (ACS, 2015).

De igual forma, las características raciales modifican el riesgo de padecer CaMa ya que en poblaciones caucásicas, la enfermedad es más frecuente en comparación con poblaciones asiáticas (Meng *et al*, 1997).

Tener antecedentes familiares de cáncer de mamá también incrementa el riesgo y a su vez, éste se incrementa con el número de parientes directos afectados. Por ejemplo, un individuo con un familiar en primer grado que padece esta enfermedad tiene dos veces más riesgo de desarrollarla, mientras que teniendo dos familiares enfermos el riesgo se incrementa aproximadamente a tres veces (Cardenas y Frisch, 2003 y Nelson, 2008).

### **Factores reproductivos**

Dentro de estos factores de riesgo es muy importante el tiempo de exposición a estrógenos el cual puede estar determinado por una vida menstrual mayor a 40 años (Cárdenas *et al.*, 2013); menarquia temprana la cual se refiere a la que ocurre antes de los 12 años y que se asocia con un incremento del riesgo del 10 al 20% (Bernstein *et al.*, 2002) o menopausia tardía, ya que se ha reportado que por cada año que se retrasa la menopausia el riesgo de desarrollar CaMa se incrementa aproximadamente un 3% (Henderson *et al.*, 1985); la nuliparidad la cual se asocia a un tiempo más prolongado de exposición a los estrógenos endógenos (Cárdenas *et al.*, 2013); ausencia de lactancia ya que un número mayor de meses de lactancia se asocian con un menor riesgo de desarrollar CaMa por el retraso del reestablecimiento de la ovulación y disminución de los niveles hormonales (Honda *et al.*, 1998). Además, en nuestro país la lactancia se ha reportado como un factor

protector en mujeres de 25 años o menos (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2000). Otro factor es el primer embarazo después de los 30 años ya que durante en el primer embarazo hay una disminución de la división celular mamaria seguida por una diferenciación terminal del tejido glandular (Anderson y Badzioch, 1985). Por último, también se considera el haber tenido terapias hormonales como tratamiento para distintos fines por más de cinco años ya que generan una exposición a estrógenos exógenos adicional a la concentración de los endógenos (Cárdenas *et al.*, 2013).

### **Factores de estilo de vida**

Dentro de este tipo de factores encontramos el consumo de alcohol (mayor a 10 g/día) debido a que éste incrementa los niveles de estrógenos en la sangre así como también disminuye la función inmune (McTiernan *et al.*, 2000). No obstante, cabe mencionar que en el año 2009 se mencionó que en población mexicana este factor de riesgo no está muy asociado debido a que menos del 5% de las mujeres consume alcohol (Romieu *et al.*, 2009).

También se ha visto que la dieta es un factor importante en el sentido de que existe un mayor riesgo de padecer CaMa en mujeres con alto consumo de carbohidratos, un deficiente consumo de frutas y verduras y por el contrario, un alto consumo de grasas saturadas y carnes rojas (Romieu *et al.*, 2009).

Aunado a lo anterior, se estima que el 25% de los casos de cáncer son causados por sobrepeso u obesidad y por un estilo de vida sedentario (Stephenson y Rose, 2003). Estos factores contribuyen al incremento del nivel de estrógenos debido a la producción de éstos por la conversión de andrógeno por acción de la aromatasa (CYP19) (Lipworth y Bailey, 2000). También se ha reportado que la obesidad incrementa el riesgo en un 40% en mujeres posmenopáusicas y en 2006, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición llevada a cabo por la Secretaría de Salud reportó un alto grado de obesidad en mujeres mayores de 20 años (71.9%)

Respecto al CaMa con fenotipo triple negativo, se ha reportado su asociación con factores como la menarquia temprana, una paridad alta, mujeres jóvenes con embarazos a término, tiempo de lactancia corto e índice alto de masa corporal, especialmente en mujeres premenopáusicas (Carey *et al.*, 2006).

## Genéticos

Del 5 al 10% de todos los casos de cáncer de mama se relacionan con mutaciones genéticas y dentro de éstas, las más importantes son las que ocurren en los genes *BRCA1* y *BRCA2* ya que son las mutaciones que se asocian con el cáncer hereditario (el primero se asocia a la aparición de CaMa en mujeres de entre 40 y 50 años y el segundo se asocia con mujeres en entre 60 y 70 años). En el caso de población caucásica, estas mutaciones confieren alrededor del 15 al 20% del riesgo (Hidalgo-Miranda, 2009). Dichos genes previenen el desarrollo del cáncer al regular el crecimiento incontrolado de las células y a su vez están comúnmente mutados en mujeres jóvenes diagnosticadas con la enfermedad (ACS, 2015 y Cárdenas *et al.*, 2013).

Además de las anteriores, existen mutaciones en genes que si bien no aumentan el riesgo al nivel de los genes *BRCA1* y *BRCA2*, también pueden contribuir con el desarrollo de cáncer de mama. Dentro de éstos encontramos *ATM* (ataxia telangiectasia mutado), el cual ayuda en la reparación del DNA dañado; el gen *TP53* que es considerado el guardián del genoma y ayuda a detener el crecimiento de células anormales; el gen *PTEN* (homólogo de fosfatasa y tensina) el cual ayuda normalmente a regular el crecimiento celular y el gen *PALB2* (socio y localizador del gen *BRCA2*) el cual como su nombre lo indica, produce una proteína que interactúa con *BRCA2* (ACS, 2015).

Los factores genéticos mencionados anteriormente se asocian con menos del 10% de los casos de cáncer de mama a nivel global (Robson, 2002), además que de acuerdo con lo reportado por Vogelstein *et al.*, 2013 al secuenciar el genoma de 1292 muestras de diferentes tipos de carcinomas, el cáncer de mama presenta una mediana baja en cuanto a mutaciones no sinónimas, comparado con otros tipos de cáncer como melanoma, pulmón y el colorrectal (Fig. 6). Es por ello, que se han llevado a cabo investigaciones en las que se ha encontrado que algunas

modificaciones epigenéticas como la metilación del DNA se ven alteradas comúnmente en este tipo de neoplasia (Widschwendter y Jones, 2002).

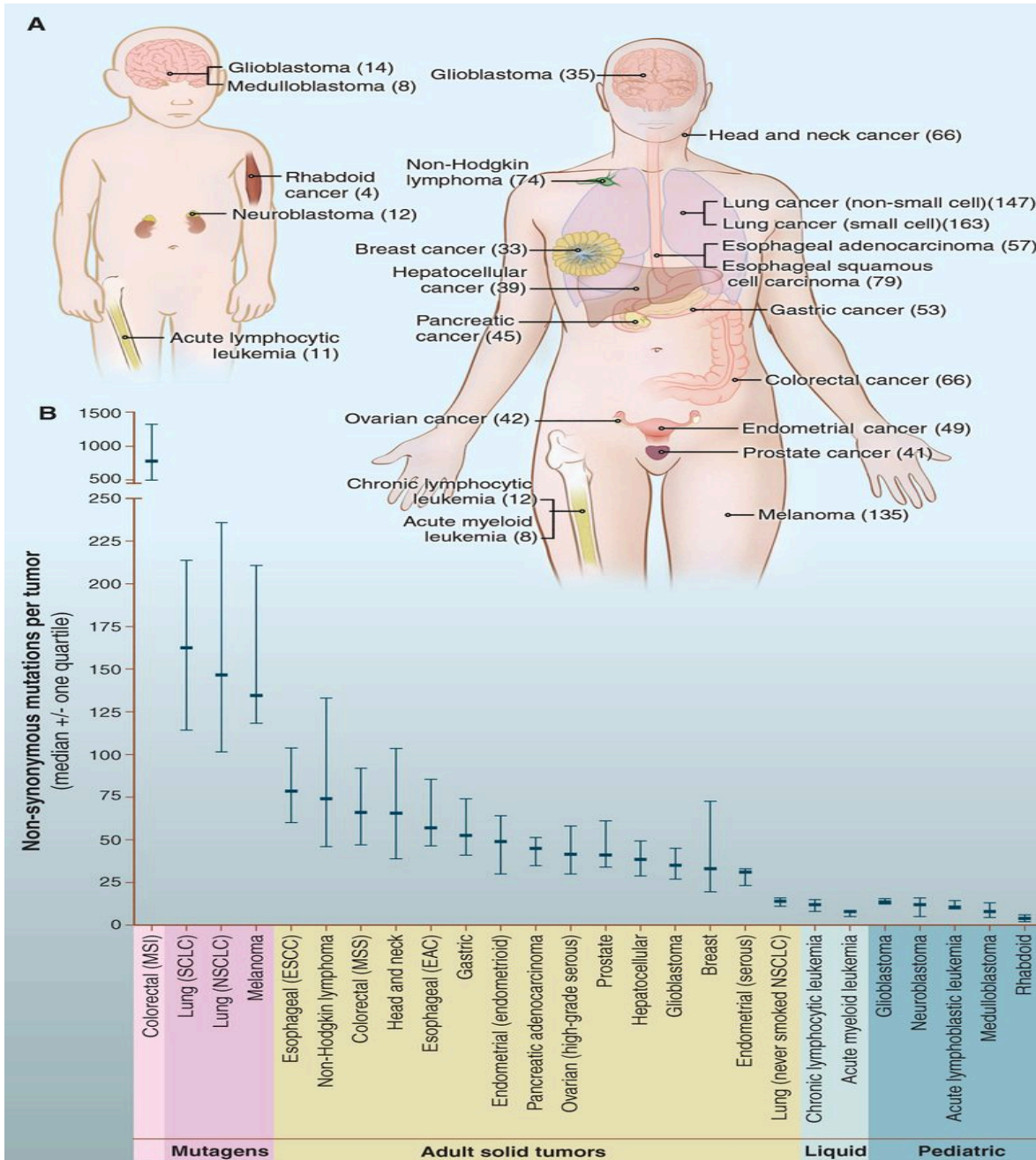


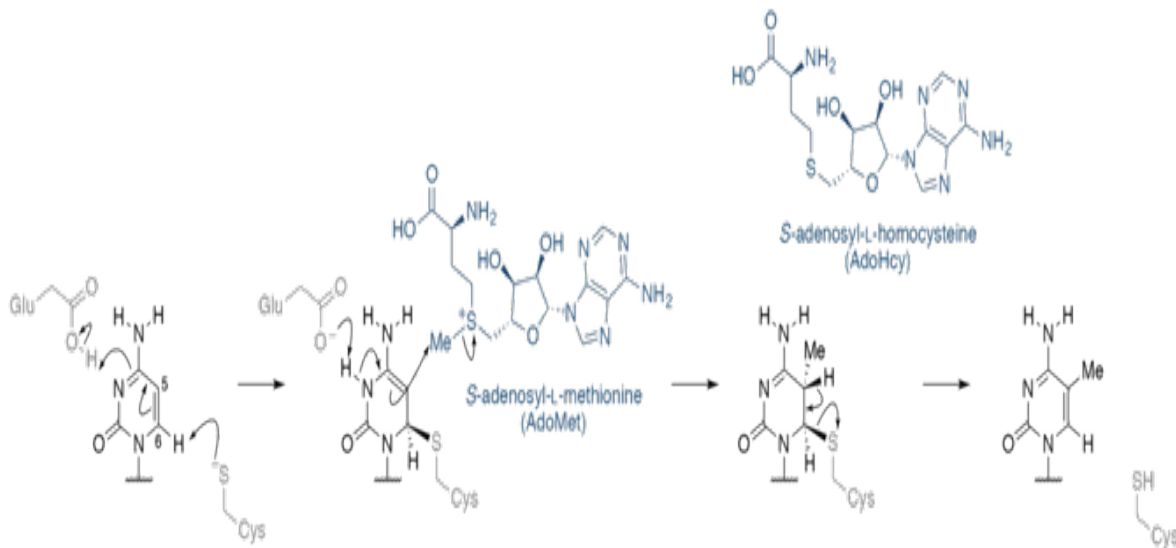
Figura 6. Número de mutaciones somáticas en diferentes tipos de cáncer. En A se representan los esquemas de la localización de los carcinomas adultos o pediátricos, entre paréntesis se indica el valor de la mediana de mutaciones no sinónimas. En B se muestra la gráfica de los valores de mediana de los diferentes tipos de tumores. MSI= inestabilidad microsatelital; SCLC= cáncer de pulmón de células pequeñas; ESCC= carcinoma de células escamosas esofaríngicas; MSS= estabilidad microsatelital; EAC= adenocarcinoma esofaríngeo (Vogelstein et al., 2013).

## **-Epigenética**

El término epigenética se refiere al estudio de los cambios heredables mitótica y/o meióticamente que se producen en la estructura y la organización del DNA (cromatina) los cuales implican cambios en la expresión génica y sin embargo, no involucra cambios en la secuencia nucleotídica (Feinberg, 2001). Esta disciplina se enfoca en mecanismos como la metilación del DNA o la modificación y variantes de histonas y, a través de estos mecanismos, estudia la modificación de sus procesos asociados en células eucariotas como la unión de factores de transcripción, procesos de splicing, silenciamiento de genes y/o de elementos transponibles, la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X, entre otros (Elango y Yi, 2008, Schwartz *et al.*, 2009, Choy *et al.*, 2010 e Inbar-Feigenberg *et al.*, 2013).

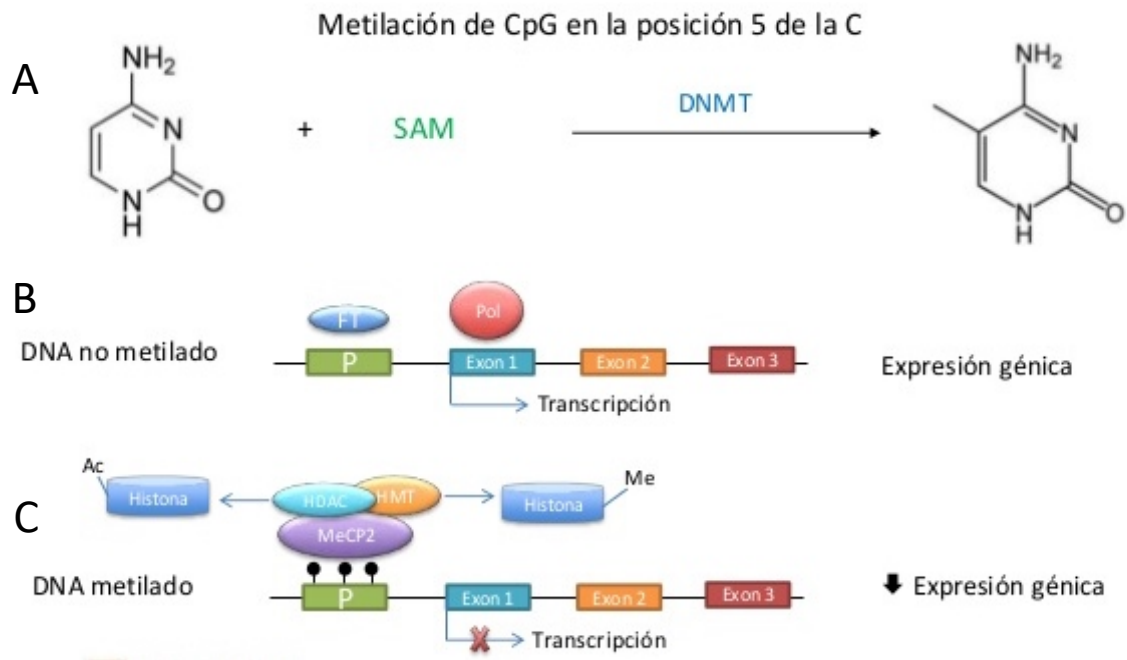
La presencia de 5mC históricamente fue descubierta tan pronto como se identificó al DNA como el material genético (Hotchkiss, 1948) y se refiere a la adición de un grupo metilo al carbono 5 de una citosina para formar 5-metil citosina (5mC), reacción que se lleva a cabo por medio de la actividad dirigida por enzimas denominadas DNA metil-transferasas (DNMTs) (Doerfler, 1983) las cuales transfieren dicho grupo metilo proveniente de la S-adenosil-L-metionina (SAM) a través del mecanismo mostrado en la Fig. 7. Dentro de estas enzimas encontramos básicamente dos tipos: DNMT3A y DNMT3B las cuales son responsables de la metilación *de novo* y la DNMT1 la cual es responsables de mantener el patrón de metilación del genoma durante la replicación debido a que presenta afinidad por DNA hemimetilado (Okano *et al.*, 1999 y Bestor, 2000).

La metilación del DNA afecta la expresión génica y la desregulación de la metilación del DNA afecta procesos como el desarrollo y la diferenciación celular por lo que dicha alteración se relaciona a varias patologías incluida el cáncer (Jones y Baylin, 2007. Además, dentro de su distribución la encontramos tanto en regiones intergénicas, donde se relaciona con la inactivación de elementos virales y transponibles (Walsh *et al.*, 1998 y Schulz *et al.*, 2006); en el cuerpo génico, donde se ha visto su asociación con procesos de splicing (Shuckla *et al.*, 2011 y Maunakea *et al.*, 2013); y en regiones promotoras, donde a continuación nos enfocaremos.



**Figura 7. Mecanismo de metilación de residuos de citosina, catalizado por DNA metiltransferasas (DNMTs) utilizando a la S-adenosil-metionina (SAM) como molécula donadora del grupo metilo. En este proceso el residuo de cisteína de la DNMT sufre una desprotonación y reacciona para unirse covalentemente con el C6 de la citosina. La carga negativa que adquiere la citosina es neutralizada por su interacción con un residuo de glutamato. SAM lleva a cabo un ataque nucleofílico en el C5 de la citosina transfiriendo el grupo metilo y posterior a ello la enzima DNMT puede ser liberada (ATDBio, 2005).**

El proceso de metilación mencionado anteriormente ocurre preferentemente en dinucleótidos CG y dentro del genoma existen regiones conocidas como “islas CpG” los cuales tienen una frecuencia 5 veces mayor de estos dinucleótidos comparados con otras regiones del genoma (Antequera y Bird, 1993 y Cross y Bird, 1995). No obstante, 70% de los genes (entre los que se encuentran genes housekeeper, tejido-específico y reguladores del desarrollo) en el genoma humano tienen promotores asociados a estas islas CpG por lo que otra de sus características es que en células sanas estas regiones no se encuentran metiladas (Saxonov *et al.*, 2006 y Deaton y Bird, 2017). Los grupos metilo añadidos quedan proyectados en el surco mayor del DNA y a su vez son reconocidos por proteínas MBD (proteínas con dominio de unión a dinucleótidos CpG metilados) que impiden la unión de factores transcripcionales (Fig.8), además de que pueden inducir una estructura cerrada de la cromatina lo que ocasiona el silenciamiento del gen.



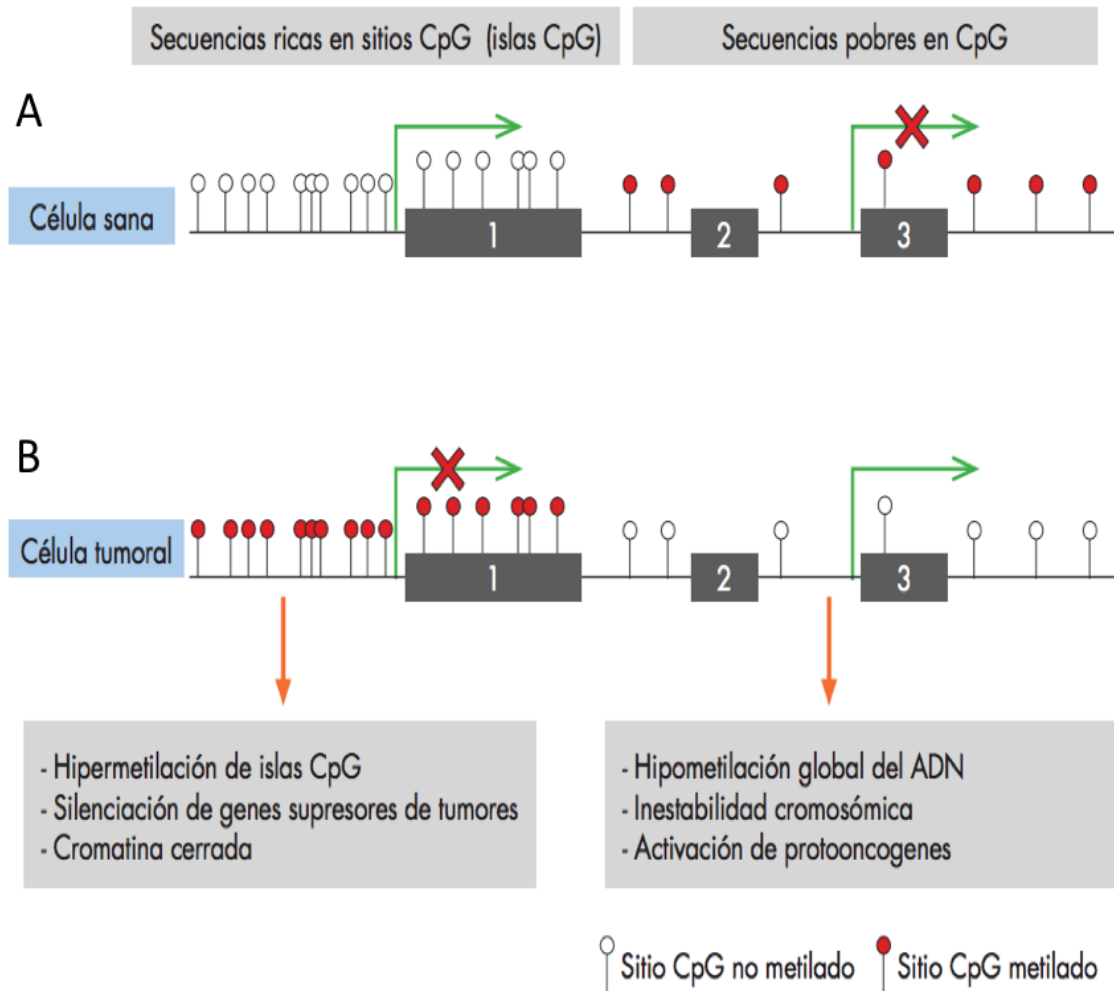
**Figura 8. Mecanismo de silenciamiento transcripcional de un gen dado por la presencia de metilación en su región promotora. A) La citosina es metilada por acción de enzimas DNA metil-transferasas (DNMT) utilizando como grupo donador a la S-adenosil-metionina (SAM) B) El DNA no metilado de la región promotora (P) permite la expresión génica de un gen particular C) El promotor metilado es reconocido por proteínas de unión a DNA metilado como MeCP2 que a su vez recluta otras proteínas que promueven la generación de marcas de histonas que inducen una estructura cerrada de la cromatina y reprime la expresión génica (Vázquez, 2013)**

Este proceso epigenético puede regular la expresión genética a través de dos maneras: directamente al impedir la unión de factores de transcripción y de manera indirecta al inducir la estructura cerrada de la cromatina (Salozhin *et al.*, 2005), lo cual ocurre a través de un proceso de hipermetilación llevado a cabo en islas CpG y que puede derivar en el silenciamiento de los genes correspondientes (Schulz, 2005).

Una apropiada metilación del DNA es esencial para el correcto funcionamiento y desarrollo de la célula, por lo que anomalías en este proceso conlleva a varias enfermedades y entre ellas, al cáncer. El metiloma de las células malignas es diferente al de las células normales y se caracteriza por un decremento global (hipometilación) en el contenido de CpG metilados, favoreciendo la apertura de la cromatina lo cual contribuye a una inestabilidad genómica y activación de oncogenes (Paz *et al.*, 2003). Por el contrario, también hay un proceso de



hipermetilación en islas CpG en promotores de genes específicos por lo que éstos se silencian y algunos de ellos actúan como supresores de tumores en condiciones normales (Fig. 9) (Kulis y Esteller, 2010).



**Figura 9. Alteración y efectos de la metilación del DNA en sitios CpG comparando células sanas con células tumorales. A) En una célula sana, las islas CpG contenidas en regiones promotoras de genes se encuentran desmetiladas para permitir su expresión, por otro lado, las secuencias pobres en dinucleótidos CpG pueden estar metiladas pero no tienen efecto sobre la actividad transcripcional B) En una célula tumoral ocurre lo contrario, las secuencias con baja densidad de dinucleótidos CpG se desmetilan (hipometilación global) mientras que las secuencias con alta densidad CpG como las islas CpG se metilan (hipermetilación) lo cual inhibe la actividad transcripcional de los genes (tomado de Longo. 2017).**

## **-Vía Wnt/ $\beta$ -catenina**

Actualmente se conocen cuatro vías de señalización Wnt; sin embargo, la vía Wnt  $\beta$ -catenina es la vía canónica, la mejor estudiada y más importante respecto a la regulación de la proteína  $\beta$ -catenina (Nuse y Varmus, 1992, Adamson *et al.*, 1994, Luu *et al.*, 2004 y Dosen *et al.*, 2006)

Los ligandos Wnt son proteínas de secreción que se encuentran altamente conservadas en los metazoarios, en mamíferos se tiene una diversidad de 19 proteínas Wnt las cuales son codificadas por genes independientes (MacDonald *et al.*, 2009). Se caracterizan por contener 22 residuos de cisteína los cuales forman puentes disulfuro para poder mantener una estructura secundaria globular (Willert y Nusse, 2012), además, en su extremo amino terminal se encuentra la secuencia señal para la secreción, la cual se compone por alrededor de 20 aminoácidos hidrofóbicos (Willert *et al.*, 2003).

Para la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, además de la presencia de los ligandos Wnt se requiere de receptores dentro de los cuales existen dos familias: los receptores Frizzled (Fzd o Fz) (Logan y Nusse, 2004) y las proteínas relacionadas a receptores LDL 5 y 6 (LRP5 y LRP6) las cuales se consideran como co-receptores para la activación de la vía (He *et al.*, 2004). El genoma de mamíferos contiene 10 genes que codifican para receptores Fzd, los cuales tienen una capacidad variable para activar la vía Wnt/ $\beta$ -catenina cuando se une un ligando Wnt, en asociación con una proteína LRP5 ó 6 (Binnerts *et al.*, 2007).

Dentro del citosol, el estado activo o inactivo de esta vía depende de la regulación de la degradación/fosforilación de  $\beta$ -catenina citosólica por los ligandos WNT. Como se observa en la Figura 10, AXIN funciona como una proteína de andamiaje debido a que contiene distintos dominios de unión para interactuar con otras proteínas como APC, GSK3, CK1 $\alpha$ , etc. La función que tiene este complejo multiproteico es reconocer a  $\beta$ -catenina que se encuentre de manera libre en el citoplasma para fosforilarla secuencialmente en las serinas 33, y 37 y en la treonina 41 (Kimelman y Xu, 2006), dichas fosforilaciones crean un sitio de unión que es reconocido por la

proteína E3 ubiquitin-ligasa  $\beta$ -trcp, la cual ubiquitina a  $\beta$ -catenina para posteriormente ser degradada vía proteosoma (MacDonald *et al.*, 2009).

Como se mencionó anteriormente, para activar la vía Wnt/ $\beta$ -catenina se requiere la formación de un complejo dado por la unión de un ligando WNT a un receptor Fzd y un co-receptor (LRP5 ó 6). Cuando esto ocurre, LRP5/6 se fosforila en motivos PPPSPxS (P= prolina, S= serina o treonina y x= residuo variable) (Tamai *et al.*, 2004) los cuales al estar fosforilados sirven como sitios de unión para AXIN (Davidson *et al.*, 2005). Por otro lado, los receptores Fzd están asociados con otra proteína citosólica denominada Dishevelled (Dsh o Dvl) (Wallingford y Habas, 2005), cuando la vía se activa, previo a la interacción de Fzd con Dvl, esta última se une a Axin formando un complejo que es reclutado hacia la membrana plasmática para su unión con LRP5/6 (Cliffe *et al.*, 2003).

La ausencia de la función del complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina, da lugar a su estabilización en el citosol, así como a su posterior translocación lo cual sugiere que ocurre de forma independiente de las importinas y a través de una señal de localización nuclear que interactúa directamente con proteínas del poro nuclear (Henderson y Fagotto, 2002). Una vez dentro del núcleo,  $\beta$ -catenina forma un complejo con el factor de transcripción de linfocitos T (TCF, en mamíferos se tienen 4 genes) y posteriormente se reclutan otros co-activadores para inducir la expresión génica (Daniels y Weis, 2005). TCF se une a una secuencia específica en el DNA conocida como elemento de respuesta a Wnt (WRE), CCTTTGWW (W puede ser T o A) el cual se encuentra río arriba del sitio de inicio de la transcripción de sus genes blanco (Hatzis *et al.*, 2008 y MacDonald *et al.*, 2009); además, algunas variantes de splicing de TCF1 y TCF4 tienen un segundo dominio de unión a DNA denominado C-clamp, el cual reconoce un elemento adicional de GC río abajo de WRE (Atcha *et al.*, 2007).

La vía Wnt/ $\beta$ -catenina regula procesos de proliferación, especificación del destino celular, diferenciación celular, actúa en diferentes etapas del desarrollo y regula la homeostasis tisular (Vlad *et al.*, 2008) por lo que sus genes blanco son diversos así como específicos del tipo y contexto celular (Logan y Nusse, 2004).

De manera general, en el cáncer las proteínas supresoras de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina se encuentran mutadas lo que ocasiona una pérdida de su función. Mientras que los componentes positivos para la vía están activos lo cual genera una desregulación de la vía (Polakis, 2012). Por ejemplo, *APC* es uno de los genes mutados con mayor frecuencia y la pérdida de su función se asocia con el desarrollo de cáncer colorrectal (Clements *et al.*, 2003), otros genes cuya mutación se relaciona con algún tipo de cáncer son *CTNNB1* con carcinoma hepatocelular (Polakis, 2007), *AXIN* con cáncer colorrectal (Salahshor y Woodgett, 2005), *GSK3b* con leucemia (Abrahamsson *et al.*, 2009), *LRP5* con cáncer de mama (Bjorklund *et al.*, 2009), etc.

Por otro lado, ha sido evidente que modificaciones epigenéticas en el DNA y la cromatina también juegan un rol importante para la progresión del tumor al modular los activadores o supresores de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Rodriguez-Paredes y Esteller, 2011). En un estudio previo se ha demostrado el impacto que tiene la metilación del DNA sobre la tumorigénesis asociada a WNT, donde por ejemplo se ha visto que la supresión farmacológica de DNMTs reduce efectivamente la formación de tumores en ratones con *APC* mutado los cuales desarrollan rápidamente pólipos intestinales en sus primeros 6 meses de vida y que proveen de un modelo para el estudio de etapas tempranas del cáncer colorrectal (Laird *et al.*, 1995). Estudios posteriores revelaron que la deficiencia de MBD2 (proteína con dominio de unión a CpG metilado 2) favorece un incremento en los niveles de LECT2 (quimiotaxina derivada de células leucocitarias 2) el cual funciona como regulador negativo de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, por lo que la ausencia de MBD2 reprime la formación de tumores al atenuar dicha vía (Pheesse *et al.*, 2008). Enfocándonos en la metilación del DNA, se ha reportado que genes cuyas proteínas tienen acción como inhibidores de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina son blancos comunes de este mecanismo epigenético en análisis de promotores con DNA metilado realizado en cánceres de colon, páncreas y meduloblastoma (Suzuki *et al.*, 2002, Kongkham *et al.*, 2010 y Vincent *et al.*, 2011). Por último, también se ha reportado que miembros de la familia de proteínas secretadas relacionadas a frizzled (sFRP), que inhiben a ligandos WNT se encuentran silenciados por metilación del DNA en varios

tipos de cáncer como hepatocelular, melanoma y de mama (Suzuki *et al.*, 2008, Takagi *et al.*, 2008 y Ekstrom *et al.*, 2011). En el caso particular de nuestros genes de interés (*AXIN2* y *DKK1*), a pesar de que ha sido poca la evidencia reportada respecto a su asociación con el cáncer de mama, su participación dentro de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina ha sido ampliamente demostrada como se detallará a continuación. Además, ambos genes están reconocidos como reguladores negativos de la vía y mientras *AXIN2* actúa a nivel intracelular, *DKK1* lo hace de forma extracelular:

### **-*AXIN2***

Este gen es nombrado así por su homología con *AXIN1* y se considera que ambas proteínas son funcionalmente equivalentes (Behrens *et al.*, 1998, Yamamoto *et al.*, 1998 y Chia y Costantini, 2005). Se encuentra localizado en el cromosoma 17q24.1, tiene una longitud de 33 kb, contiene 13 exones y codifica para una proteína de 843 aminoácidos (Rosales-Reynoso *et al.*, 2016).

Actúa como una proteína de andamiaje para el ensamble del complejo de reconocimiento y destrucción de  $\beta$ -catenina y comparte similitud en tres dominios con *AXIN1*: el dominio de unión a Tankirasa el cuál regula su estabilidad (Huang *et al.*, 2009), el dominio RGS (regulador de la señal de proteínas G) que regula la unión con APC (Behrens *et al.*, 1998), el dominio de unión a  $\beta$ -catenina (Yamamoto *et al.*, 1998) y el dominio DIX, que interactúa con Disheveled (Behrens *et al.*, 1998, Ikeda *et al.*, 1998, Fagotto *et al.*, 1999 y Kishida *et al.*, 1999). No obstante, mientras *AXIN1* se expresa de manera ubicua, *AXIN2* tiene patrones de expresión tejido-específico (Yamamoto *et al.*, 1998) y la regulación de la expresión de ambos genes es independiente, ya que *AXIN2* es dependiente de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Jho *et al.*, 2002 y Leung *et al.*, 2002) por lo que su expresión es un indicador de la exposición de las células a ligandos Wnt (Jho *et al.*, 2002 y Lustig *et al.*, 2002). Además, en este gen se ha observado frecuentemente la pérdida de heterocigosidad en algunos tipos de cáncer como neuroblastomas y cáncer de mama (Mai *et al.*, 1999 y Wu *et al.*, 2015).

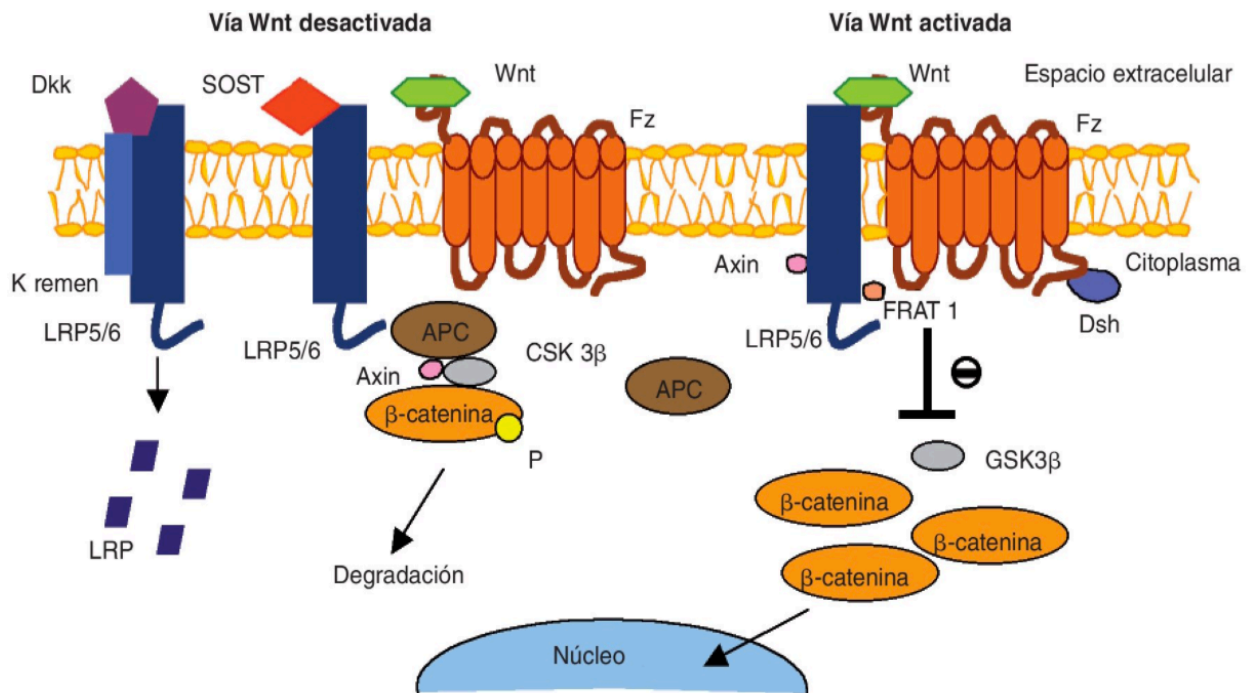
Resultó de nuestro interés este gen debido a que a diferencia de *AXIN*, *AXIN2* no tiene afinidad por Dvl por lo que los complejos formados por esta proteína no son

reclutados hacia la membrana y por lo tanto no pierden su funcionalidad (Bernkopf *et al.*, 2015). Debido a lo anterior, *AXIN2* cumple con un mecanismo de retroalimentación negativa para limitar a la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y debido a ello, su pérdida genera un desbalance importante dentro de las células que ya tienen activada la vía (Yan *et al.*, 2001, Lustig *et al.*, 2002 y Jho *et al.*, 2002, Salahshor y Woodgett, 2005 y Qian *et al.*, 2011).

### **-DKK1**

La familia de proteínas DKK consta de principalmente cuatro proteínas en vertebrados: DKK1, 2, 3 y 4 (Zorn, 2001). Dentro de éstas, DKK1 es la proteína mejor estudiada, su gen se localiza en el cromosoma 10q21.1, consta de 3762 pb, 4 exones y codifica para una proteína de 266 aminoácidos (Glinka *et al.*, 1998). Su función principal consiste en prevenir la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina por lo cual se considera como un regulador negativo de la misma. DKK1 presenta afinidad por LRP5/6 y se une a estos co-receptores, debido a esto, por un lado inhibe la unión de los ligandos Wnt al complejo receptor Fz-LRP5/6 (Mao *et al.*, 2001), y por el otro, se ha sugerido que DKK1 forma el complejo DKK1/LRP5 o 6/ Kremen el cual promueve la endocitosis de LRP y su posterior degradación con lo que se hace inviable su interacción con ligandos Wnt, no obstante, se han reportado resultados controversiales respecto a este segundo mecanismo LRP5/6 (Mao y Niehrs, 2003, Aguilera *et al.*, 2006, Cowling *et al.*, 2007 y Semenov *et al.*, 2008).

Se ha reportado que la función de la regulación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina puede ser llevada a cabo por DKK2 y DKK4, las cuales también presentan afinidad por LRP5/6 y Kremen, sin embargo, se consideran pobres inhibidores de la vía debido en parte a que no se expresan al mismo nivel que DKK1 por lo que esta proteína es la principal para la regulación de la vía y por ello nos interesó enfocarnos en DKK1 (Mao *et al.*, 2002 y Mariz *et al.*, 2015). Además, se ha sugerido que en embriones de *Xenopus* DKK2 también puede activar la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Wu *et al.*, 2000 y Brott y Sokol, 2002), y en el caso de DKK3, no bloquea la vía (Mariz *et al.*, 2015).



### Vía Wnt inactiva

### Vía Wnt activa

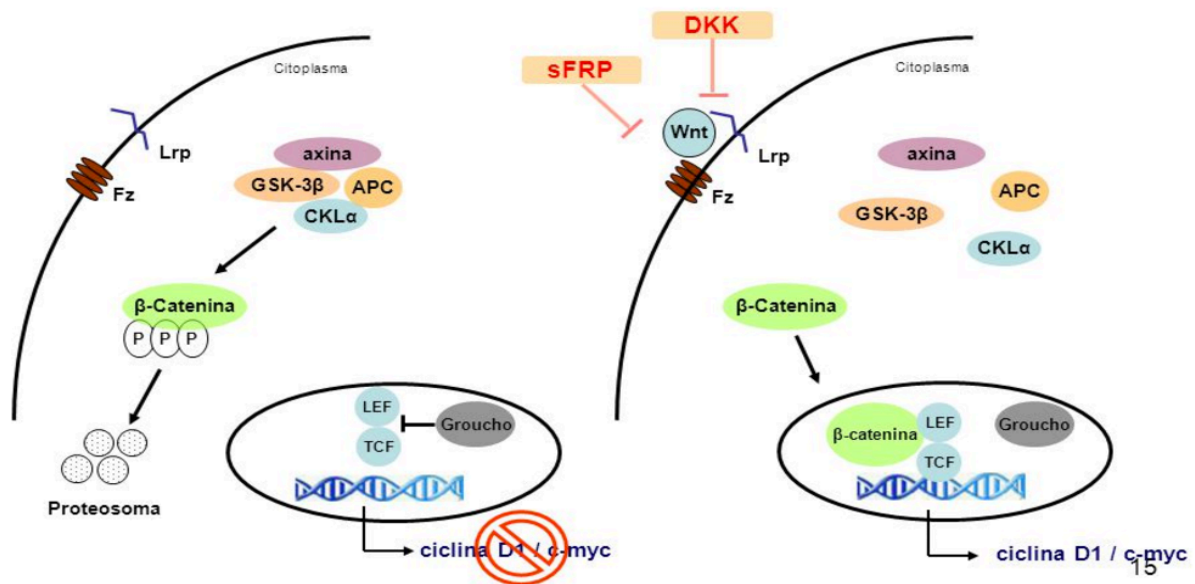


Figura 10. Vía Wnt/ $\beta$ -catenina activa o inactiva. A) La interacción de un ligando Wnt con el complejo receptor Fz-LRP5/6 promueve el reclutamiento del complejo de reconocimiento de  $\beta$ -catenina hacia la membrana, lo que inhibe el reconocimiento (vía APC), la fosforilación (vía GSK3 $\beta$ ) y la ubiquitinación (vía E3  $\beta$ -trcp  $\beta$ -catenina de  $\beta$ -catenina citosólica para su degradación vía proteosoma. B)  $\beta$ -catenina libre en el citosol transloca al núcleo donde desplaza a Groucho y forma un heterodímero con TCF/LEF el cual funciona como un factor transcripcional para la inducción de genes blanco de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina como *ciclina D1*, *C-myc*, *AXIN2*, *LEF1*, etc. (Escobar-Gómez et al., 2009 y Valencia, 2010).

## **Antecedentes**

Dentro de la investigación realizada en cáncer de mama, se han llevado a cabo diversos estudios que resultaron de interés para el actual trabajo:

### **-Importancia de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en el CaMa**

En el estudio publicado en 2013 por el grupo de Loh y colaboradores, se reportó que la sobreactivación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina por la proteína recombinante Wnt3a en células MCF7 incrementa la resistencia de las células a los efectos antitumorales de la terapia con Tamoxifen. Además, también se vio que una cepa de la misma línea celular pero con resistencia a Tamoxifen, tiene mayor expresión tanto de genes blanco de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina como de genes marcadores de la transición epitelio-mesénquima (EMT), los cuales disminuyen su expresión después de un tratamiento con la proteína IWP-2, el cual es un inhibidor de dicha vía.

En 2018 Koval y Katanaev estudiaron una cohorte de pacientes con cáncer de mama (n= 969) y otra cohorte de mujeres sanas (n= 113) (cuyos datos se encuentran disponibles en The Cancer Genome Atlas (TCGA)), los resultados de análisis de correlación entre niveles de expresión de mRNA dados por valores de RNA-seq de 101 genes componentes de la vía WNT. Se demostró un reordenamiento de la actividad de la vía dado por una discordancia significativa entre las asociaciones determinadas de los niveles de expresión de mRNA de los genes analizados en tejidos sanos contra los observados en tejidos tumorales. Se encontraron clusters de genes distintos entre los dos tipos de tejidos los cuales van desde las diferentes interacciones mostradas por los ligandos WNT (19) con los receptores Fzd (10) para poder activar la vía, hasta diferentes genes blanco cuya transcripción es inducida. Además, al estratificar las muestras tumorales por estatus de presencia/ausencia del RE, RP y HER2, los clusters encontrados en cada fenotipo también fueron distintos lo cual sugiere que pueden estar involucrados con respuestas diferenciales a tratamientos anti-WNT. Por último, en muestras de cáncer triple negativo se encontraron 2 subgrupos de genes los cuales se asociaron de manera distinta con características clínicas: el primero con pacientes asiáticas y



con un status post y peri menopáusico y, mientras que el segundo se asoció con pacientes de población blanca y con un status pre-menopáusico.

#### **-Asociación de mutaciones en genes de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina con CaMa**

Variantes genéticas encontradas en genes como *APC*, *AXIN* y *CTNNB1* resultan en una hiperactivación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, lo cual se ha demostrado en algunos tipos de cáncer como el colorrectal (Kinzler *et al.*, 1991, Nishisho *et al.*, 1991, Morin *et al.*, 1997 y Lammi *et al.*, 2004). No obstante, como se mencionó anteriormente, el cáncer de mama no es un tipo de cáncer que se caracterice por abundantes alteraciones genéticas y por ende la evidencia de mutaciones encontradas en genes de la vía Wnt es escasa. Sin embargo, en el carcinoma de mama se ha reportado mediante ensayos de inmunohistoquímica, la presencia de niveles elevados de  $\beta$ -catenina nuclear y citoplásmica (que no se observan en tejidos de mama sanos) en cerca del 50% de los casos (Johnson *et al.*, 2000) lo que además correlaciona con la expresión de uno de sus genes blanco como ciclina D1 y una prognosis pobre de las pacientes (Ryo *et al.*, 2001).

#### **-Asociación de la metilación del DNA en genes de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina con CaMa**

La metilación aberrante del DNA en regiones promotoras es un evento común en neoplasias humanas que lleva a la pérdida de la expresión génica (Widschwendter y Jones, 2002 y Robertson, 2005).

Se ha reportado que en el cáncer de mama la metilación de diversos genes como WIF1 (factor inhibitorio de Wnt 1), está presente en 67% de tejidos con cáncer de mama primario en el trabajo realizado por Ai *et al.*, 2006 así como en un 63 y 50% en pacientes con carcinoma invasivo ductal e invasivo no ductal (Wissman *et al.*, 2003).

Respecto a SFRP1 (proteína secretada relacionada con Frizzled 1), el 61% de las pacientes con cáncer de mama primario analizadas por Veeck *et al.*, 2006 presentaron metilación y además se asoció con una menor sobrevivencia en casos de carcinoma de tipo invasivo; en SFRP2 (proteína secretada relacionada con

Frizzled 2), se encontró metilación en 100% de las líneas celulares de cáncer de mama examinadas y en SFRP5 la metilación estuvo en el 90% de las mismas líneas. Sin embargo, cuando se analizaron muestras de tejido tumoral de mama, se encontró metilación del 77 y 71% respectivamente (Suzuki *et al.*, 2008). Los genes mencionados anteriormente funcionan como antagonistas de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina por lo que su pérdida conduce a una sobreactivación, promoviendo la tumorigénesis en el tejido mamario (Veeck *et al.*, 2006).

Por otro lado, en genes como *APC* y *CDH1* se ha demostrado una correlación entre la metilación en su promotor y la pérdida de su expresión (Jin *et al.*, 2001, Virmani *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2001 y Sarrio *et al.*, 2003). En ambos casos, la pérdida de su expresión favorece la acumulación de  $\beta$ -catenina y la transcripción inducida por TCF/LEF, no obstante, en el caso de E-caderina también se ha sugerido que su disminución favorece procesos como la transición epitelio-mesénquima así como una mayor invasividad (Yang *et al.*, 2001).

En el caso particular de los genes de nuestro interés, para el gen *DKK1* se ha reportado metilación en el 37% de 16 líneas celulares de cáncer oral, no obstante, en todas las líneas metiladas se encontró metilación bialélica, por lo que se observó un completo silenciamiento del gen, encontrando una expresión normal en líneas celulares con ausencia de metilación (Paluszczak *et al.*, 2015), así mismo, en cáncer de colon también se ha visto silenciamiento de *DKK1* atribuido a la metilación en su promotor (Aguilera *et al.*, 2006). Tanto en líneas celulares de cáncer de mama como en el caso de pacientes con esta enfermedad, se ha encontrado metilación en el 19% de los casos y en el 27% de 11 líneas celulares analizadas en el estudio reportado por Suzuki *et al.* en 2008. Mientras que en el estudio realizado por Muradiye *et al.* en 2012, se encontró metilación en *DKK1* en el 70% de las muestras de tejido tumoral de mama y en el 61% de muestras de tejido adyacente sano (n= 83), comparado con un 33% encontrado en tejido mamario sano (n= 9). Al analizar 70 de las 83 muestras tumorales, se encontró pérdida de la expresión de *DKK1* en el 69% de ellas.

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, se sabe que *AXIN2* es un gen blanco de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Jho *et al.*, 2002 y Lustig *et al.*, 2002) y funciona

como una proteína de andamiaje para el ensamblaje del complejo de reconocimiento de  $\beta$ -catenina. Además, es de interés el hecho que dentro del complejo de reconocimiento de  $\beta$ -catenina, se considera que *AXIN2* es la proteína menos abundante, por lo que cambios en su expresión pueden ser clave durante la regulación de la vía WNT/ $\beta$ -catenina una vez que se activa (Lee *et al.*, 2003).

En estudios previos, se ha visto asociación de *AXIN2* con:

-Cáncer colorrectal: donde se ha reportado hipermetilación en su región promotora en pacientes con dicha enfermedad (n=9) comparado con individuos con adenomas (n=15) o con tejido adyacente sano (n=6) (Galamb *et al.*, 2016). En otro estudio, se encontró también que la hipermetilación del promotor de *AXIN2* se presenta en casos de cáncer colorrectal que presentan específicamente inestabilidad microsatelital (N= 248) y al trabajar con la línea HCT116 y desmetilar el gen con un tratamiento con 5'-azacitidina o mediante transfección del cDNA con el fin de recuperar la expresión de *AXIN2*, se encontró que el restablecimiento de *AXIN2* inhibe el crecimiento celular y además suprime la actividad de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Koinuma *et al.*, 2006) y por último, en el estudio publicado por Mansour *et al.* en 2014, se reportó metilación encontrada en el promotor de este gen en el 32.8% de pacientes (N= 125), no obstante, ésta no se asoció con alguna característica clinicopatológica.

-Cáncer pulmonar: en donde se ha visto hipermetilación en el promotor del gen en 52% de pacientes con este tipo de cáncer, además de que dicha alteración correlaciona de forma significativa con una baja expresión de la proteína (p= 0.039), y esta alteración en la proteína correlaciona con una mayor acumulación de  $\beta$ -catenina en citoplasma (p= 0.023) así como con un corto tiempo de supervivencia de las pacientes (p= 0.046) y con estadios tempranos de la enfermedad (p=0.016) (Tseng *et al.*, 2008).

## Planteamiento del problema

La metilación del DNA es el mecanismo epigenético mayormente estudiado y del que se ha establecido su importancia para la regulación génica. Se sabe que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina se encuentra alterada en el cáncer de mama y, principalmente, en el fenotipo triple negativo. Por otro lado, se ha descrito que los genes *AXIN2* y *DKK1* son dos reguladores negativos de dicha vía y su desregulación se ha relacionado con distintos tipos de cáncer, sin embargo, aún no se ha establecido el mecanismo por el que actúan ni se ha confirmado su participación en el cáncer de mama. Por lo tanto, con el presente trabajo buscamos determinar la relación de estos dos genes con la metilación presente en su promotor, así como con la vía Wnt/ $\beta$ -catenina; utilizando líneas celulares triple negativo de cáncer de mama.

## Justificación

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor índice de mortalidad en mujeres tanto en México como a nivel global. Dentro de los subtipos moleculares de este cáncer, el triple negativo se caracteriza por ser el fenotipo con un peor pronóstico lo cual se refleja en una menor tasa de supervivencia y es el que más defunciones aporta debido a la ausencia actual de un tratamiento específico y eficiente para las pacientes que lo presentan. Debido a lo anterior, resulta muy importante contribuir al esclarecimiento de las alteraciones moleculares presentes en las células malignas con este fenotipo, donde se ha observado que una de las vías mayormente desreguladas es la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.

Dentro de los genes que participan en dicha vía, *AXIN2* y *DKK1* son reguladores negativos de la misma y hay antecedentes que reportan la ausencia de sus proteínas en pacientes con cáncer lo cual en algunos casos incluso se ha asociado con un peor pronóstico. Sin embargo, se desconoce la importancia de la participación de estos genes en el cáncer de mama triple negativo y si la presencia de hipermetilación en los promotores de *AXIN2* y *DKK1* tiene como efecto un decremento en su expresión lo cual eventualmente contribuya con una mayor actividad de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y favorecer un comportamiento más agresivo de

las células malignas debido a que los genes blanco de dicha vía participan en procesos como la migración y proliferación celular. Por lo tanto, la búsqueda de genes cuya participación sea relevante dentro de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en células de cáncer de mama triple negativo permitirá tener un mejor entendimiento de este fenotipo en particular y hacer un mayor enfoque en estos genes para el desarrollo de futuras terapias.

## **Hipótesis**

La metilación en las regiones promotoras de los genes *AXIN2* y *DKK1* favorecerá la sobreactivación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en líneas celulares de cáncer de mama con fenotipo triple negativo.

## **Objetivo general**

Determinar si existe la asociación de la metilación del DNA en regiones promotoras de los genes *AXIN2* y *DKK1* con el decremento de su expresión y su relación con la actividad de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en líneas celulares de cáncer de mama con fenotipo triple negativo.

## **Objetivos particulares**

- Determinar la correlación de la metilación del DNA en las regiones promotoras de *AXIN2* y *DKK1* con la cantidad de mRNA, de la información obtenida de líneas celulares de cáncer de mama de la base de datos The Cancer Cell Line Encyclopedia.
- Comprobar el patrón de metilación del DNA en la región promotora de los genes *AXIN2* y *DKK1* de las líneas celulares MDA-MB231, HCC1937 y DU4475.
- Determinar la abundancia de *AXIN2* y *DKK1* en las líneas celulares MDA-MB231, HCC1937 y DU4475.
- Determinar si existen diferencias estadísticamente significativas de la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en las líneas celulares MDA-MB231, HCC1937 y DU4475.

## Metodología

### -Líneas celulares

Se consultó la base de datos The Cancer Cell Line Encyclopedia disponible y de libre acceso vía electrónica, estableciendo los siguientes criterios para la selección de las líneas celulares que se utilizaron en este trabajo:

- 1- Líneas celulares de cáncer de mama con fenotipo triple negativo.
- 2- Una línea celular en donde los genes *AXIN2* y *DKK1* no estén metilados.
- 3- Una línea celular en donde este *AXIN2* metilado y *DKK1* no metilado.
- 4- Una línea celular en donde este *DKK1* metilado y *AXIN2* no metilado.

De acuerdo con los criterios anteriores, se seleccionaron tres líneas celulares con fenotipo triple negativo: **MDA-MB231** (criterio 2), **HCC1937** (criterio 3) y **DU4475** (criterio 4).

Las células fueron donadas por el banco de líneas celulares del Instituto Nacional de Cancerología y por el laboratorio de la Dra. Leticia Rocha Zavaleta del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y posteriormente fueron crecidas en el laboratorio C-242 del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Las condiciones de cultivo para las células fueron las siguientes:

**Tabla 3. Líneas celulares utilizadas y las condiciones para su crecimiento.**

Línea celular	Condiciones
<b>MDA-MB231</b> (ATCC) <b>HCC1937</b> (ATCC) <b>DU4475</b> (ATCC)	-Medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) R4130. Sigma-Aldrich. -Suero Fetal Bovino al 10% S1650-500. Biowest.  -Incubación a 37°C. -Atmósfera con 5% de CO <sub>2</sub> . -Cambio de medio cada 2 o 3 días.

## **-Extracción de DNA**

El aislamiento de DNA en cada línea celular se realizó de cultivos con una confluencia del 70 al 80% a partir de una caja T-75 (Santa Cruz Biotechnology) mediante el protocolo modificado de extracción de DNA de Daly (1996):

- Las células se lavaron con PBS y se les añadió tripsina al 0.05%.
- Se neutralizó la tripsina con medio suplementado en proporción 1:1 y las células se recuperaron y se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos.
- Se desechó el sobrenadante y el pellet se homogenizó en 20 mL de buffer de lisis.
- Se centrifugó a 2000g por 10 minutos a 4°C.
- Se desechó el sobrenadante y el pellet se homogenizó en 2 mL de buffer de extracción y 2 µL de RNAsa A (nº de cat. EN0531, Thermo Fisher Scientific).
- Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 20 µL de proteínasa K (nº de cat. EO0491, Thermo Fisher Scientific).
- Se mezcló por inversión y se incubó durante 30 minutos a 50°C en baño maría.
- Se agregaron 2 mL de fenol saturado (nº de cat. 15513-047, Invitrogen) y se mezcló en vortex.
- Se centrifugó a 2000g durante 20 minutos a 4°C.
- Se tomó la fase superior y se le agregaron 3 volúmenes de etanol al 100% frío, se mezcló por inversión.
- El DNA precipitado se recuperó con una punta de micropipeta y se lavó con 1 mL de etanol al 70% frío.
- Se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante.
- Los dos pasos anteriores se repitieron dos veces (para un total de 3 lavados).
- El pellet se dejó secar a 40°C por 5 minutos y posteriormente se resuspendió en 100 µL de agua libre de DNAsas (nº de cat. P119C, Promega) durante 30 minutos a 55°C en un thermomixer compact (Eppendorf).

Al término de la extracción, el DNA aislado se cuantificó por Nanodrop y se almacenó en congelamiento a una T de -20°C.

Los componentes del buffer de lisis y buffer de extracción son los siguientes:

#### **Buffer de lisis**

Sacarosa	320 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Triton X-100	1 %
Tris-HCl pH7.4	10 mM

#### **Buffer de extracción**

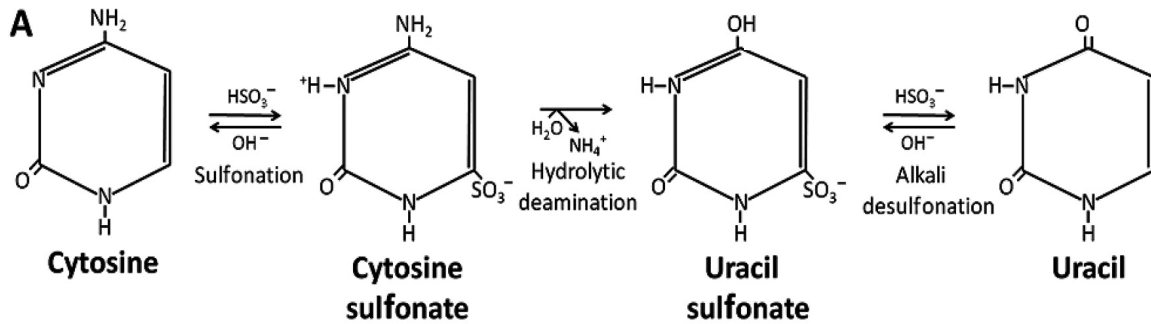
NaCl	250 mM
EDTA	50 mM
SDS	0.5 %
Tris-HCl pH 8.0	50 mM

#### **-Reacción de DNA con bisulfito de sodio**

El DNA extraído fue tratado con bisulfito de sodio con el fin de convertir las citosinas no metiladas en uracilos (Fig. 11). Para llevar a cabo lo anterior, se utilizó el kit EZ DNA Methylation Kit de Zymo Research partiendo de una cantidad de 500 ng de DNA para la reacción.

Al término del procedimiento, el DNA obtenido se volvió a cuantificar por Nanodrop y se almacenó en congelamiento a una T de -80°C.





**B**

	Original sequence	Sequence after bisulfite treatment
<b>Unmethylated DNA</b>	A-T-C-G-G-T-C-A-T-C-G-C-A-T	A-T-U-G-G-T-U-A-T-U-G-U-A-T
<b>Methylated DNA</b>	A-T-C-G-G-T-C-A-T-C-G-C-A-T	A-T-C-G-G-T-U-A-T-C-G-U-A-T

**Fig. 11. Conversión de la citosina del DNA en uracilo por acción de bisulfito de sodio. (A), Reacción química que involucra la sulfonación del C6 de la citosina (citosina sulfonada), desaminación hidrolítica en el C4 (uracilo sulfonado) y una desulfonación bajo condiciones alcalinas para generar el uracilo. La metilación en el C5 de la citosina impide la sulfonación en el C6 de la primera reacción. (B). Comparación de dos secuencias de DNA antes y después del tratamiento con bisulfito de sodio, el cual convierte citosinas no metiladas en uracilos, mientras que las citosinas metiladas permanecen sin ningún cambio.**

### **-PCR sensible a metilación (MSP)**

Se realizó una búsqueda en Genome Browser de las islas CpG presentes en las regiones promotoras de los genes *AXIN2* y *DKK1*. Además, para corroborar que las islas en efecto se encontraban dentro del promotor, se comparó y se encontró coincidencia de la localización de la isla con la marca de histona H3K4me3 (marca característica de promotores).

Una vez que se obtuvo la secuencia de la isla CpG de cada gen, se utilizó el programa Methyl Primer Express para hacer el diseño de los oligonucleótidos (oligos) que se utilizaron para llevar a cabo la PCR. A continuación, se muestran los oligos que se seleccionaron para realizar la técnica, así como la secuencia de la isla CpG de los genes *AXIN2* y *DKK1*:

## AXIN2

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para amplificar productos de PCR que permiten la determinación del patrón de metilación del gen *AXIN2*.

	Oligos para DNA metilado	Oligos para DNA no metilado
<b>Forward</b>	5'-GTA TTC GTT GCG TGG TTT TC-3'	5'-AGT GTA TTT GTT GTG TGG TTT TT-3'
<b>Reverse</b>	5'-CCA AAC AAA CGA CGA AAC AT-3'	5'-TAA CCA AAC AAA CAA CAA AAC AT-3'

### A) Secuencia de isla CpG

5'-CGCGGCCGCGGCCGCGGCCAAGCGGTGTTTACCTATGGGGCTTGGGCTTGCTCTG  
 CCGCTCACTCTCCAGCATCCACTGCCAGACATCCTGCGACCTGTCTCCTTCCCTCCCG  
 GGAAGCTGCAGGGCCCCAGCTCCGCCGGGGGCCCTCCTTCCCTGGCGGGCAGG  
 GCCAGGCCCGGCTCCGTGCCTTTCCATTGCGTTTGGGCAAGGTAAGTGCCTCTGCTG  
 CCGCTGTGGGAACCAAGAACCACACCCAACCCAGAGACCCGGTTAAATCTCCGGG  
 ACTCTAGAATCAGACAATTCAGCAAGTCGGGGGGCTGGTGACACGAAAGACCCATG  
 CACCTGCTCCCCGCACCCTCACCCGGCCGTGCACTCTGCCGCCCTTTAGAAACTAA  
 ATGCCTGTAATGCGGCTCCACCTCACACCTGCCCATGGACCTGGCTGGGAGACAA  
 GCCCCACACGGGACACTGCGGTCCGCCCGGCACTTACCCAAACTGCTCGCTGGGCA  
 TGGTTTCCGGAGCCTTGGAGTGGCTTTTGCATTTTCGAGTAGCAGTAATACTCGCTGC  
 CCCCAGGGCAGAAGCAGT**GCACCCGCTGCGTGGCCTCCGCCTCGATCTCCTCCTTG**  
**GTCTTGGGGACGGCATGGTGGTGGATGTAGTGGTGGTGGACATGCTTCGTGCTG**  
**CTTGG**TCACAAAGCCTTTGCCCCCGAGGAGGGGGCAGGCGCCCGGCGAGGCGGCC  
 GCGGGAGGCAGCTTGCCACCGGGCGGGAGCAGGGAGTGGTACTGCGAATGGTGGT  
 GGTGGTGGTGGTCCGGGGAGCGGGAGCGGGGGCTATAGCGGCCTACGCCTGGAGA  
 CTGGCAGCCAGGGGTCTTGAGGACCCTGGACAGGTGATCGTCCAGTATCGTCTGCG  
 GGTCTTCTCGTAGCTGCCGGAGGGCAGTAGGGAGAGGGGGTGTGCGTGGGCGC  
 CCCCTCCCGCAATTGAGTGTGAGCTCG-3'

Tamaño del producto= 99 pb

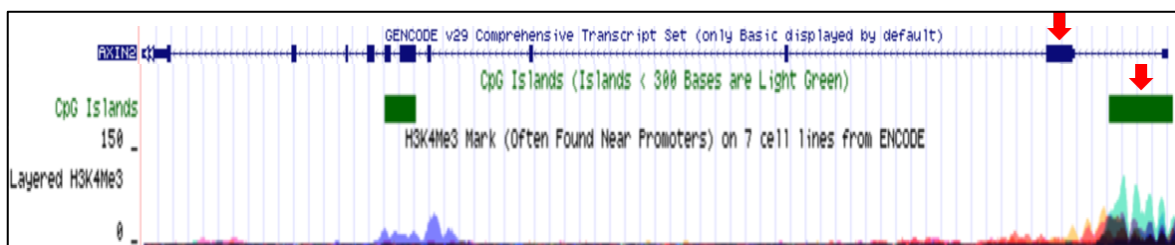


Fig. 12. A) Secuencia de bases que componen la isla CpG contenida en el promotor del gen *AXIN2* y B) La coincidencia de la isla con la marca de histona H3K4Me3 y su ubicación dentro de la secuencia del gen. En amarillo se resalta el producto de PCR amplificado y en negritas el oligo forward y la secuencia complementaria del reverse. Las flechas rojas señalan la isla CpG seleccionada y el primer exón del gen *AXIN2*.

## DKK1

Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para amplificar productos de PCR que permiten la determinación del patrón de metilación del gen *DKK1*.

	Oligos para DNA metilado	Oligos para DNA no metilado
<b>Forward</b>	5'-TGC GGT ATT GAT GAG TAT TGC-3'	5'-GAG TGT GGT ATT GAT GAG TAT TGT-3'
<b>Reverse</b>	5'-ACA ACA CAT AAC GTA ACG CAT ACA-3'	5'-AAC AAC ACA TAA CAT AAC ACA TAC AAC-3'

### Secuencia de isla CpG

5'-TTTATTAAAGTCGTCTGCTATAACGCTCGCTGGTAGCCTTCACCCCGAAGGTGAG  
 CCGGGCCAGCCGAGCGACTAAGCAAGGGAGGGGCGGGGTGAAGAGTGTCAAAGGCCCCCTT  
 TCATGTACACAAACACACCCCTCCAGCCCTCCAGCGCTTTGAAATCCCATCCCGGCTTT  
 GTTGTCTCCCTCCCAAGGGGCCGAATGCTCCGGGCCCGCGGTATAAAGGCAGCCGCGGTG  
 GCGGTGGCGGCGCAGAGCTCTGTGCTCCCTGCAGTCAGGACTCTGGGACCGCAGGGGGCTC  
 CCGGACCCTGACTCTGCAGCCGAACCGGCACGGTTTCGTGGGGACCCAGGCTTGCAAAGTGA  
 CGGTCATTTTCTTTTCTCCCTCTTGAGTCCTTCTGAGATGATGGCTCTGGGCGCAGCGG  
 GAGTACCCGGGTCTTTGTCGCGATGGTAGCGGCGGCTCTCGGCGGCCACCCTCTGCTGGG  
 AGTGAGCGCCACCTTGAACCTCGTTCTCAATTCCAACGCTATCAAGAACCTGCCCCACCCT  
 GGGCGCGCTCGGGGACCCAGGCTCTGCAGTCAGCGCCGCGCGGAATCCTGTACCC  
 GGGCGGAATAAGTACCAGACCATTGACAATTACCAGGTGAGAGGGGTGCGGCACTCAGAGG  
 ATGCTCTGACCTTGAAAGGGTCTATCTGGAGACGAGGGAGTAGAACGTGCTGAATGTGTGC  
 GGTTACAGGAGCATTGTTAACCCTGCATTTGGGAGCAGTGGGCAGTAACAGGTTTTGGAGA  
 GGTGGACAGATAAGGACTGTGATCAGCGCCCGGTCCAAGAGGGCGGGTACCTGGACGTCT  
 GGGTGCCTCACCTCTCCCGAACCTTCCACAGCCGTACCCGTGCGCAGAGGACGAGGA  
**GTGCGGCACTGATGAGTACTGCGCTAGTCCCACCCGCGGAGGGGACGCGAGCGTGC**  
**TGTCTCGCCTGCAGGAAGCGCCGAAAACGCTGCATGCGTACGCTATGTGCTGC**CCCGGGAA  
 TTAGTCAAATAAGTGGTGGTCTGAAAGCTCCCTTTCACACTAAACTGTCCAGCCTTTGAGCG  
 TCTATGAATTGGGCGGGGGCGGGGGGTTGGGGGGGGTGGGGGGGAGAAATCTCCGCCCTGA  
 GAACACTGCGGCGCCACCTGCAAATGGGTGTTAGCATGCAGGATTCCGCTGAAGTATCTTCA  
 TTGCAAGTG-3'

Tamaño del producto= 114 pb.

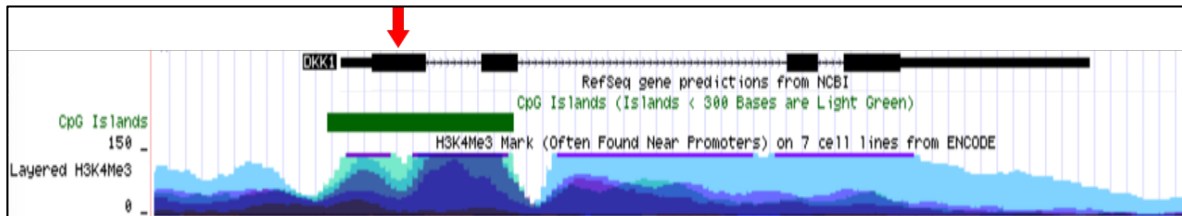


Fig. 13. A) Secuencia de bases que componen la isla CpG contenida en el promotor del gen *DKK1* y B) La coincidencia de la isla con la marca de histona H3K4Me3 y su ubicación dentro de la secuencia del gen. En amarillo se resalta el producto de PCR amplificado y en negritas el oligo forward y la secuencia complementaria del reverse. La flecha roja señala el primer exón del gen *DKK1*.

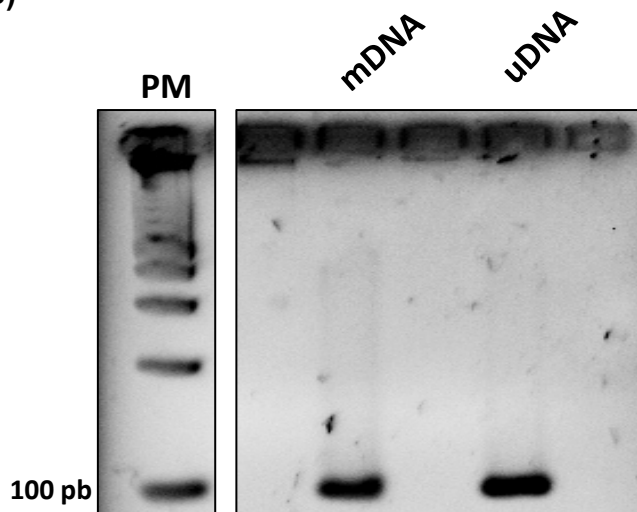
Mediante el uso de DNA comercial metilado y no metilado (EpiTect Control DNA and Control DNA set n° de cat. 59568, QIAGEN) se estandarizaron las siguientes condiciones de PCR las cuales se llevaron a cabo en un termociclador Maxygene II (LabNet):

## AXIN2

A)

REACTIVO	[FINAL]
Buffer 10X	1X
dNTPs (2 mM)	250 $\mu$ M
Oligo forward (10 $\mu$ M)	250 nM
Oligo reverse (10 $\mu$ M)	250 nM
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	2 mM
Agua libre de nucleasas	_____
Taq DNA polimerasa	1 U
DNA	10 ng

B)



C)

1 ciclo:	95°C	10 minutos
<b>40 ciclos:</b>	95°C	30 segundos
	<b>62°C</b>	30 segundos
	72°C	30 segundos
1 ciclo:	72°C	5 minutos

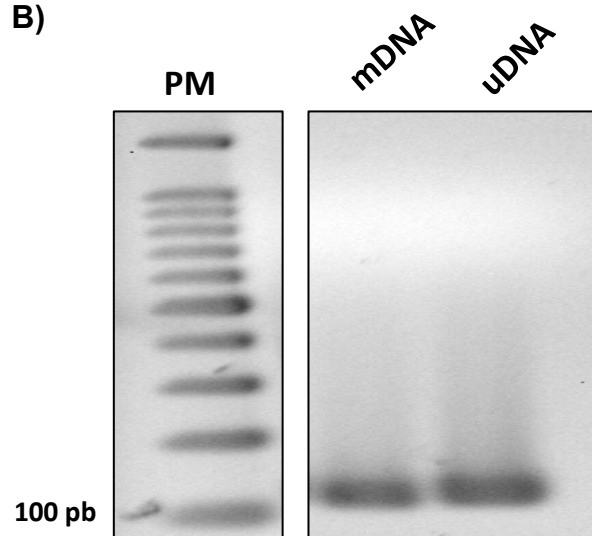
Figura 14. A) Concentraciones de reactivos para la PCR estandarizadas en un volumen final de 10  $\mu$ L B) Productos de PCR de un fragmento de la isla CpG contenida en el promotor del gen *AXIN2* amplificadas utilizando como controles DNA metilado y DNA no metilado con sus respectivos pares de oligos y C) Condiciones de T y número de ciclos bajo las cuales se llevaron a cabo las reacciones de PCR. PM = marcador de peso molecular. mDNA = DNA metilado, uDNA = DNA no metilado.

## DKK1

A)

REACTIVO	[FINAL]
Buffer 10X	1X
dNTPs (2mM)	250 $\mu$ M
Oligo forward (10 $\mu$ M)	400 nM
Oligo reverse (10 $\mu$ M)	400 nM
MgCl <sub>2</sub> (50 Mm)	2 mM
Agua libre de nucleasas	_____
Taq DNA polimerasa	1 U
DNA	20 ng

B)



C)

1 ciclo:	94°C	10 minutos
<b>40 ciclos:</b>	94°C	30 segundos
	<b>57°C</b>	30 segundos
	72°C	60 segundos
1 ciclo:	72°C	5 minutos

Figura 15. A) Concentraciones de reactivos para la PCR estandarizadas en un volumen final de 10  $\mu$ L B) Productos de PCR de un fragmento de la isla CpG contenida en el promotor del gen *DKK1* amplificados utilizando como controles DNA metilado y DNA no metilado con sus respectivos pares de oligos y C) Condiciones de T y número de ciclos bajo las cuales se llevaron a cabo las reacciones de PCR. PM = marcador de peso molecular. mDNA = DNA metilado, uDNA = DNA no metilado.

### -Electroforesis en gel de agarosa

Para identificar los productos de PCR, se prepararon geles de agarosa al 2.5% y se utilizó una cámara de electroforesis Sub-Cell GT Mini (BIO-RAD) la cual se llenó con buffer TAE 1X. Los geles se corrieron a 100 V durante 40 minutos con una fuente de poder Power Pac 200 (BIO-RAD). Cada gel fue teñido con 100 mL de bromuro de etidio (BIO\_RAD, n° de cat. 161-0433), para visualizar las bandas se

utilizó un transiluminador de rayos UV (UVP) y se tomó foto con una cámara logic 200 Imaging System (KODAK) y el software Molecular Imaging Software KODAK.

### **-Inmunofluorescencia**

Se ocuparon placas de 6 pozos a las cuales se les introdujo un cubreobjetos en cada pozo previamente lavado e irradiado con luz UV y se sembraron 100 000 células en cada uno. Las células se mantuvieron en cultivo hasta una confluencia del 60-70% con cambio de medio cada segundo día en caso de ser necesario. Una vez que alcanzaron la confluencia adecuada, se realizó el siguiente protocolo:

-Las células se lavaron con PBS con agitación por 5 minutos y se fijaron con paraformaldehído al 1% durante 10 minutos a temperatura ambiente.

-Se hicieron 3 lavados con PBS durante 5 minutos con agitación.

-Para la permeabilizar las células, se utilizó tritón al 0.1% y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos.

-Se hicieron 3 lavados con PBS y uno último con TBS durante 5 minutos con agitación.

-Para bloquear la señal inespecífica, se incubaron las células con BSA al 10% durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación

-Se adicionaron 100 µL del anticuerpo primario y se colocó parafilm encima de las laminillas con el fin de evitar que éstas se secan y permitir que las células y el anticuerpo estuvieran en contacto, se incubó a 4°C durante toda la noche dentro de una cámara semihúmeda.

-Se hicieron 3 lavados con PBS-Tritón al 0.25% durante 5 minutos con agitación.

-Se adicionaron 100 µL del anticuerpo secundario y se incubó por una hora aislado de la luz a temperatura ambiente y se cubrió con parafilm.

-Se hicieron 3 lavados con PBS-Tritón al 0.25% durante 5 minutos con agitación.

-Se limpiaron portaobjetos con etanol al 70% y para el montaje se agregaron 10 µL de Vectashield con DAPI H-1200 (Vector Laboratories) por cada cubreobjetos, se retiró el exceso de medio de montaje y se sellaron las laminillas con barniz de uñas.

Las muestras se almacenaron a 4°C protegidas de la luz hasta su observación al microscopio.

Se utilizó el microscopio invertido Olympus IX71 para la observación de las laminillas así como para la toma de fotografías. Para realizar la sobreposición (merge), se empleó el programa ImageJ.

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- Anti-DKK1 antibody [EPR4759] ab109416 (Abcam).
- $\beta$  catenin (E-5): sc7963 (Santa Cruz Biotechnology).
- Anti-Axin 2 antibody (ab32197) (Abcam).
- Donkey anti-Mouse IgG (H+L) highly cross-adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 488 A-21202 (Thermofisher).
- Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 546 (Thermofisher).

### **-Extracción de proteínas totales**

Las células se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar una confluencia del 70-80%.

Una vez que se alcanzó la confluencia necesaria, las células de las líneas MDA-MB231 y HCC1937 se lavaron con PBS y se les adicionó tripsina al 0.05% para posteriormente centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos, por último se desechó por completo el sobrenadante tratando de no alterar el pellet.

En el caso de la línea celular DU4475, como las células crecen en suspensión, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó directamente.

Posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L de buffer RIPA con inhibidores de proteasas al 1X con el cual se resuspendieron las células y se homogenizaron completamente utilizando un rotor con pistilo Pellet Pestle Cordless Motor 749540-000 (Kimble Chase).

Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 4°C y se centrifugó a 12 000 rpm durante 30 minutos.

Los sobrenadantes (fracción donde se encuentran las proteínas) se recuperaron y se almacenaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL los cuales se guardaron en congelamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **-Extracción de proteínas citoplásmicas y nucleares**

La extracción se realizó utilizando el protocolo modificado de Basaki *et al*, 2007:

Las células se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar una confluencia del 70-80%.

Una vez que se alcanzó la confluencia adecuada, las células de las líneas MDA-MB231 y HCC1937 se lavaron con PBS y se les adicionó tripsina al 0.05%, se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos y posteriormente se desechó por completo el sobrenadante tratando de no alterar el pellet.

En el caso de la línea celular DU4475, como las células crecen en suspensión, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó directamente.

Los pellets se homogenizaron en tres volúmenes de Buffer A (Hepes 10mM pH 7.9, KCl 10 mM, DTT 1mM, IGEPAL 0.4% v/v,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, PMSF 1mM y aprotinina y leupeptina 10 mg/mL).

Las muestras se incubaron en hielo durante 10 minutos y posteriormente se centrifugaron a 4000 g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Se retiraron los sobrenadantes (el cual contiene la fracción citoplásmica) y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Por otro lado, los pellets se lavaron con 500  $\mu\text{L}$  de Buffer A y se centrifugaron nuevamente a 4000 g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Se desecharon los sobrenadantes y los pellets se homogenizaron con un volumen de Buffer C (Hepes 20 mM pH 7.9, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 5% v/v, DTT 1 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM, PMSF 1mM y aprotinina y leupeptina 10 mg/mL).

Las muestras se incubaron en hielo por dos horas y se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Se recuperaron los sobrenadantes (el cual contiene la fracción nuclear) y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



## **-Cuantificación de proteínas**

Se llevó a cabo mediante el método del ácido bicinconínico (BSA) y para ello se utilizó el kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

-Se realizaron diluciones 1:20 del stock de proteínas con agua inyectable (PiSA) y se colocaron 10  $\mu$ L por duplicado en una placa de 96 pozos.

-Posteriormente, se mezclaron los reactivos A y B del kit en una proporción 1:50 respectivamente y se adicionaron 200  $\mu$ L en cada pozo.

-Se elaboró una curva patrón con concentraciones conocidas de BSA (0, 0.5, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 y 1 mg/mL) y se adicionaron 10  $\mu$ L de cada concentración por duplicado en la placa de 96 pozos.

-La placa se incubó durante 30 minutos a 37°C.

-Mediante un lector de ELISA Multimode Detector DTX 880 (Beckman Coulter) se cuantificó por espectrofotometría a 570 nm la absorbancia dada por valores de densidad óptica de cada muestra colocada en la placa.

-Mediante el uso del programa Excel se realizaron los cálculos correspondientes para determinar la cantidad de proteína en  $\mu$ g que se obtuvo en cada muestra extraída.

## -Western blot

Los geles de poliacrilamida (de corrida y concentrador) se elaboraron de la siguiente manera:

**Tabla 6. Reactivos y volúmenes utilizados para elaborar un gel de poliacrilamida al 5%, 8% y 10% para Western blot.**

Reactivos	Gel de corrida (5 mL)		Gel concentrador (2mL)
	8%	10%	5%
Agua destilada	2.3 mL	1.9 mL	1.4 mL
Acrilamida al 30%	1.3 mL	1.7 mL	0.33 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3 mL	1.3 mL	
1.0 M Tris (pH 6.8)			0.25 mL
SDA 10%	0.05 $\mu$ L	0.05 $\mu$ L	0.02 $\mu$ L
Persulfato de amonio 10%	0.05 $\mu$ L	0.05 $\mu$ L	0.02 $\mu$ L
TEMED	0.003 $\mu$ L	0.002 $\mu$ L	0.002 $\mu$ L

Para llevar a cabo la electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) las muestras de proteínas se prepararon adicionando el buffer de carga 5X necesario para una concentración mínima de 1X al volumen requerido de acuerdo con los cálculos realizados para cargar 40  $\mu$ g, posteriormente las muestras junto con 3  $\mu$ L de marcador biotinilado se calentaron a 94°C durante 15 minutos.

La electroforesis se llevó a cabo en una cámara Mini-PROTEAN II Cell (BIO-RAD) la cual se llenó con buffer de corrida Laemmli 1X e inicialmente se corrió a 85 V con una fuente de poder PowerPac Basic (BIO-RAD), aumentado a 100 V una vez que las muestras llegaron al gel separador.

Para transferir las proteínas que corrieron a lo largo del gel de poliacrilamida a una membrana sólida, se utilizaron membranas de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m (BIO-RAD) y la transferencia se llevó a cabo en una cámara Mini Trans-Blot Cell (BIO-RAD) la cual se llenó con buffer de transferencia. La corrida se realizó en frío a 200 milia durante 60 minutos.

Posteriormente, las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau para corroborar que la transferencia se realizó correctamente y después se lavaron con agua destilada y TBS-Tween para retirar el colorante.

Para bloquear las células, se usó una solución de TBS-Tween con leche Blotto sc-2325 (Santa Cruz Biotechnology) al 5% y se incubaron las membranas con esta solución en agitador TS-8 a temperatura ambiente durante 60 minutos.

El anticuerpo primario se preparó en solución de TBS-Tween con leche Blotto al 5% y se dejó incubando en un shaker TS-8 durante toda la noche a 4°C.

Se realizaron 3 lavados con TBS-Tween con agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

El anticuerpo secundario se preparó en solución TBS-Tween con leche Blotto al 5% y se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 90 minutos.

Se realizaron 3 lavados con TBS-Tween y uno con TBS con agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Se utilizó el método de detección por quimioluminiscencia con el kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent y se revelaron las membranas en placas fotográficas Kodak BioMax light film.

Para la digitalización de los resultados, se utilizó el transiluminador de rayos UV (UVP) y se fotografiaron con una cámara logic 200 Imaging System (KODAK) y el software Molecular Imaging Software KODAK.

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes:

- Anti-DKK1 antibody [EPR4759] ab109416 (Abcam).
- $\beta$  catenin (E-5): sc7963 (Santa Cruz Biotechnology).
- Conductin (C-6): sc-25302 (Santa Cruz Biotechnology).
- EGFR (A-10): sc-373746 (Santa Cruz Biotechnology).
- $\beta$  Tubulin: T4026 (Sigma-Aldrich)
- Antinuclear Matrix Protein p84 antibody [EPR5662(2)] (ab131268).

Las condiciones específicas de cada una de las proteínas son la siguientes:

**Tabla 7. Condiciones de % de gel de poliacrilamida, tiempo de corrida, solución para el bloqueo y preparación de los anticuerpos y diluciones utilizadas para la óptima detección de las proteínas mediante Western blot.**

	<b>AXIN2</b>	<b>β-catenina</b>	<b>DKK1</b>	<b>B-tubulina</b>	<b>P84</b>
<b>% Gel de poliacrilamida</b>	10%	8%	10%	10%	8%
<b>Tiempo de electroforesis</b>	1 hora 45 minutos	1 hora 45 minutos	1 hora 30 minutos	1 hora 45 minutos	1 hora 45 minutos
<b>Solución de bloqueo</b>	BSA al 5%.	Leche Blotto al 5%	Leche Blotto al 5%	Leche Blotto al 5%	Leche Blotto al 5%
<b>Dilución Ab 1°</b>	1:2000	1:500	1:2000	1:2000	1:3000
<b>Dilución Ab 2°</b>	1:3000	1:3000	1:3000	1:3000	1:3000

#### **Buffer de corrida**

Glicina	14.4 g
Tris	3.03 g
SDS	1 g
Agua miliQ	1000 mL

#### **Buffer de transferencia**

Glicina	14.4 g
Tris	3.03 g
Metanol	200 mL
Agua miliQ	800 mL

## **-Tratamiento con la proteína recombinante Wnt1**

Se aplicó a las células un tratamiento con la proteína recombinante Wnt1 (ThermoFisher Scientific, nº de cat. PHC1804) con el objetivo de inducir la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.

Las condiciones fueron las siguientes:

-Adición de 100 ng/mL de medio de cultivo de la proteína recombinante Wnt1 durante 6 horas.

-El grupo control fueron células las cuales sólo se trataron con BSA al 0.1% debido a que la proteína Wnt1 se resuspendió en esta solución.

## **-Análisis estadístico**

Se utilizó el programa ImageJ para hacer el análisis densitométrico de los resultados de Western blot y obtener resultados cuantitativos. El mismo programa se utilizó en el caso de las inmunofluorescencias para hacer el solapamiento de la señal de la proteína con el DAPI así como para colocar la barra de escala.

Con el uso del programa GraphpadPrism se aplicaron pruebas estadísticas de ANOVA, prueba de T-student y regresión lineal para el análisis de datos y poder establecer diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). En las gráficas se representa la desviación estándar.

## Resultados

En la tabla 8 se describen las características de la Isla CpG contenida en la región promotora de los genes *AXIN2* y *DKK1*, calculadas a partir de la longitud de la isla reportada en Genome Browser.

**Tabla 8. Características de las islas CpG localizadas dentro del promotor de los genes *AXIN2* y *DKK1*.**

Gen	<i>AXIN2</i>	<i>DKK1</i>
Longitud	978 pb	1238 pb
% de C y G	65	61
Proporción CpG	0.6287	0.7035917

De acuerdo con la proporción CpG, las dos islas se clasifican como dentro del grupo ICP (Islas CpG con contenido intermedio de dinucleótidos citosina-guanina). Por lo tanto, se hizo un análisis de regresión lineal para determinar la relación de la metilación en la región promotora con la cantidad de mRNA de los genes utilizando datos reportados para líneas celulares de cáncer, inicialmente con todas las líneas malignas disponibles y posteriormente sólo con líneas de cáncer de mama, obtenidos en la base The Cancer Cell Line Encyclopedia (disponible vía electrónica).

Como se observa en la Fig. 16, al analizar los datos de todas las líneas celulares malignas se encontró una relación inversamente proporcional entre el nivel de metilación del DNA y el nivel de transcrito de mRNA para ambos genes: *AXIN2*  $r = 0.3487$ ,  $r^2 = 0.1216$  y  $p < 0.0001$ ; *DKK1*  $r = 0.5560$ ,  $r^2 = 0.3092$  y  $p < 0.0001$ , teniendo una  $N = 574$  y  $514$  respectivamente.

Seleccionando únicamente líneas celulares de cáncer de mama, para el gen *AXIN2* se trabajó con una  $n = 41$  y para el gen *DKK1*, con una  $n = 50$  y como se observa en la Fig. 16 se conservó la relación inversamente proporcional mostrada anteriormente encontrada en el análisis de los datos de todas las líneas celulares malignas entre el nivel de metilación del DNA y el nivel de transcrito de mRNA: *AXIN2*  $r = -0.4868$ ,  $r^2 = 0.2369$  y  $p = 0.0012$ ; *DKK1*  $r = -0.4687$ ,  $r^2 = 0.2196$  y  $p = 0.0006$ . Por lo tanto, en el caso de los genes de interés en nuestro estudio, los resultados sugieren

que la metilación presente en las islas CpG de las regiones promotoras sí se asocia con una disminución en la transcripción de su mRNA.

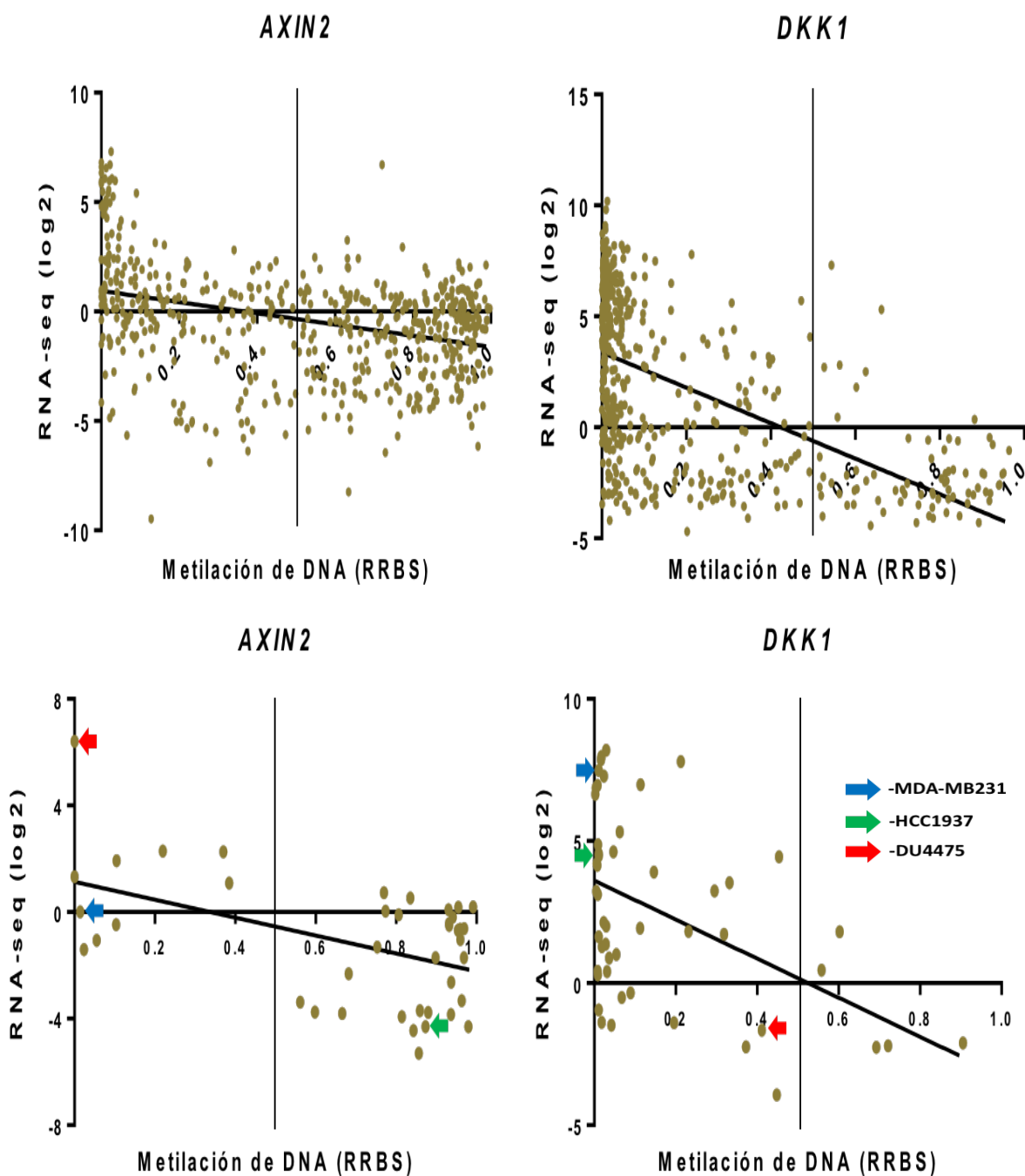


Figura 16. Relación de la metilación del DNA de la región promotora de los genes *AXIN2* y *DKK1* con el nivel de transcrito de mRNA en líneas celulares de cáncer (arriba) y en líneas celulares de cáncer de mama (abajo).

**Tabla 9. Datos cuantitativos de metilación de DNA (RRBS) y expresión de RNA (RNA-seq) reportados en The Cancer Cell Line Encyclopedia para las líneas celulares MDA-MB231, HCC1937 y DU4475.**

	MDA-MB231		HCC1937		DU4475	
	Metilación del DNA	Expresión de RNA	Metilación del DNA	Expresión de RNA	Metilación del DNA	Expresión de RNA
<b>AXIN2</b>	<b>0.01441275</b>	<b>0.00465476</b>	<b>0.873306</b>	<b>-4.29933</b>	0	6.411194
<b>DKK1</b>	<b>0.0106836</b>	<b>7.480558</b>	0.0106490	4.466509	<b>0.411325</b>	<b>-1.6530115</b>

Posteriormente, se seleccionaron las líneas celulares MDA-MB231 (no metilada), HCC1937 (*AXIN2* metilado) y DU4475 (*DKK1* metilado) las cuales cumplieron con los criterios de selección establecidos. Utilizando los mismos datos de la base The Cancer Cell Line Encyclopedia, en la tabla 9 se muestran los valores de la metilación del DNA y de RNA-seq para las líneas celulares con las que se trabajó.

En la Fig. 17 se muestra de manera gráfica los valores de metilación de DNA y de RNA-seq donde se puede observar que el gen *AXIN2* se encuentra metilado en la línea celular HCC1937 y su nivel de transcrito es menor comparado con el reportado para las líneas MDA-MB231 y DU4475. En el caso del gen *DKK1* se observa la misma tendencia donde la línea celular metilada es la DU4475 teniendo un nivel de transcrito mucho menor comparado con el reportado en las líneas celulares no metiladas (HCC1937 y MDA-MB231).

Se buscó también el nivel de metilación de DNA y nivel de mRNA de *β-catenina* reportado en las líneas celulares utilizadas. Se encontró que no hay metilación y en cuanto a su mRNA, los niveles varían entre líneas celulares teniendo una mayor expresión en la línea DU4475 y la menor expresión se observa en la línea HCC1937.

En la Fig. 18 se representan los datos por línea celular, las células MDA-MB231 no se encuentran metiladas en los genes *AXIN2* y *DKK1* y tienen expresión de mRNA, no obstante, los niveles de transcrito sí varían de una manera considerable. Al comparar las líneas HCC1937 y DU4475 (metiladas en los genes mencionados)



encontramos que el mRNA del gen metilado es mucho menor comparado al mRNA que se transcribe en células que no presentan metilación en su promotor.

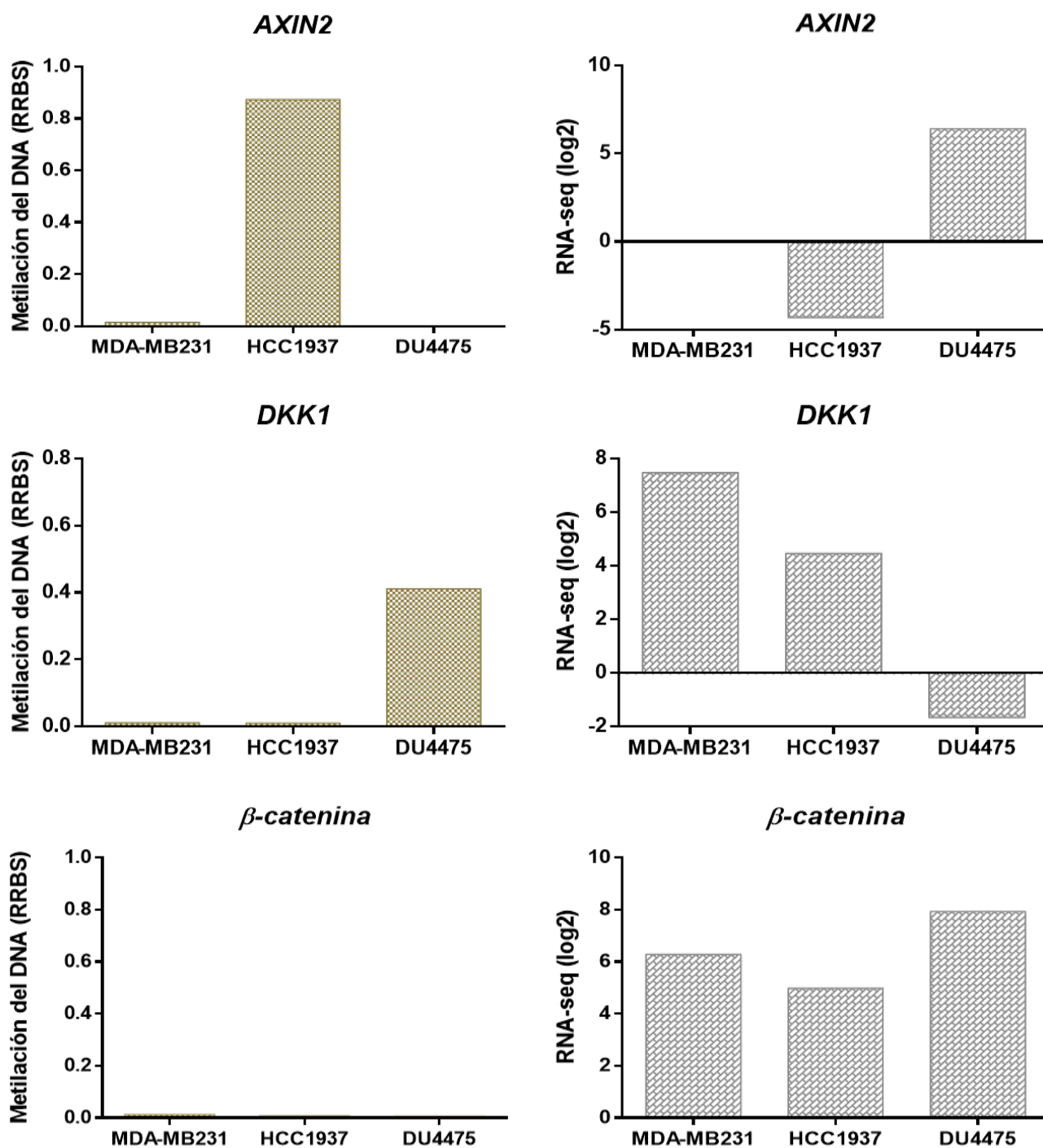


Fig. 17. Metilación de DNA y expresión de RNA de los genes *AXIN2*, *DKK1* y  *$\beta$ -catenina* en las líneas celulares MDA-MB231, HCC1937 y DU4475. Comparación de los datos respecto a los genes.

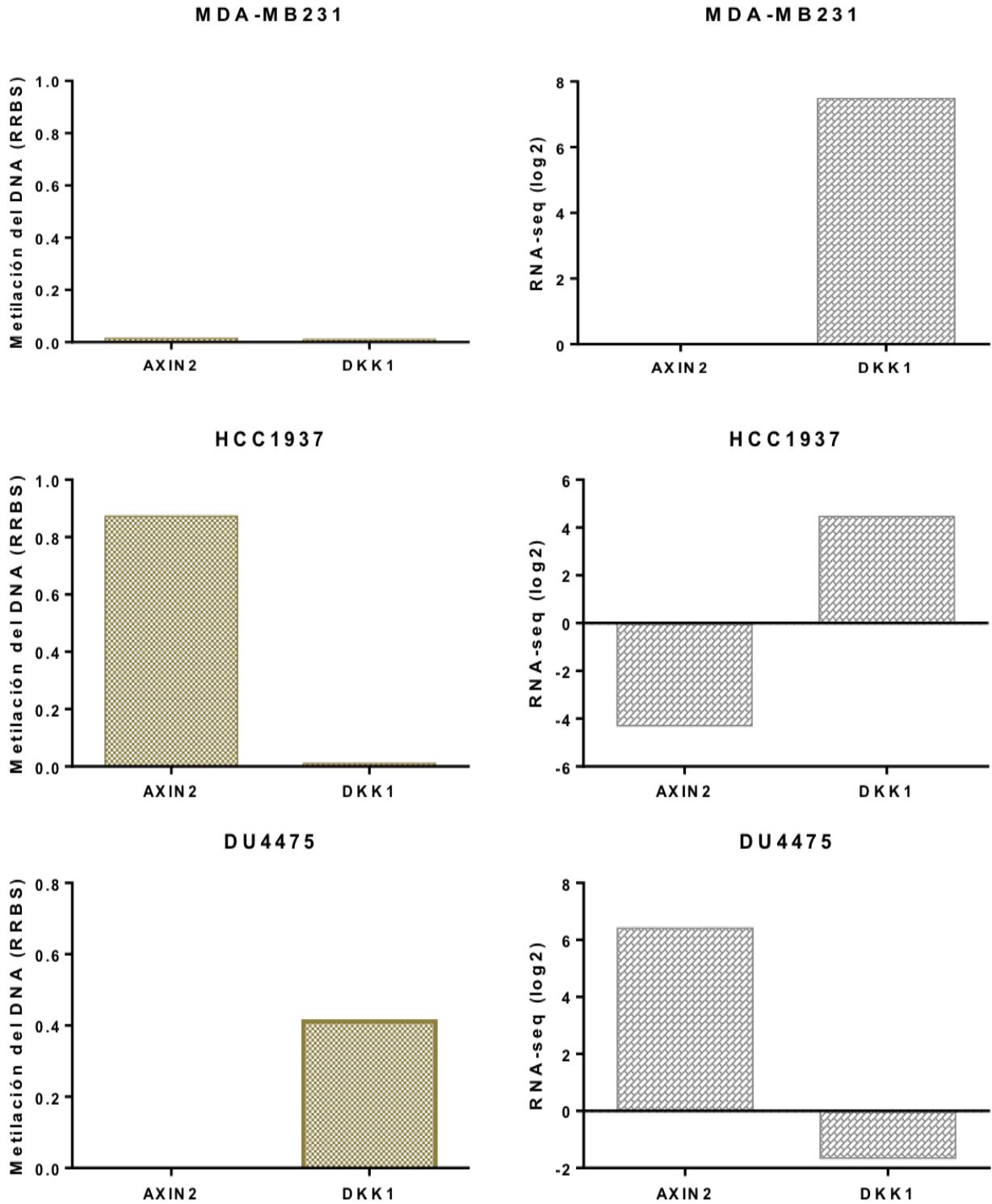


Fig. 18. Metilación de DNA y expresión de RNA de los genes *AXIN2*, *DKK1* y  $\beta$ -catenina en las líneas celulares MDA-MB231, HCC1937 y DU4475. Comparación de los datos respecto a líneas celulares.

Posteriormente, mediante la técnica de PCR sensible a metilación (MSP) se determinaron los patrones de metilación para las células empleadas en este trabajo. Como se muestra en la Fig. 19, se encontró que en efecto la línea MDAMB231 no presentó metilación en ninguno de los dos genes estudiados, en el caso de la línea celular HCC1937 se observó que se encuentra metilada en el gen *AXIN2*, no obstante, el gen *DKK1* también estuvo parcialmente metilado, mismo patrón que se repite para la línea celular DU4475 en el caso del gen *DKK1*, pero en el gen *AXIN2* no se encontró metilación en su promotor. Por último, se utilizó la línea MCF10A como control de células de mama no neoplásicas con el fin de tener un antecedente sobre el estado de metilación de estos genes en tejido mamario no maligno y se encontró que *DKK1* no se encuentra metilado, pero *AXIN2* si lo está.

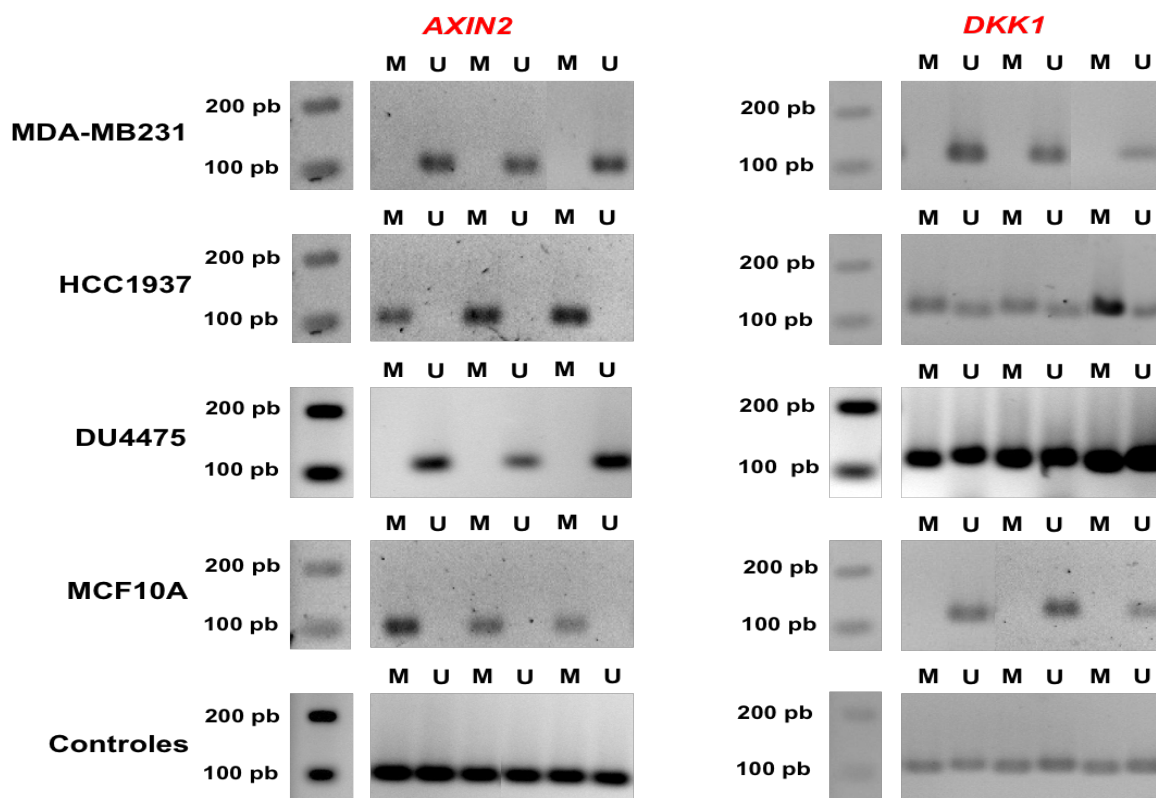


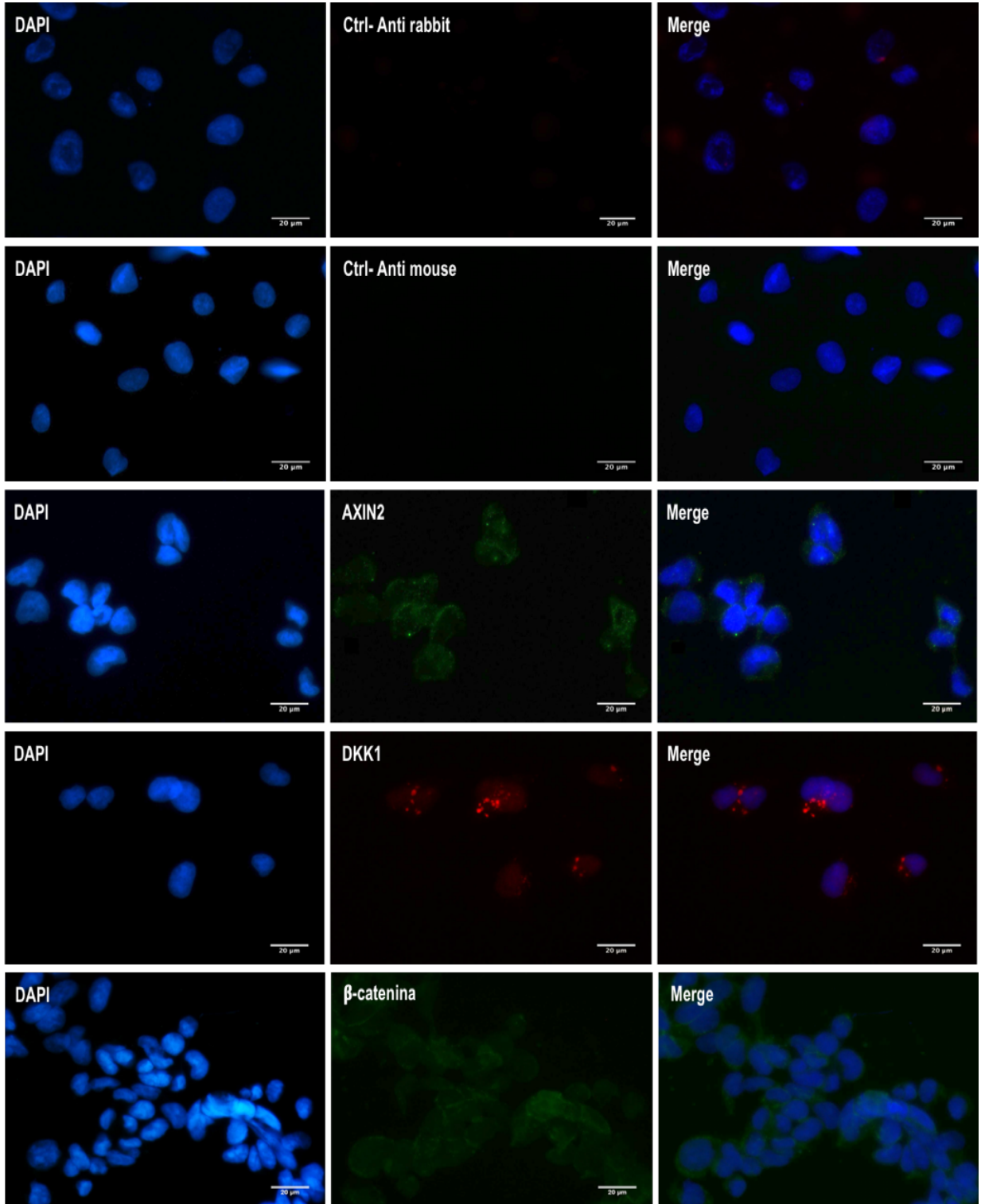
Fig. 19. Patrones de metilación de los genes *AXIN2* y *DKK1* en las líneas celulares MDA-MB231, HCC1937, DU4475 y MCF10A con los respectivos controles utilizando DNA comercial metilado y DNA comercial no metilado mediante PCR sensible a metilación (MSP). Cada banda corresponde a una muestra independiente. M= metilado, U= no metilado. *AXIN2*: MDA-MB231-U, HCC1937-M, DU4475-U y MCF10A-M. *DKK1*: MDA-MB231-U, HCC1937-M y U, DU4475-M y U y MCF10A-U.

Una vez que se determinó el patrón de metilación en las líneas celulares utilizadas, se realizaron inmunofluorescencias con las líneas MDAMB231 y HCC1937 para corroborar la presencia de proteína de los genes estudiados (*AXIN2* y *DKK1*) ya que los análisis mencionados anteriormente se realizaron con datos de su mRNA.

Con base en los resultados obtenidos para la línea celular MDAMB231 (Fig. 20), se observó la presencia de ambas proteínas (*AXIN2* y *DKK1*) lo cual va acorde con el hecho de que en esta línea los respectivos genes no están metilados. También se encontró que *AXIN2* se distribuye en citoplasma mientras que *DKK1* se encuentra tanto en citoplasma (en su mayoría) como en núcleo, además de que en ciertas zonas del citoplasma se concentra más, lo que sugiere su presencia en vesículas.

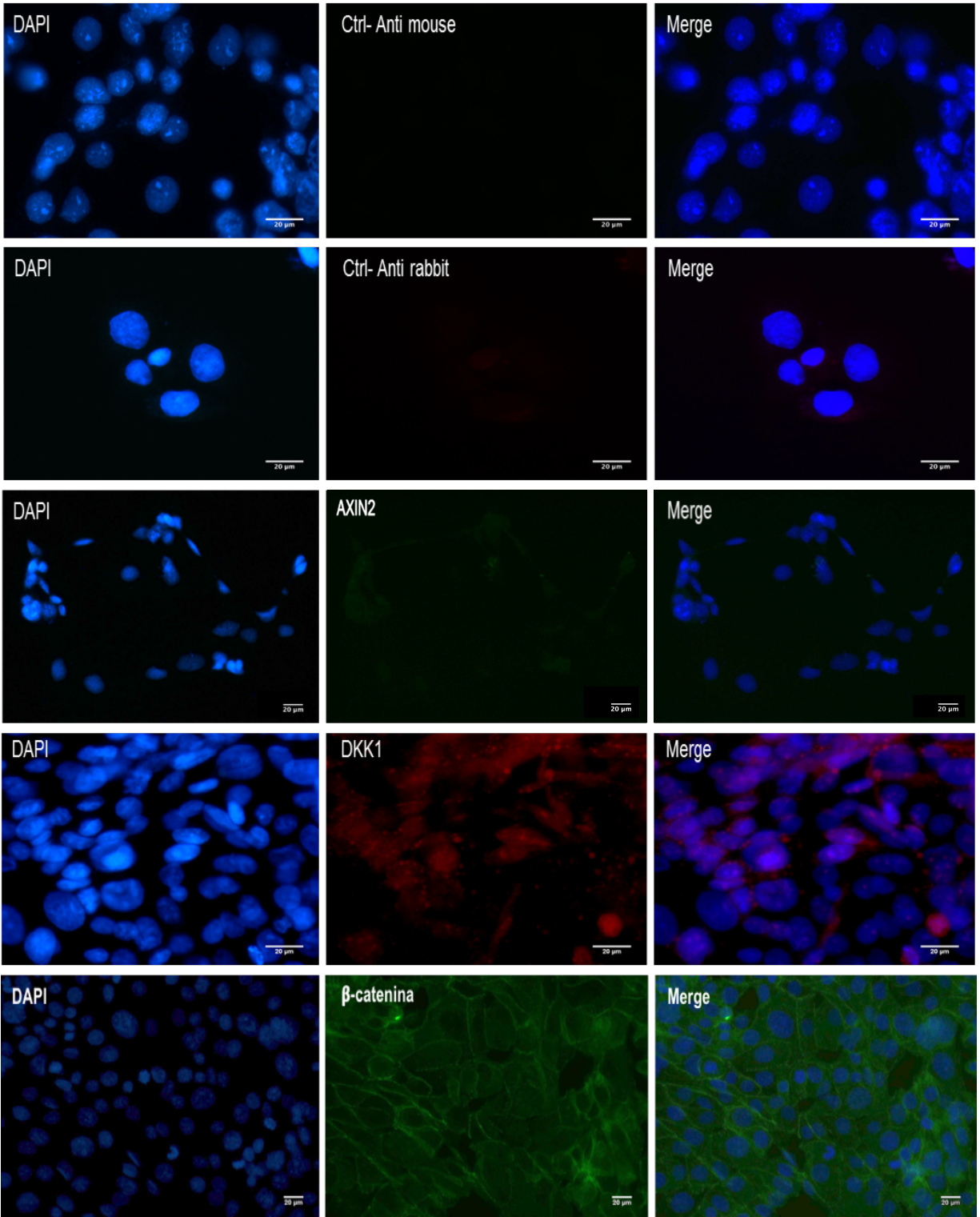
En las inmunofluorescencias realizadas con la línea HCC1937 (Fig. 21) se encontró la presencia de *DKK1*, no obstante, se observa que su distribución es irregular ya que no se está expresando en todas las células, además de que hay mayor presencia en el núcleo en comparación con la distribución observada en la línea celular MDAMB231 así como menor señal de zonas que sugieren una distribución vesicular. En *AXIN2* se encontró una presencia prácticamente nula de la proteína, lo cual sugiere que en efecto la metilación encontrada en su promotor, correlaciona con el decremento observado.

En el caso de  $\beta$ -catenina (Figs. 20 y 21), se observó la presencia de su proteína en ambas líneas celulares (MDAMB231 y HCC1937), no obstante, cabe resaltar que la distribución difiere entre ambos tipos celulares ya que mientras en células de la línea MDAMB231 se observa tanto en citoplasma como en membrana, en el caso de la línea celular HCC1937 su distribución se encuentra principalmente en membrana.



**Fig. 20.** Abundancia y localización de las proteínas AXIN2, DKK1 y β-catenina a nivel basal en la línea celular MDA-MB231 determinadas mediante inmunofluorescencias.





**Fig. 21. Abundancia y localización de las proteínas AXIN2, DKK1 y β-catenina a nivel basal en la línea celular HCC1937 determinadas mediante inmunofluorescencias.**

Una vez llevadas a cabo las inmunofluorescencias, mediante Western blot se determinó la cantidad de proteína total sintetizada de AXIN2, DKK1 y  $\beta$ -catenina a nivel basal en las líneas celulares MDAMB231, HCC1937, DU4475 y MCF10A, resultados que se presentan en la Fig. 22.

Contrario a lo que se esperaba, AXIN2 se encontró en las 4 líneas celulares, resultado que se discutirá más adelante y donde se resalta el hecho de que se sintetice ésta proteína en las células HCC1937 a pesar de haber encontrado metilación en la región promotor de su gen. Además, la cantidad de proteína difiere significativamente entre las líneas celulares MDAMB231 y HCC1937 con las células DU4475 y MCF10A siendo aproximadamente 3 veces mayor en las dos primeras líneas celulares mencionadas. En las células de la línea MCF10A también se encontró metilación en el promotor del gen *AXIN2*, pero como se mencionó en la idea anterior, su expresión es mucho menor y estadísticamente significativa en comparación de la línea celular HCC1937 donde también se encontró metilación en el promotor de *AXIN2*, lo que sugiere que en la línea MCF10A la metilación si tiene efecto sobre la expresión del gen.

En el caso de la proteína DKK1, se observa que hay expresión diferencial significativa entre las 4 líneas celulares analizadas, siendo la línea celular MDAMB231 donde se encuentra mayormente expresada, seguida de las líneas HCC1937, MCF10A y DU4475. En el caso de esta última línea celular, no se encontró la proteína, lo cual concuerda con el hecho de que se encontró metilación en el promotor del gen *DKK1*, a diferencia de lo encontrado para AXIN2 en la línea celular HCC1937.

Por último,  $\beta$ -catenina se expresa en las 4 líneas celulares, siendo la línea MCF10A la que presentó la mayor expresión de esta proteína resultando ser diferencialmente significativa respecto a la expresión encontrada en células de las líneas MDAMB231 y DU4475.

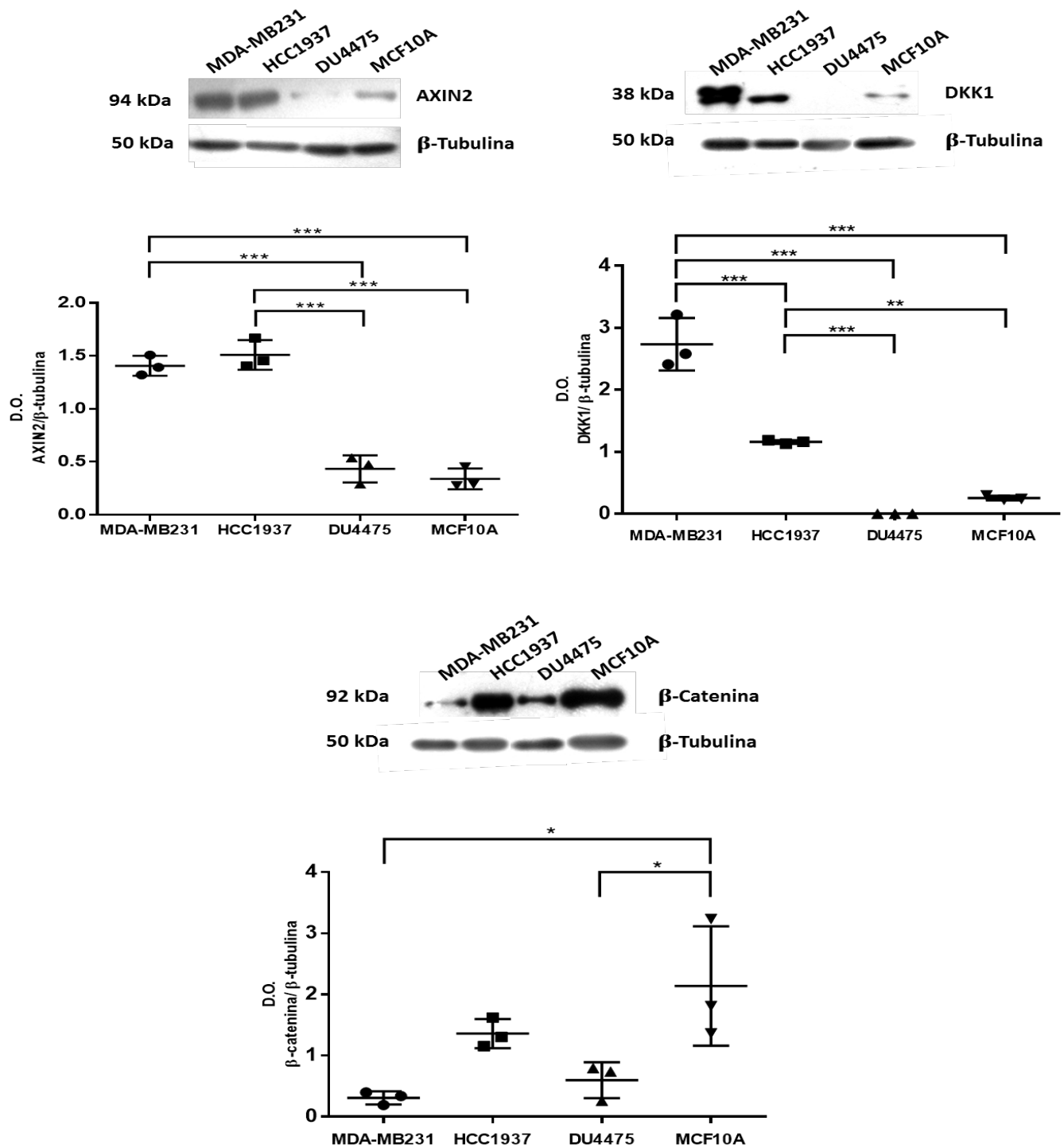


Fig. 22. Abundancia de las proteínas AXIN2, DKK1 y β-catenina total a nivel basal en las líneas celulares MDA-MB231, HCC1937, DU4475 y MCF10A determinadas mediante Western blot. Prueba de ANOVA ( $p < 0.05$ ).



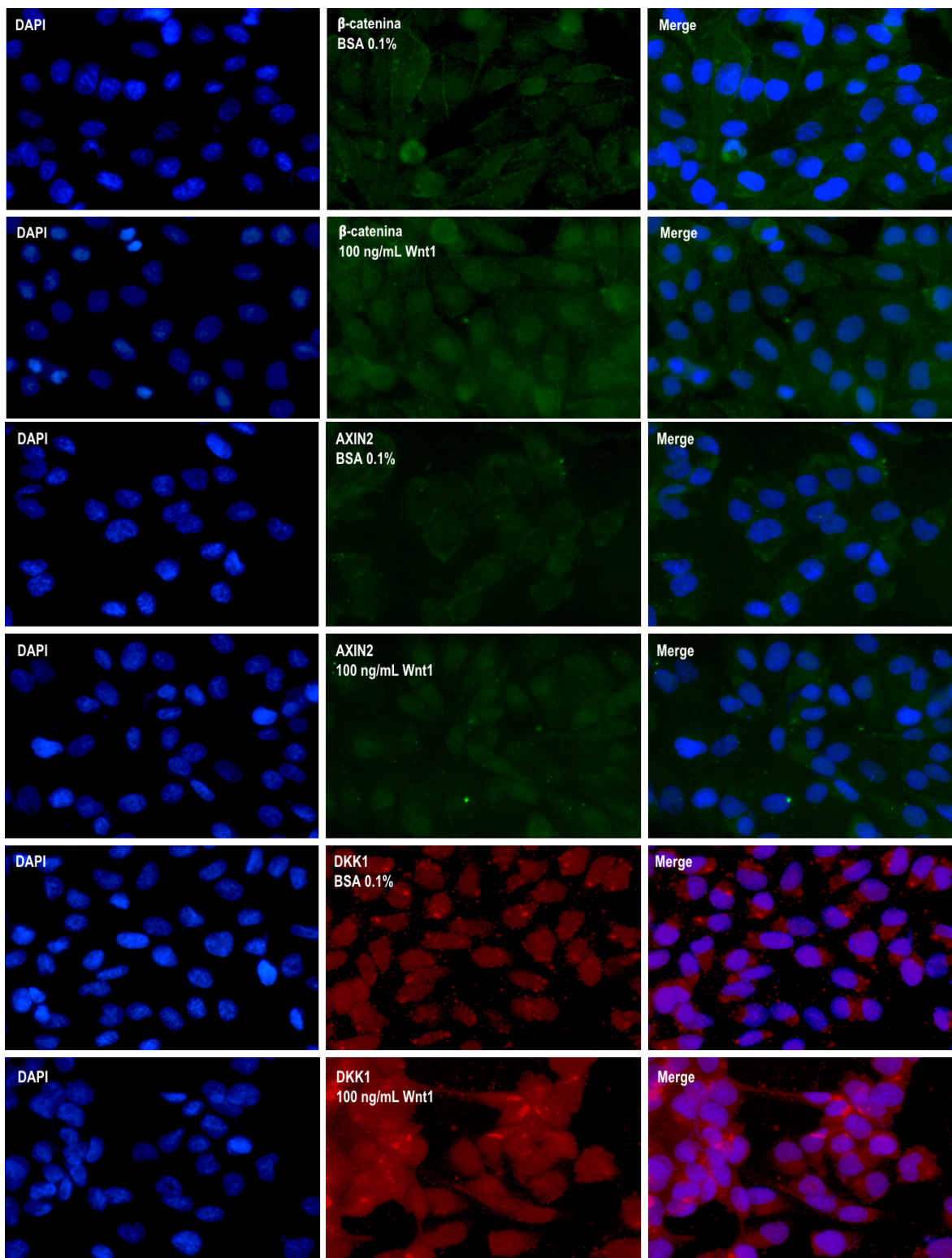
Posteriormente, con el fin de establecer un modelo *in vitro* que represente la potencial aportación de ligandos Wnt que provengan de una fuente distinta de las células malignas como potencialmente puede ocurrir en un modelo *in vivo* debido a la interacción del tumor con el microambiente, se aplicó un tratamiento con la proteína recombinante Wnt1 para poder analizar los efectos de la inducción de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina a un nivel más allá del basal en las líneas celulares utilizadas anteriormente (MDA-MB231 y HCC1937).

Así como en los análisis anteriores, se llevaron a cabo inmunofluorescencias y extracción de proteínas totales, citoplásmicas y nucleares para llevar a cabo ensayos de Western blot. Se optó por descartar la línea celular DU4475 ya que si bien no se encontró expresión de DKK1, la metilación parcial en su promotor nos hace pensar que existe otro tipo de alteración en este gen que contribuye con la ausencia total de su proteína.

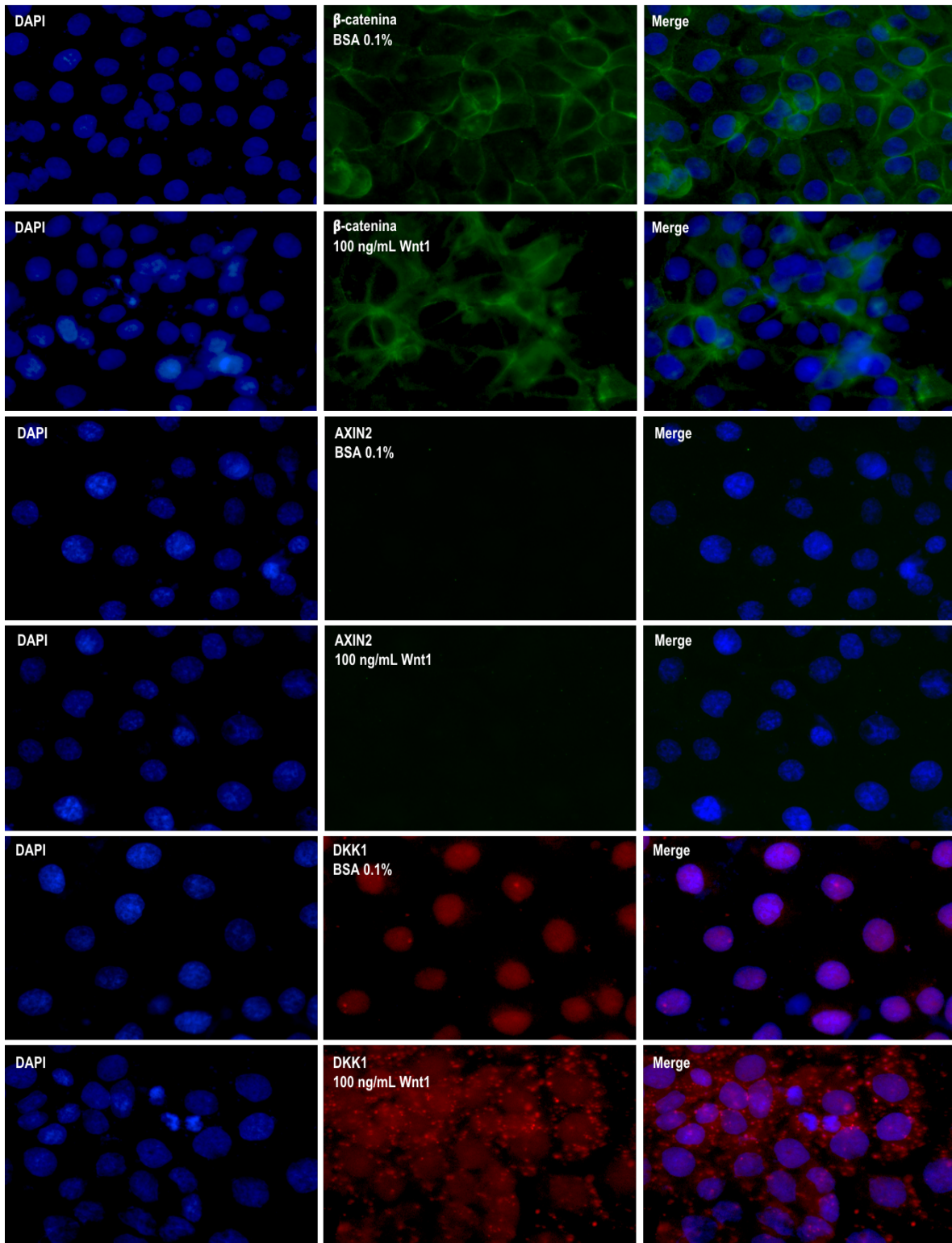
Los resultados encontrados por ensayos de inmunofluorescencia para las líneas celulares MDA-MB231 y HCC1937 se muestran en las Figs. 23 y 24. En el caso de la línea celular MDA-MB231 se observa la translocación de  $\beta$ -catenina hacia el núcleo bajo las condiciones del tratamiento respecto al control, dicha translocación no es total ya que sigue habiendo  $\beta$ -catenina de manera citosólica. Por el contrario, en la línea celular HCC1937 se observó una distribución tanto en citoplasma como en membrana, pero no la translocación hacia el núcleo.

Respecto a AXIN2, se observa un incremento de la señal de la proteína en la línea celular MDA-MB231 con el tratamiento encontrándose que así como en el caso de  $\beta$ -catenina, la proteína se concentra en el núcleo. En la línea HCC1937 se encontró una señal mucho menor, no obstante, se observa un ligero incremento después del tratamiento, localizándose de manera citosólica.

Por último, respecto a DKK1 se encontró también un incremento de la proteína, en el caso de la línea MDA-MB231 se intensificó en el núcleo después del tratamiento mientras que en la línea HCC1937 la señal se observó en el núcleo en las células control, pero en las que tuvieron el tratamiento la proteína se exportó hacia el citoplasma, pudiéndose encontrar también de forma vesicular.



**Fig. 23. Abundancia y localización de las proteínas AXIN2, DKK1 y β-catenina en células MDA-MB231 después de un tratamiento de 6 horas con la proteína recombinante Wnt1 determinadas mediante inmunofluorescencias.**



**Fig. 24.** Abundancia y localización de las proteínas AXIN2, DKK1 y  $\beta$ -catenina en células HCC1937 después de un tratamiento de 6 horas con la proteína recombinante Wnt1 determinadas mediante inmunofluorescencias.

Con base en los resultados obtenidos mediante Western blot y que se muestran en las Figs. 25 y 26, se confirmó la translocación al núcleo de  $\beta$ -catenina en la línea celular MDA-MB231 después del tratamiento con la proteína Wnt1, la cantidad de proteína presente en el núcleo resulta ser estadísticamente significativa respecto al control (media BSA 0.1%=  $0.7099 \pm 0.08470$ , media 100 ng/mL Wnt1=  $1.298 \pm 0.05926$ , **p= 0.0047**) y en el caso de  $\beta$ -catenina citoplasmática, se encontró una tendencia hacia un incremento de ésta pero que no llega a ser significativo (media BSA 0.1%=  $0.8361 \pm 0.1036$ , media 100 ng/mL Wnt1=  $1.159 \pm 0.1002$ , **p= 0.0887**). En el Western blot de la línea celular HCC1937; a diferencia de lo observado en la inmunofluorescencia, si se detectó la presencia de  $\beta$ -catenina en el núcleo, encontrándose un cambio significativo dado por una disminución en  $\beta$ -catenina nuclear, comportamiento contrario al incremento encontrado en la misma proteína en la línea celular MDAMB231 (media BSA 0.1%=  $1.187 \pm 0.0791$ , media 100 ng/mL Wnt1=  $0.7916 \pm 0.07608$ , **p= 0.0227**). En el caso de  $\beta$ -catenina citoplasmática, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, no obstante, la tendencia también es hacia una disminución en la expresión de la proteína después del tratamiento con la proteína recombinante Wnt1, comparado con el control (media BSA 0.1%=  $1.072 \pm 0.05439$ , media 100 ng/mL Wnt1=  $0.8852 \pm 0.07949$ , **p= 0.1249**).

Respecto a AXIN2, en células MDA-MB231 se confirma el incremento en la abundancia de su proteína después del tratamiento con la proteína Wnt1, el cual resulta ser estadísticamente significativo (media BSA 0.1%=  $0.5822 \pm 0.1347$ , media 100 ng/mL Wnt1=  $1.442 \pm 0.09556$ , **p= 0.0065**), mientras que en la línea HCC1937, también se observa un incremento en la expresión con una **p= 0.0111** (media BSA 0.1%=  $0.705 \pm 0.135$ , media 100 ng/mL Wnt1=  $1.375 \pm 0.0641$ ).

Por último, la proteína DKK1 repite el comportamiento de AXIN2: se encontró un incremento en su abundancia en ambas líneas celulares (MDA-MB231 y HCC1937) con una **p= 0.006** (media BSA 0.1%=  $0.6730 \pm 0.1061$ , media 100 ng/mL Wnt1=  $1.429 \pm 0.09496$ ) y **p= 0.038** (media BSA 0.1%=  $0.5687 \pm 0.1923$ , media 100 ng/mL Wnt1=  $1.630 \pm 0.2898$  respectivamente).

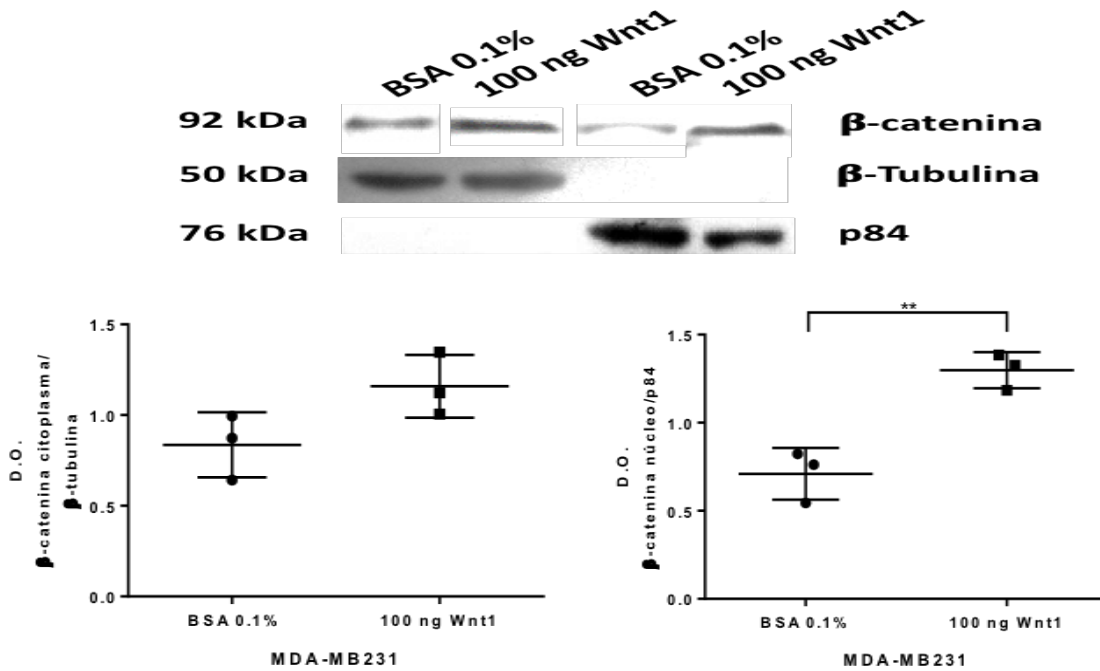
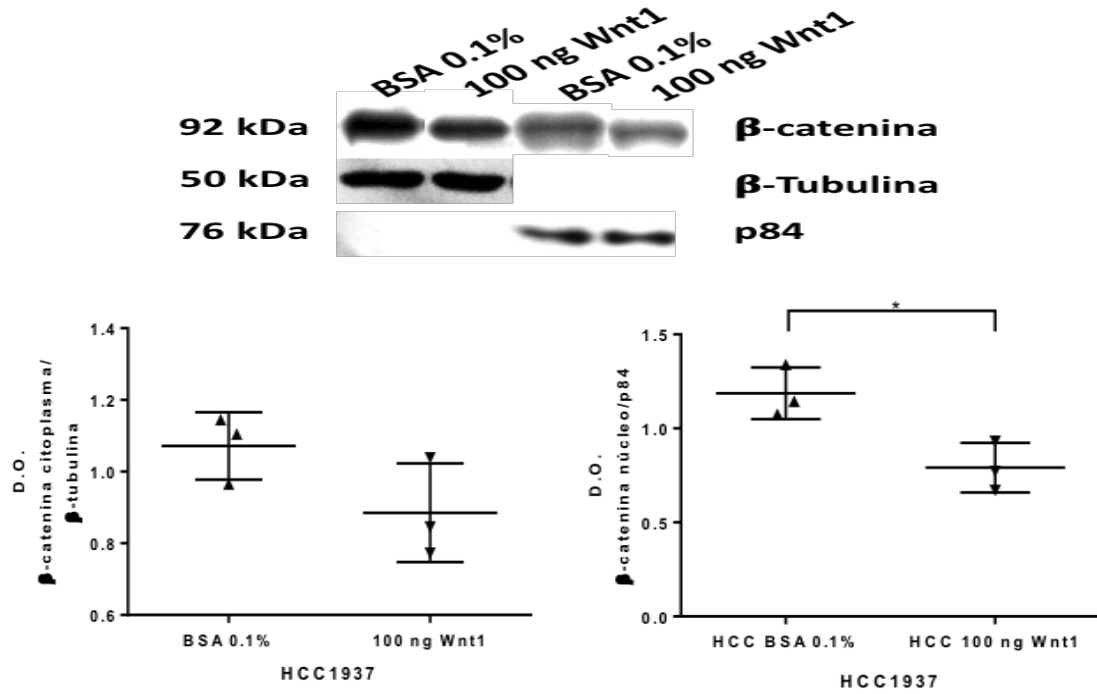


Fig. 25. Abundancia de  $\beta$ -catenina en fracciones celulares (citoplasma y núcleo) de células MDA-MB231 y HCC1937 después de un tratamiento de 6 horas con la proteína Wnt1. Prueba de T-student ( $p < 0.05$ ).

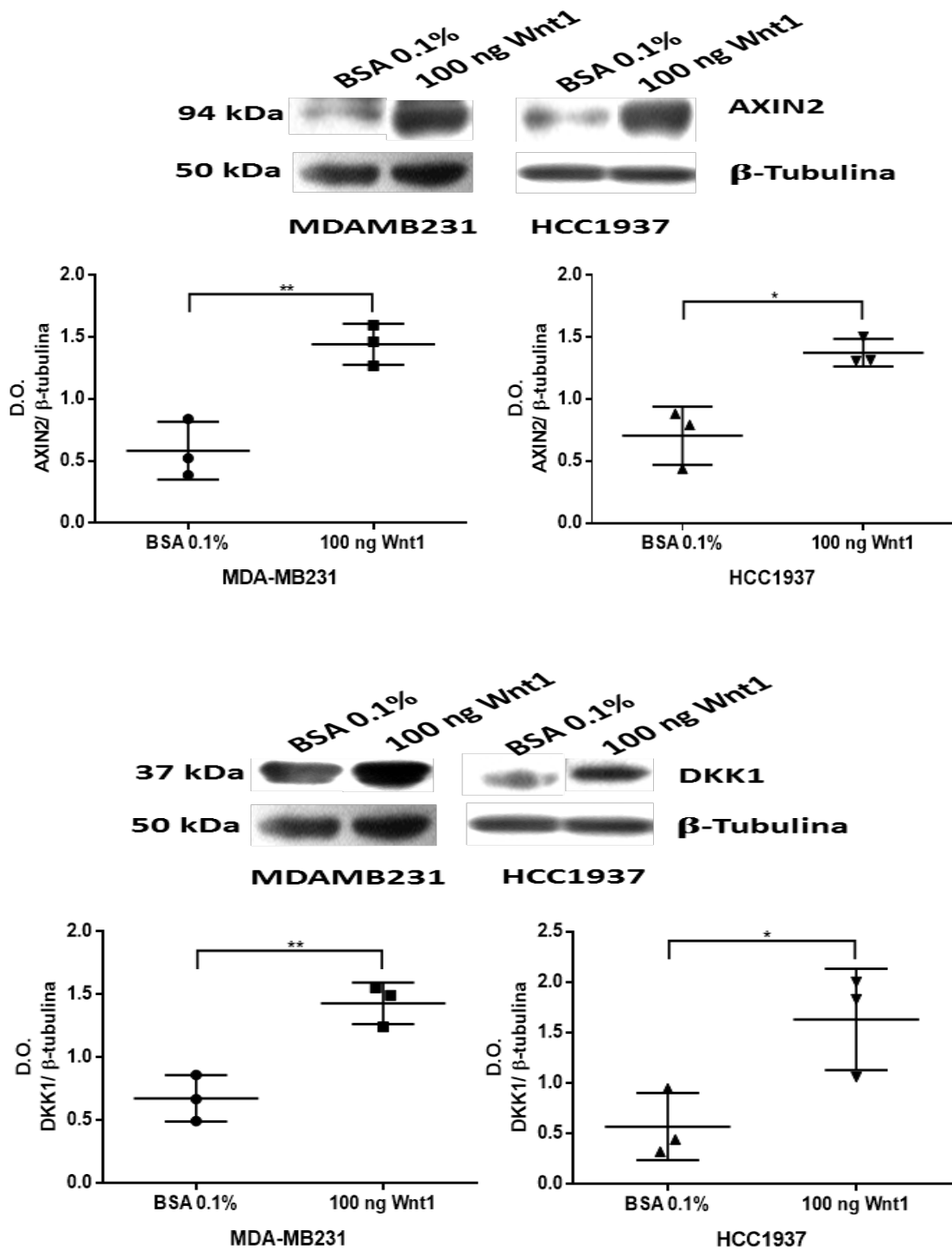


Fig. 26. Abundancia de AXIN2 y DKK1 total en células MDA-MB231 y HCC1937 después de un tratamiento de 6 horas con la proteína Wnt1. Prueba de T-student ( $p < 0.05$ ).

## Discusión

El cáncer es una enfermedad progresiva durante la cual las células malignas adquieren características que les confieren ventajas para su desarrollo y contribuyen a la evasión de los sistemas de reconocimiento y de eliminación de células tumorales del organismo de un individuo. Dentro de las alteraciones que ocurren en esta enfermedad, la inestabilidad genómica es uno de los hallmarks del cáncer que ha sido establecido desde hace tiempo (Hanahan y Weinberg, 2011). Frecuentemente en las células ocurren eventos mutacionales los cuales pueden deberse a defectos en genes involucrados en procesos como la detección del daño en el DNA, la activación de la maquinaria de reparación, la reparación del daño y durante la intercepción de moléculas mutagénicas para evitar su interacción con el DNA (Friedberg *et al.*, 2006, Harper y Elledge, 2007, Jackson y Bartek, 2009, Ciccio y Elledge, 2010 y Negrini *et al.*, 2010). Aunado a lo anterior, mecanismos epigenéticos como la metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales de histonas también se involucran en la represión de los genes que participan en los procesos mencionados y también en la represión de otro tipo de genes como los supresores de tumores (Barnes y Lindhal, 2004).

Centrándonos en el cáncer de mama, éste no se caracteriza por tener una alta tasa de mutaciones (Widschwendter y Jones, 2002) razón por la que fue de interés enfocarnos en la metilación del DNA, ya que es el mecanismo epigenético más estudiado (Sadakierska-Chudy *et al.*, 2015). Respecto a este proceso particular, se sabe que en células malignas ocurre una hipometilación global del genoma aunada a una hipermetilación específica en regiones promotoras de genes que contienen islas CpG (Paz *et al.*, 2003 y Kulis y Esteller, 2010). En el presente trabajo se seleccionaron los genes *AXIN2* y *DKK1* cuyas regiones promotoras contienen una isla CpG en su interior, y de acuerdo con la clasificación establecida por Weber y colaboradores en 2007, los promotores de ambos genes se clasifican como ICP (promotores con isla CpG intermedia) debido a sus valores de proporción CpG de 0.6287 (*AXIN2*) y 0.7035917 (*DKK1*).

Mediante los análisis de correlación realizados se encontró una asociación inversamente proporcional entre el grado de metilación en el promotor de ambos genes con su respectivo nivel de transcrito de mRNA tanto en las gráficas de los 37 distintos tipos de carcinoma de los que se tuvieron datos para ambas variables, como en las gráficas de cáncer de mama que fue el tipo de cáncer de nuestro interés, resaltando las significancias encontradas en todos los análisis. Con base en estos resultados, se demuestra el efecto de la metilación del DNA sobre la disminución del nivel de RNAm en los genes *AXIN2* y *DKK1* en un pool de líneas celulares de cáncer de mama por lo que en las líneas MDA-MB231, HCC1937 y DKK1 observamos que dependiendo del estado de metilación del promotor de los genes *AXIN2* y *DKK1*, hay mayor o menor nivel de RNAm.

A continuación se muestra un resumen de los resultados de metilación encontrados:

	MDA-MB231	HCC1937	DU4475	MCF10A
AXIN2	No metilado	Metilado	No metilado	Metilado
DKK1	No metilado	Parcialmente metilado	Parcialmente metilado	No metilado

De acuerdo con los datos reportados en la base The Cancer Cell Line Encyclopedia, la línea celular MDA-MB231 presenta valores prácticamente nulos de metilación en el promotor de los genes *AXIN2* y *DKK1* lo cual coincide con nuestro resultado encontrado mediante PCR sensible a metilación (MSP) en esta misma línea celular. Por otro lado, en el caso de las células HCC1937 los resultados obtenidos mediante MSP indican que *AXIN2* si se encuentra metilado pero que el promotor de *DKK1* presenta una metilación parcial por lo que hay una discordancia con lo reportado en la misma base de datos. En la línea celular DU4475 el gen de interés fue *DKK1* y si bien su valor de metilación no se considera alto, cabe mencionar que dentro de las 50 líneas celulares de cáncer de mama cuyos datos de metilación y expresión de RNA están publicados, DU4475 es la línea celular con fenotipo triple negativo que mejor se aproximó a los criterios de inclusión establecidos en el presente proyecto. Debido a lo anterior, al analizar los resultados de MSP, mientras el gen *AXIN2* no



se encontró metilado, en el gen *DKK1* la metilación fue parcial así como en el caso de la línea celular HCC1937, no obstante, en este caso si concuerda con el dato de The Cancer Cell Line Encyclopedia. Por último, el hecho de encontrar metilación parcial en *DKK1* en las líneas HCC1937 y DU4475 podría explicarse de diversas formas: por una metilación monoalélica del gen como se ha sugerido por Kocemba *et al.*, 2012 en su estudio realizado en el mismo gen con la línea celular L-363 de leucemia; otra posibilidad es que la metilación parcial pueda deberse al número de pases de las células utilizadas ya que se ha reportado que en líneas celulares mesenquimales, de fibrosis pulmonar idiopática y de cáncer de mama (Bork *et al.*, 2010, Huang *et al.*, 2014 y Hamadneh *et al.*, 2018) este factor favorece la desmetilación del genoma conforme se incrementa el número de pases; así como también se sugiere la presencia de subpoblaciones de células dentro del cultivo: unas con *DKK1* metilado y otras sin metilación en dicho gen y donde el surgimiento de subpoblaciones incluso también se asocia con el número de pases de las células (Lu *et al.*, 1996, Briske-Anderson *et al.*, 1997, Hughes *et al.*, 2007)

La línea celular MCF10A es una línea epitelial de mama no tumorigénica y para estas células no se encontraron datos reportados sobre el estado de metilación de los genes *AXIN2* y *DKK1*, no obstante, fue conveniente analizarla en el proyecto con el fin de poder hacer una comparación sobre el estado de metilación en el que se encuentran los genes de nuestro interés en células no neoplásicas. Al analizar los resultados obtenidos mediante MSP se encontró que mientras *DKK1* no está metilado, *AXIN2* sí lo está, resultado contrario a lo que se esperaría encontrar por el hecho de que es una línea celular no maligna, sin embargo, se debe tomar en cuenta el hecho de que no son células epiteliales sanas sino que su origen parte de un paciente con enfermedad fibroquística (ATCC, 2016). Razón por la cual a reserva de demostrarlo experimentalmente en esta línea celular en particular, la metilación encontrada en el promotor de *AXIN2* puede tener efecto sobre la actividad transcripcional del gen ya que existe evidencia donde se demuestra que el mRNA de este gen en células MCF10A es menor comparado con el mRNA de células MDA-MB231 y MDA-MB468, donde *AXIN2* no se encuentra metilado (Lamb *et al.*, 2013).

Posterior a los resultados de metilación, respecto a los niveles de proteína de AXIN2, DKK1 y  $\beta$ -catenina encontramos lo siguiente:

	Localización basal		Abundancia basal			
	MDA-MB231	HCC1937	MDA-MB231	HCC1937	DU4475	MCF10A
<b>AXIN2</b>	Citoplasma	-	★★★	★★★	★	★
<b>DKK1</b>	Citoplasma y vesículas	Núcleo y citoplasma	★★★	★★	-	★
<b>B-catenina</b>	Citoplasma	Membrana y citoplasma	★	★★	★	★★★

Como se mencionó anteriormente, debido a la proporción CpG los promotores de los genes *AXIN2* y *DKK1* se clasifican como ICP y se sabe que este tipo de promotores se pueden comportar de dos formas: que la metilación del DNA tenga un efecto sobre la actividad del gen, o simplemente que no lo tenga (Weber *et al.*, 2007). En el caso del gen *AXIN2* en la línea MDA-MB231 se encontró un bajo nivel de transcrito reportado en la base de datos The Cancer Cell Line Encyclopedia a pesar de no estar metilado, no obstante, también existe evidencia de que este gen si se transcribe en condiciones basales en estudios realizados por Lamb *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2016 y Wang *et al.*, 2018 en la misma línea celular por lo que se sugiere llevar a cabo la cuantificación del mRNA mediante RT-PCR para saber de qué forma se comportan las células que se utilizaron en el proyecto así como para sustentar los resultados encontrados respecto a su proteína.

A excepción de lo anterior, si comparamos los resultados de la metilación del DNA con los datos de mRNA encontramos relaciones inversas lo que nos dice que a nivel de RNA sí hay un efecto, pero también investigamos si había alguna relación con la proteína y encontramos que la línea celular MDA-MB231 expresa AXIN2 y DKK1, la línea celular DU4475 expresa sólo AXIN2 y la línea HCC1937 también expresa ambas proteínas. En esta última línea celular, es de llamar la atención que exprese AXIN2 debido a que a nivel de DNA se encontró que su promotor está metilado resaltándose que incluso la cantidad que expresa es significativamente superior a la encontrada en células de la línea DU4475 en la que el gen no se encuentra metilado, esto difiere con el estudio de Tseng *et al.*, 2008 en donde se vio que en

muestras aisladas de carcinomas de tipo pulmonar la metilación en el promotor de AXIN2 se asocia con una expresión baja de su proteína pero a la vez concuerda con lo reportado por Wang *et al.*, 2013 donde observan la presencia de AXIN2 en células HCC1937, lo que puede sugerir que en éstas células la metilación del DNA tiene efecto sobre la actividad transcripcional pero no para la traducción del mRNA resaltando la interacción del transcrito con miRNAs como miR-205 (Kim *et al.*, 2014), miR-34a (Lee *et al.*, 2009), miR-222 y miR-15a (Liu *et al.*, 2013), siRNAs (Bao *et al.*, 2012) y proteínas como CDX2 y tankirasa (Huang *et al.*, 2009) en las cuales pueden existir alteraciones que expliquen la abundancia de AXIN2 encontrada.

En el caso de  $\beta$ -catenina, no se determinó su grado de metilación debido a que por su alta proporción CpG, éste es un gen que se clasifica como HCP (promotores con isla CpG con contenido alto de dinucleótidos CG), de los cuales se conoce que cuando están metilados siempre se silencia su actividad y además tienen menor probabilidad de sufrir metilación *de novo* comparado con los ICP (Weber *et al.*, 2007). Por lo tanto, si bien hace falta demostrarlo, nosotros observamos la presencia de la proteína lo que sugiere que este gen no se encuentra metilado en las líneas celulares utilizadas. Al enfocarnos en la presencia de  $\beta$ -catenina, encontramos que la mayor abundancia se presentó en la línea celular HCC1937 y que difiere significativamente de la expresión en células de las líneas MDA-MB231 y DU4475 lo cual ya se había observado en el estudio de Bilir *et al.*, 2013.

Como ya se mencionó, el hecho de que las células HCC1937 hayan presentado también niveles altos de expresión de AXIN2 nos da un resultado contradictorio, ya que esta última proteína se encarga de regular a  $\beta$ -catenina mediante la inducción de su fosforilación para su posterior degradación (Clevers, 2006, Klaus y Birchmeier, 2008 y Fearon, 2011). Por otro lado, en el caso de las células DU4475 se encontró lo contrario, es decir, una baja expresión de  $\beta$ -catenina con una baja expresión de AXIN2. Ambos resultados difieren con el hecho de que la baja expresión de AXIN2 favorece mayor cantidad de  $\beta$ -catenina y viceversa por lo que los resultados pueden sugerir que en el modelo *in vitro* utilizado y bajo condiciones basales, AXIN2 no tiene un efecto importante sobre la regulación de  $\beta$ -catenina lo cual es contradictorio

a lo reportado por Liu y colaboradores en 2016 donde utilizando como modelo muestras de tejidos malignos de mama, particularmente en etapas tempranas del desarrollo del cáncer, encuentran una relación inversa entre la expresión de  $\beta$ -catenina y la expresión tanto de AXIN2 como de SOX7. Por lo tanto, de igual forma se resalta la importancia de analizar otras proteínas en estas líneas celulares que interactúan con AXIN2 con el fin de llevar a cabo la regulación sobre  $\beta$ -catenina tales como el mismo SOX7, AXIN, GSK3 $\beta$ , APC o E3 ubiquitin-ligasa.

Los resultados que se obtuvieron en la línea celular MCF10A indican por un lado que a pesar de que el gen *AXIN2* se encuentra metilado, su proteína se sigue sintetizando lo cual concuerda con lo encontrado en la línea celular HCC1937 y por el otro, que la baja expresión de AXIN2 y de DKK1 que encontramos comparada con la expresión reportada para las líneas celulares malignas, pueden en efecto favorecer una mayor presencia de  $\beta$ -catenina lo que se demuestra por el hecho de que la cantidad expresada en esta línea celular fue significativamente superior a la encontrada en las líneas celulares de cáncer de mama. Dicho resultado muestra que en células de mama no neoplásicas AXIN2 es importante para la regulación de  $\beta$ -catenina y además puede favorecer la idea de que la alteración en el efecto de AXIN2 sobre  $\beta$ -catenina es específica de células de cáncer de mama triple negativo.

Wnt1 es un ligando reportado que activa la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Nusse y Varmus, 1982, Klarmann *et al.*, 2008 y MacDonald *et al.*, 2009) y mediante el tratamiento que aplicamos a las células MDA-MB231 y HCC1937 se encontró lo siguiente:

	Localización post-tratamiento		Abundancia post-tratamiento	
	MDA-MB231	HCC1937	MDA-MB231	HCC1937
<b>AXIN2</b>	Núcleo y citoplasma	-	↑	↑
<b>DKK1</b>	Núcleo, citoplasma y vesículas	Núcleo, citoplasma y vesículas	↑	↑
<b>B-catenina</b>	Núcleo y citoplasma	Membrana y citoplasma	↑	↓

-En células de la línea **MDA-MB231** se indujo la vía Wnt/ $\beta$ -catenina lo cual se observa mediante la translocación de  **$\beta$ -catenina** del citoplasma al núcleo después de 6 horas de tratamiento con la proteína Wnt1 visto por inmunofluorescencias. Aunado a lo anterior, en la misma línea celular se observó un incremento en la señal de la proteína **AXIN2**, cuyo gen es blanco del factor transcripcional TCF/LEF- $\beta$ -catenina (Jho *et al.*, 2002) y a diferencia de las células control donde AXIN2 se encuentra principalmente en el citosol, después de la inducción de la vía se encontró también en el núcleo de la célula, resultado que puede apoyarse con el estudio publicado por Yook *et al.* en 2006 donde se demostró que en células de cáncer de mama AXIN2 estabiliza a Snail1 al inducir la exportación del núcleo de GSK3 $\beta$  (proteína que regula Snail1 de manera negativa) y también se asocia con incremento en la expresión de Snail1 en líneas celulares SW620 y HCT116 de cáncer colorrectal (Wu *et al.*, 2012).

Por otro lado, **DKK1** se ha reportado como un gen blanco de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en un estudios realizados en células T293, HeLa y muestras de tejido tumoral de pacientes con cáncer de colon (Niida *et al.*, 2004, González-Sancho *et al.*, 2005 y Chamorro *et al.*, 2005), hecho que concuerda con lo encontrado en el presente estudio, ya que tanto en células MDA-MB231 como en células HCC1937 se observa un incremento drástico en la señal de la proteína DKK1 después del tratamiento con Wnt1 visto por inmunofluorescencia. También cabe añadir que a diferencia de las células control donde la señal se concentra más en el núcleo, después de la inducción de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina la proteína también se encuentra en el citoplasma e incluso en vesículas, resultado que concuerda con el hecho de que DKK1 es una proteína de exportación cuya función es regular negativamente a la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y para ello debe encontrarse en la matriz extracelular (Aguilera *et al.*, 2006, Cowling *et al.*, 2007 y Semënov *et al.*, 2008). Por lo tanto, en el presente trabajo se encontró que en células triple negativo de cáncer de mama la expresión de DKK1 es inducida mediante la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina por interacción de las células con el ligando Wnt1 y basándonos en su localización se sugiere que la proteína que se exporta sigue cumpliendo con su función de modo que puede considerarse como una forma de retroalimentación negativa para que las células

mantengan cierto control sobre la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. Esta última idea debe tomarse con reservas y ser demostrada experimentalmente para identificar la función exacta de DKK1 en células de cáncer de mama, ya que por un lado existen estudios que proponen funciones supresoras de tumor al demostrar el efecto negativo de la expresión de DKK1 sobre células malignas por ejemplo, al inhibir el crecimiento del tumor (Qiao *et al.*, 2008) o regular negativamente la expresión de factores de transcripción como SLUG y TWIST cuya función está claramente asociada al proceso de transición epitelio-mesénquima (DiMeo *et al.*, 2009). Además, también se ha visto el efecto positivo que tiene la ausencia de DKK1 sobre la progresión de cáncer de mama, colon y melanoma (González-Sancho *et al.*, 2005, Kuphal *et al.*, 2006 y Mikheev *et al.*, 2008); mientras que por otro lado, también se han reportado asociaciones de una alta expresión de DKK1 con la progresión de algunos tipos de cáncer como mieloma, hepatoblastoma o cáncer de mama, así como con una peor prognosis (Tian *et al.*, 2003, Wirths *et al.*, 2003, Forget *et al.*, 2007 y Yamabuki *et al.*, 2007).

-En el caso de los resultados de inmunofluorescencia de la línea celular **HCC1937** encontramos una expresión baja de **AXIN2** y la señal fue notoriamente menor en comparación de la observada en células MDA-MB231, si bien no se obtuvieron datos cuantitativos de lo anterior, es evidente que hay una diferencia con los resultados obtenidos por Western blot donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas de la expresión basal de AXIN2 entre ambas líneas celulares. Esta diferencia se puede explicar por el hecho de que los anticuerpos utilizados no fueron los mismos ya que si bien se ha reportado que el anticuerpo con número de catálogo sc25302 de Santa Cruz Biotechnology se ha utilizado para la detección de AXIN2 mediante Western blot (Hughes y Brady, 2005, Hughes y Brady, 2006), en el presente estudio no nos fue posible detectar la proteína, razón por la cual se optó por utilizar un anticuerpo diferente, por lo tanto, también cabe mencionar que el anticuerpo utilizado para las inmunofluorescencias es monoclonal y el utilizado para Western blot es policlonal. Considerando lo anterior, se sugiere que existe un sesgo en los resultados debido a la diferencia de afinidad de los anticuerpos con la proteína AXIN2 y por lo tanto para comprobar esta hipótesis se

recomienda utilizar un anticuerpo que funcione para realizar ambas técnicas y comparar los resultados con lo encontrado en el presente proyecto.

A pesar de tratar las células MDA-MB231 y HCC1937 bajo las mismas condiciones (100 ng/mL de proteína recombinante Wnt1 durante 6 horas), no se observó la translocación de  **$\beta$ -catenina** hacia el núcleo en el caso de la línea HCC1937, no obstante, las células con tratamiento presentaron una distribución de  $\beta$ -catenina tanto en membrana como en citoplasma a diferencia de las células control donde se observó principalmente en membrana, lo cual sugiere que sí hay un efecto inducido por la señalización de Wnt1. La idea anterior se puede reforzar por los incrementos significativos observados de AXIN2 y DKK1 en células HCC1937 ya que ambos son genes blanco de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Jho *et al.*, 2002, Lustig *et al.*, 2002, Niida *et al.*, 2004, González-Sancho *et al.*, 2005 y Chamorro *et al.*, 2005). Con base en lo anterior, se puede sugerir que durante las 6 horas de tratamiento  $\beta$ -catenina si translocó al núcleo, indujo la expresión de AXIN2 y DKK1 y debido a sus funciones la primer proteína actuó sobre  $\beta$ -catenina (Yan *et al.*, 2001, Lustig *et al.*, 2002 y Jho *et al.*, 2002, Salahshor y Woodgett, 2005 y Qian *et al.*, 2011) y la segunda sobre LRP5 para regular la actividad de la vía (Mao *et al.*, 2001, Mao y Niehrs, 2003, Aguilera *et al.*, 2006, Cowling *et al.*, 2007 y Semënov *et al.*, 2008) y por ello no se observa una señal clara de su localización en el núcleo pero sí en el citosol. Esto puede apoyarse con lo reportado por Bilir *et al.*, 2013 ya que en su trabajo se demostró la inducción de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en un tiempo de 4 horas en las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo BT-549, MDA-MB231 y HCC1937 y no así, en células MCF7 (con fenotipo luminal), hecho que también sugiere una mayor susceptibilidad para la activación de la vía en células malignas con fenotipo triple negativo en particular. Por último, si tomamos en cuenta que las células HCC1937 tienen su origen en un adenocarcinoma en etapa II, se propone que en etapas tempranas se tiene una mejor regulación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina si comparamos con los resultados encontrados en células MDA-MB231 las cuales fueron aisladas de un paciente con enfermedad metastásica y donde si se observó la translocación e incrementos de  $\beta$ -catenina tanto en citosol como en núcleo estadísticamente significativos posterior a la inducción de la vía, aún cuando

reguladores negativos como *AXIN2* y *DKK1* se encuentran presentes e incluso también incrementaron su expresión significativamente.

Es conocida la participación que tiene la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en procesos que favorecen la progresión del cáncer como son la migración celular y la transición epitelio-mesénquima, así como la asociación que se ha encontrado específicamente con el fenotipo triple negativo, en el presente proyecto estudiamos la participación de la metilación en los genes *AXIN2* y *DKK1* los cuales regulan negativamente la vía y se encontró que contrario al planteamiento de la hipótesis, *AXIN2* se expresa e incluso se incrementa su proteína posterior a la inducción de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina pese a estar metilado en células HCC1937. Por otro lado, la relación metilación-expresión de *DKK1* no fue clara ya que el nivel de metilación encontrado en su promotor no fue considerablemente alto por lo que se sugiere evaluar otro tipo de alteraciones cuyo efecto pueda explicar de mejor forma la ausencia total de su proteína en células DU4475. No obstante, en células MDAMB231 y HCC1937 también se demuestra su incremento por lo que a reserva de también probarlo experimentalmente, se sugiere que en células malignas posiblemente la función tanto de *AXIN2* como *DKK1* está siendo rediseñada para participar en procesos que promueven la progresión del cáncer, en lugar de suprimir la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, ya que dentro de los resultados encontrados se vio que el incremento en la expresión de  $\beta$ -catenina correlaciona con el incremento de *AXIN2*, hecho que sugiere la pérdida de la regulación de *AXIN2* sobre  $\beta$ -catenina.



Por último, se muestra en conjunto el resumen de resultados obtenidos en el presente proyecto:

	MDA-MB231	HCC1937	DU4475	MCF10A
AXIN2	No metilado	Metilado	No metilado	Metilado
DKK1	No metilado	Parcialmente metilado	Parcialmente metilado	No metilado

	Localización basal		Abundancia basal			
	MDA-MB231	HCC1937	MDA-MB231	HCC1937	DU4475	MCF10A
AXIN2	Citoplasma	-	★★★	★★★	★	★
DKK1	Citoplasma y vesículas	Núcleo y citoplasma	★★★	★★	-	★
B-catenina	Citoplasma	Membrana y citoplasma	★	★★	★	★★★

	Localización post-tratamiento		Abundancia post-tratamiento	
	MDA-MB231	HCC1937	MDA-MB231	HCC1937
AXIN2	Núcleo y citoplasma	-	↑	↑
DKK1	Núcleo, citoplasma y vesículas	Núcleo, citoplasma y vesículas	↑	↑
B-catenina	Núcleo y citoplasma	Membrana y citoplasma	↑	↓

## Perspectivas

Se propone realizar PCR tiempo real para analizar los niveles de mRNA de los genes *AXIN2* y *DKK1* en las líneas celulares utilizadas en el proyecto para poder respaldar y hacer el link de los resultados encontrados respecto a la metilación del DNA y la abundancia de proteína.

También se plantea evaluar qué ocurre con el promotor de los genes *AXIN2* y *DKK1* posterior al tratamiento con Wnt1 respecto a su estado de metilación ya que basándonos en los resultados vistos en *AXIN2*, posiblemente pueda sufrir un proceso de desmetilación o puede ser blanco de remodeladores de la cromatina que facilitan su transcripción y esto puede resaltar la importancia de la expresión de *AXIN2* en células triple negativo de cáncer de mama.

En el caso de la línea celular DU4475 se propone aplicar un tratamiento desmetilante para eliminar dicha marca del promotor de *DKK1* y evaluar si se recupera la expresión del gen. En el caso de que lo anterior ocurra, se propone aplicar el tratamiento con el ligando Wnt1 y analizar la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y cómo se comportan *AXIN2* y *DKK1* en esta línea celular.

Se sugiere profundizar en el estudio de la función que llevan a cabo *AXIN2* y *DKK1* en células triple negativo de cáncer de mama ya que en células MDA-MB231 no se observó un decremento de la abundancia de  $\beta$ -catenina ni tampoco la inhibición de la vía, visto por la traslocación de  $\beta$ -catenina al núcleo de las células.

Se recomienda aplicar un tratamiento con un ligando Wnt diferente que a la vez sea conocido por inducir la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, como por ejemplo Wnt3a y repetir los experimentos para determinar la localización de  $\beta$ -catenina y el comportamiento de los genes *AXIN2* y *DKK1* y determinar si existe coherencia, o si por el contrario, la translocación y la inducción de los genes depende del ligando.

## Conclusiones

- La metilación del DNA en el promotor del gen *AXIN2* no es suficiente para silenciarlo.
- Aún cuando *AXIN2* se encuentra metilado, se logra su inducción después de la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en células triple negativo de cáncer de mama.
- No fue posible establecer una relación clara entre la metilación del gen *DKK1* en su región promotora y la síntesis de su proteína.
- No obstante, se demostró la inducción de *DKK1* posterior a la activación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.
- Se sugiere que *AXIN2* y *DKK1* cumplen un rol que favorece el mantenimiento de las células tumorales en lugar de contrarrestar la sobreactivación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.
- Si la hipótesis anterior se cumple, la presencia de *AXIN2* y *DKK1* puede favorecer efectos que potencialmente pueden derivar en procesos asociados con la alta agresividad del cáncer de mama con fenotipo triple negativo como la migración, proliferación celular o la transición epitelio mesénquima.
- Por último, los resultados de este trabajo contribuyen al entendimiento de la regulación mediante la metilación del DNA en el promotor de dos genes que participan de manera importante como reguladores negativos dentro de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina. Dicha vía se encuentra desregulada en células triple negativo de cáncer de mama por lo que el esclarecimiento y comprensión de la función e importancia de *AXIN2* y *DKK1* para el desarrollo y mantenimiento de este fenotipo, ayudarán en la búsqueda de proteínas o procesos clave involucrados en la participación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina que a futuro puedan funcionar como blancos terapéuticos y derivar en el desarrollo de una terapia más específica y eficaz y, por lo tanto, un mejor pronóstico para pacientes con esta enfermedad.

## Literatura citada

- Abeloff M.D., Armitage J.O., Lichter A.S. y Neederhuber J.E. 2005. *Clinical Oncology*. Churchill Livingstone.
- Abrahamsson A.E., Geron I., Gotlib J., Dao K.H., Barroga C.F., Newton I.G., Giles F.J., Durocher J., Creusot R.S. y Karimi M. 2009. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  missplicing contributes to leukemia stem cell generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 106: 3925–3929.
- Adamson M.C., Dennis C., Delaney S.J., Christiansen J.H., Monkley S., Kozak C.A. y Wainwright B. 1994. Isolation and genetic mapping of two novel members of the murine Wnt gene family, Wnt11 and Wnt12, and the mapping of Wnt5a and Wnt7a. *Genomics*; 24(1): 9-13.
- Ai L., Tao Q., Zhong S., Fields C.R., Kim W.J., Lee M.W., Cui Y., Brown K.D. y Robertson K.D. 2006. Inactivation of Wnt inhibitory factor-1 (WIF1) expression by epigenetic silencing is a common event in breast cancer. *Carcinogenesis*; 27: 1341-8
- Aguilera O., Fraga M.F., Ballestar E., Paz M.F., Herranz M., Espada J., Garcia J.M., Munoz A., Esteller M. y Gonzalez-Sancho J.M. 2006. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene*; 25: 4116-21.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. Signaling Pathways That Depend on Regulated Proteolysis. En: *Molecular Biology of the Cell*. (Eds) Garland Science 4th. Edición. New York: Garland Science, 2005 p. 893-899.
- American Cancer Society. 2015. [Consultado el 11 de enero de 2017]. Disponible en: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-risk-factors>
- American Cancer Society. 2016. [Consultado el 16 de enero de 2017]. Disponible en: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-staging>
- Anderson D.E. y Badzioch M.D. 1985. Risk of familial breast cancer. *Cancer*; 56: 2092-2098.
- Anderson W.F., Chatterjee N., Ershler W.B. y Brawley O.W. 2002. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Research and Treatment*; 76(1): 27-36.
- Antequera F., Bird A. 1993. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proceeding of the National Academy of Sciences*; 90: 11995-59.

- Atcha F.A., Syed A., Wu B., Hoverter N.P., Yokoyama N.N., Ting J.H., Munguia J.E., Mangalam H.J., Marsh J.L. y Waterman M.L. 2007. A unique DNA binding domain converts T-cell factors into strong Wnt effectors. *Molecular and cellular biology*; 27:8352–8363.
- ATCC. 2016. MCF 10A (ATCC® CRL10317™). [Consultado el 22 de noviembre de 2017]. Disponible en: <https://www.atcc.org/products/all/CRL-10317.aspx#documentation>.
- ATDBio. 2005. Epigenetics. [Consultado el 25 de febrero de 2017]. Disponible en: <https://www.atdbio.com/content/56/Epigenetics>.
- Bao R., Christova T., Song S., Angers S., Yan X. y Attisano L. 2012. Inhibition of tankyrases induces Axin stabilization and blocks Wnt signalling in breast cancer cells. *PLoS One*; 7(11): e48670.
- Bardou V.J., Arpino G., Elledge R.M., Osborne C.K., Clark G.M. 2003. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *Journal of Clinical Oncology*; 21(10): 1973-1979.
- Barnes D.E., y Lindahl T. 2004. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annual Reviews of Genetics*; 38: 445–476.
- Bauer K.R., Brown M., Cress R.D., Parise C.A. y Caggiano V. 2007. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*; 109(9): 1721-1728.
- Baylin S.B. y Ohm J.E. 2006. Epigenetics gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nature Reviews Cancer*; 6: 107-116.
- Behrens J., Jerchow B. A., Würtele M., Grimm J., Asbrand C., Wirtz R., Kühl M., Wedlich D. y Birchmeier, W. 1998. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science*; 280: 596-599.
- Bernkopf D.B., Hadjihannas M.V. y Behrens J. 2015. Negative-feedback regulation of the Wnt pathway by conductin/axin2 involves insensitivity to upstream signaling. *Journal of Cell Science*; 128: 33-39.
- Bernstein L. 2002. Epidemiology of endocrine-related risk factors for breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*; 7: 3-15.

- Bestor T.H. 2000. The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*; 9: 2395-2402.
- Binnerts M.E., Kim K.A., Bright J.M., Patel S.M., Tran K., Zhou M., Leung J.M., Liu Y., Lomas W.E. y Dixon M. 3<sup>rd</sup>. 2007. R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 104:14700–14705.
- Birgisdottir V., Olafur A.S., Sigridur K.B., Holmfridur H., Jon G.J. y Jorunn E.E. 2006. Epigenetic silencing and deletion of the *BRCA1* gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Research*; 8 (4): R38.
- Bjorklund P., Akerstrom G. y Westin G. 2007. An LRP5 receptor with internal deletion in hyperparathyroid tumors with implications for deregulated WNT/beta-catenin signaling. *PLoS medicine*; 4:e328.
- Bjorklund P., Svedlund J., Olsson A.K., Akerstrom G. y Westin G. 2009. The internally truncated LRP5 receptor presents a therapeutic target in breast cancer. *PLoS ONE*; 4: e4243.
- Bork S., Pfister S., Witt H., Horn P., Korn., Ho A.D. y Wagner W. 2010. DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell*; 9(1): 54-63.
- Breast Cancer. 2016. [Consultado el 16 de enero de 2017]. Disponible en: <http://www.breastcancer.org/es/sintomas/tipos>
- Briske-Anderson M.J., Finley J.W. y Newman S.M. 1997. Influence of culture time and passage number on morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; 214(3): 248-257.
- Brott B.K. y Sokol S.Y. 2002. Regulation of Wnt/LRP signaling by distinct domains of Dickkopf proteins. *Molecular and Cell Biology*; 22: 6100–6110.
- Calderón-Garcidueñas A.L., Paras-Barrientos F.U., Cardenas-Ibarra L., Gonzalez-Guerrero J.F., Villarreal-Rios E. y Staines-Boone T. 2000. Risk factors of breast cancer in Mexican women. *Salud Publica Mex*; 42(1): 26.
- Cardenas K., Frisch K.M.D. 2003. Comprehensive breast cancer screening Programs now include individual risk assessment. *Postgraduate Medicine*; Tomo 113 (2): 34.

- Cárdenas S.J., Bargalló R.E., Erazo V.A., Maafs M.E. y Poitevin C.A. 2013. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. [Consultado el 24 de Agosto de 2016]. Disponible en <http://consensocancermamario.com>.
- Carey L.A., Perou C.M., Livasy C.A., Dressler L.G., Cowan D., Conway K., Karaca G., Troester M.A., Tse C.K., Edmiston S., Deming S.L., Geradts J., Cheang M.C., Nielsen T.O., Moorman P.G., Earp H.S. y Milikan R.C. 2006. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*; 295(21): 2492-2502.
- Chamorro M.N., Schwartz D.R., Vonica A., Brivanlou A.H., Cho K.R. y Varmus H.E. 2005. FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO Journal*; 24(1): 73-84.
- Chia S., Norris B., Speers C., Cheang M., Gilks B., Gown A.M., Huntsman D., Olivetto I.A., Nielsen T.O. y Gelmon K. 2008. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *Journal of Clinical Oncology*; 26(35): 5697-5704.
- Cho N.Y., Kim B.H., Choi M., Yoo E.J., Moon K.C. y Cho Y.M. 2007. Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features. *Journal of Pathology*; 211:269-277.
- Choy M.K., Movassagh M., Goh H.G., Bennett M.R., Down T.A. y Foo R.S. 2010. Genome-wide conserved consensus transcription factor binding motifs are hyper-methylated. *BMC Genomics*; 11:519.
- Ciccia A., y Elledge S.J. 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Molecular Cell* ; 40: 179–204.
- Chia I.V. y Costantini F. 2005. Mouse axin and axin2/conductin proteins are functionally equivalent in vivo. *Molecular and Cellular Biology*; 25: 4371–4376
- Clements W.M., Lowy A.M. y Groden J. 2003. Adenomatous polyposis coli/ $\beta$ -catenin interaction and downstream targets: Altered gene expression in gastrointestinal tumors. *Clinical Colorectal Cancer*; 3: 113–120.
- Clevers H. 2006. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in development and disease. *Cell*; 127(3): 469-480.

- Cliffe A., Hamada F. y Bienz M. 2003. A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. *Current Biology*; 13:960–966.
- Cowling V.H., D’Cruz C.M., Chodosh L.A. y Cole M.D. 2007. c-Myc transforms human mammary epithelial cells through repression of the Wnt inhibitors DKK1 and SFRP1. *Molecular and Cellular Biology*; 27: 5135-46.
- Criscitello C., Azim H.A., Schouten P.C., Linn S.C. y Sotiriou C. 2012. Understanding the biology of triple-negative breast cancer. *Annals of Oncology*; 23: vi13-8.
- Cross S.H. y Bird A.P. 1995. CpG islands and genes. *Current Opinion in Genetics and Development*; 5: 309-314.
- Daly, A., Steen, V., Fairbrother, K., e Idle, J. 1996. CYP2D6 multiallelism. *Methods in Enzimology*, 272, 199-201.
- Daniels D.L. y Weis W.I. 2005. Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt- mediated transcription activation. *Nature structural & molecular biology*; 12:364–371.
- Davidson G., Wu W., Shen J., Bilic J., Fenger U., Stannek P., Glinka A. y Niehrs C. 2005. Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*; 438:867–872.
- De la Vara-Salazar E., Palacio-Mejía L.S., Oropeza C., Hernández M. y Lazcano-Ponce E. 2011. Perfil epidemiológico de la mortalidad en el sureste de México, 1980-2008. México: INSP.
- Deaton A.M. y Bird A. 2017. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*; 25: 1010-1022.
- Dent R., Trudeau M., Pritchard K.I., Hanna W.M., Sawka C.A., Lickley L.A., Rawlinson E., Sun P. y Narod S.A. 2007. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*; 13(15): 4429-4434.
- DiMeo T.A., Anderson K., Phadke P., Fan C., Perou C.M., Naber S. y Kuperwasser C. 2009. A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Research*; 69: 5364–73.
- Doerfler W. 1983. DNA methylation and gene activity. *Annual Review of Biochemistry*; 52:93-124.



- Dosen G., Tenstad E., Nygren M.K., Stubberud H., Funderud S., Rian E. 2006. Wnt expression and canonical Wnt signaling in human bone marrow B lymphopoiesis. *BMC Immunology*; 7:13.
- Dunnwald L.K., Rossing M.A. y Li C.I. 2007. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Research*; 9(1): R6.
- Escobar-Gómez F., Jódar W. y Hawkins F. 2009. Receptor Wnt: fisiología, fisiopatología y potenciales nuevas dianas terapéuticas. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*; 18(2): 39-44.
- Ekstrom E.J., Sherwood V. y Andersson T. 2011. Methylation and loss of Secreted Frizzled-Related Protein 3 enhances melanoma cell migration and invasion. *PLoS ONE*; 6: e18674.
- Elango N. y Yi S.V. 2008 DNA methylation and structural and functional bimodality of vertebrate promoters. *Molecular Biology and Evolution*; 25 (8): 1602-1608.
- Elledge R.M., Green S., Pugh R., Allred D.C., Clark G.M., Hill J., Ravdin P., Martino S. y Osborne C.K. 2000. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immune-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *International Journal of Cancer*; 89(2): 111-117.
- Fagotto F., Jho E., Zeng L., Kurth T., Joos T., Kaufmann C. y Costantini F. 1999. Domains of axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization. *Journal of Cell Biology*; 145: 741-756.
- Fearon E.R. 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual Reviews of Pathology*; 6: 479-507.
- Feinberg A.P. 2001. Cancer epigenetics takes center stage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 98(2): 392-394.
- Forget M.A., Turcotte S., Beauseigle D., Godin-Ethier J., Pelletier S., Martin J., Tanguay S. y Lapointe R. 2007. The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types. *British Journal of Cancer*; 96: 646-53.

- Friedberg E.C., Aguilera A., Gellert M., Hanawalt P.C., Hays J.B., Lehmann A.R., Lindahl T., Lowndes N., Sarasin A., y Wood, R.D. 2006. DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair Amst.* ; 5: 986–996.
- Galamb O., Kálmar A., Péterfia B., Csabai I., Bodor A., Ribli D., Krenács T., Patai A.V., Wichmann B., Barták B.K., Tóth K., Valcz G., Spisak S., Tulassay Z. y Molnár B. 2016. Aberrant DNA methylation of WNT pathway genes in the development and progression of CIMP-negative colorectal cancer. *Epigenetics*; 11 (8): 588-602.
- Gallego N.G. 2001. Carcinoma *in situ* de la mama: controversias. *Toko-Ginecología Práctica*; 60 (5): 251-255.
- Glinka A., Wu W., Delius H., Monaghan A.P., Blumenstock C. y Niehrs C. 1998. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*; 391: 357–362.
- González-Sancho J.M., Aguilera O., García J.M., Pendás-Franco N., Peña C., Cal S., García de Herreros A., Bonilla F. y Muñoz A. 2005. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene*; 24(6): 1098-1103.
- Hamadneh L., Al-Majawleh M., jarrar Y., Shraim S., Hasan M. y Abu-Irmaileh B. 2018. Culturing conditions highly affect DNA methylation and gene expression levels in MCF7 breast cancer cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*; 54(5): 331-334.
- Hanahan D. y Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*; 144: 646-674.
- Harper J.W., y Elledge S.J. 2007. The DNA damage response: Ten years after. *Molecular Cell* ; 28: 739–745.
- Hatzis P., van der Flier L.G., van Driel M.A., Guryev V., Nielsen F., Denissov S., Nijman I.J., Koster J., Santo E.E. y Welboren W. 2008. Genome-wide pattern of TCF7L2/TCF4 chromatin occupancy in colorectal cancer cells. *Molecular and cellular biology*; 28:2732–2744.
- He X., Semenov M., Tamai K. y Zeng X. 2004. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*; 131:1663–1677.
- Henderson B.E., Ross R.K., Judd H.L., Krailo M.D. y Pike M.C. 1985. Do regulatory obulatory cycles increase breast cancer risk. *Cancer*; 56: 1206-1208.

- Henderson B.R. y Fagotto F. 2002. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport. *EMBO reports*; 3:834–839.
- Hidalgo-Miranda A. y Jiménez-Sánchez G. 2009. Bases genómicas del cáncer de mama: avances hacia la medicina personalizada. *Salud Pública Mex.* 51 (2) S197-S207.
- Honda A., Kurabayashi T., Yahata T., Tomita M., Takakuwa K. y Tanaka K. 1998. Lumbar bone mineral density changes during pregnancy and lactation. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*; 63: 253-258.
- Hotchkiss R.D. 1948. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*; 175: 315–332.
- Huang S.M., Mishina Y.M., Liu S., Cheung A., Stegmeier F., Michaud G.A., Charlat O., Willele E., Zhang Y., Wiessner S., Hild M., Shi X., Wilson C.J., Mickanin C., Myer V., Fazal A., Tomlinson R., Serluca F., Shao W., Cheng H., Shultz M., Rau C., Schirle M., Schlegl J., Ghidelli S., Fawell S., Lu C., Curtis D., Kirschner M.W., Lengauer C., Finan P.M., Tallarico J.A., Bouwmeester T., Porter J.A., Bauer A. y Cong F. 2009. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling, *Nature*; 461: 614–620.
- Huang S.K., Scruggs A.M., Mceachin R.C. y White E.S. 2014. Lung fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis exhibit genome-wide differences in DNA methylation compared to fibroblasts from nonfibrotic lung. *PLoS ONE*; 9(9): e107055.
- Hughes T.A. y Brady H.J. 2005. Expression of axin2 is regulated by the alternative 5'-untranslated regions of its mRNA. *The Journal of Biological Chemistry*; 280(9): 8581-8588.
- Hughes T.A. y Brady H.J. 2006. Regulation of axin2 expression at the levels of transcription, translation and protein stability in lung and colon cancer. *Cancer Letters*; 233(2): 338-347.
- Hughes P., Marshall D., Reid Y., Parkes H. y Gelber C. 2007. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques*; 43(5): 575-586.
- Hulka B.S. y Moorman P.G. 2001. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*; 38: 103-113.
- Inbar-Feigenberg M., Choufani S., Butcher D.T., Roifman M. y Weksberg R. 2013. Basic concepts of epigenetics. *Fertil Steril*; 99 (3): 607-615.

- INEGI. 2014. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (19 de octubre). Datos nacionales. [Consultado el 12 de enero de 2017]. Disponible en: <http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2014/mama0.pdf>.
- INEGI. 2016. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Datos nacionales. [Consultado el 15 de enero de 2017]. Disponible en: <http://www.diputados.gob.mx/sedia/biblio/usieg/comunicados/salud.pdf>
- INEGI. 2016. Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre). Datos nacionales. [Consultado el 15 de enero de 2017]. Disponible en: <https://www.ues.mx/Docs/avisos/diamundialcancerde mama.pdf>
- INEGI. 2018. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). Datos nacionales. [Consultado el 27 de octubre de 2018]. Disponible en: [http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018\\_nal.pdf](http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf).
- Instituto Nacional del Cáncer. 2014. Manual de enfermería oncológica. [Consultado el 10 de enero de 2017]. Disponible en: <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000510cnt-38-ManualEnfermeriaOncologica2014.pdf>
- Instituto Nacional del Cáncer. 2015. [Consultado el 21 de agosto de 2016]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>
- Jackson S.P., y Bartek J. 2009. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*; 461: 1071–1078.
- Jin Z., Tamura G., Tsuchiya T., Sakata K., Kashiwaba M., Osakabe M. y Motoyama T. 2001. Adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter hypermethylation in primary breast cancers. *British Journal of Cancer*; 85: 69-73.
- Jho E. H., Zhang T., Domon C., Joo C. K., Freund J. N. y Costantini, F. 2002. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Molecular and Cell Biology*; 22: 1172-1183.
- Jones P.A. y Baylin S.B. 2007. The epigenomics of cancer. *Cell*; 128(4): 683-692
- Kim J.S., Park S.Y., Lee S.A., Park M.G., Yu S.K., Lee M.H., Park M.R., Kim S.G., Oh J.S., Lee S.Y., Kim C.S., Kim H.J., Chun H.S., Moon S.M. y Kim D.K. 2014. MicroRNA-205 suppresses the oral carcinoma oncogenic activity via down-regulation of Axin-2 in KB human oral cancer cell. *Molecular and Cellular Biochemistry*; 387 (1–2):71–79.

- Kimelman D. y Xu W. 2006. beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*; 25:7482–7491.
- Kinzler K.W., Nilbert M.C., Vogelstein B., Bryan T.M., Levy D.B., Smith K.J., Preisinger A.C., Hamilton S.R., Hedge P. y Markham. 1991. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science*; 251: 1366–1370.
- Kishida S., Yamamoto H., Hino S., Ikeda S., Kishida M., Kikuchi A. 1999. DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Molecular and Cellular Biology*; 19: 4414–4422.
- Klarmann G.J., Decker A. y Farrar W.L. 2008. Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway. *Epigenetics*; 3(2): 59-63.
- Klaus A y Birchmeier W 2008. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews Cancer* ; 8: 387–398.
- Knaut F.M., Nigenda G., Lozano R., Arreola-Ornelas H., Langer A. y Frenk J. 2008. Breast cancer in Mexico: a pressing priority. *Sexual and Reproductive Health Matters*; 16(32): 113-23.
- Kocemba K.A., Groen R.W.J., van Andel H., Kersten M.J., Mahtouk K., Spaargaren M. y Pals S.T. 2017. Transcriptional silencing of the Wnt-antagonist DKK1 by promoter methylation is associated with enhanced Wnt signaling in advanced multiple myeloma. *PLoS One*; 7(2): e30359.
- Koinuma K., Yamashita Y., Liu W., Hatanaka H., Kurashina K., Wada T., Takada S., Kaneda R., Choi Y.L., Fujiwara S.I., Miyakura Y., Nagai H. y Mano H. 2006. Epigenetic silencing of AXIN2 in colorectal carcinoma with microsatellite instability. *Oncogene*; 25 (1): 139-146.
- Kongkham P.N., Northcott P.A., Croul S.E., Smith C.A., Taylor M.D. y Rutka J.T. 2010. The SFRP family of WNT inhibitors function as novel tumor suppressor genes epigenetically silenced in medulloblastoma. *Oncogene*; 29: 3017–3024.
- Koval A. y Katanaev V.L. 2018. Dramatic dysbalancing of the Wnt pathway in breast cancers. *Scientific Reports*; 8: 7329.
- Kulis M. y Esteller M. 2010. DNA Methylation and Cancer. *Advances in Genetics*; 70: 27-56.
- Kuphal S., Lodermeier S., Bataille F., Schuierer M., Hoang B.H., Bosserhoff A.K. 2006. Expression of Dickkopf genes is strongly reduced in malignant melanoma. *Oncogene*; 25: 5027–36

- Laird P.W., Jackson-Grusby L., Fazeli A., Dickinson S.L., Jung W.E., Li E., Weinberg R.A. y Jaenisch R. 1995. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell*; 81: 197–205.
- Lamb R., Ablett M.P., Spence K., Landbegr G., Sims A.H. y Clarke R.B. 2013. Wnt pathway activity in breast cancer sub-types and stem-like cells. *PLOS ONE*; 8 (7): e67811.
- Lammi L., Arte S., Somer M., Jarvinen H., Lahermo P., Thesleff I., Pirinen S. y Nieminen P. 2004. Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *American journal of human genetics*; 74: 1043–1050.
- Leung J.Y., Kolligs F.T., Wu R., Zhai Y., Kuick R., Hanash S., Cho K.R., Fearon E.R. 2002. Activation of AXIN2 expression by beta-catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *The Journal of Biological Chemistry*; 277(24): 21657–21665.
- Lee E., Salic A., Kruger R., Heinrich R. y Kirschner M.W. 2003. The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biology*; 1: E10.
- Lee I., Ajay S.S., Yook J.I., Kim H.S., Hong S.H., Kim N.H., Dhanasekaran S.M., Chinnaiyan A.M. y Athey B.D. 2009. New class of microRNA targets containing simultaneous 50 -UTR and 30 -UTR interaction sites. *Genome Research*; 19(7): 1175–1183.
- Li Y., Jin K., van Pelt G.W., van Dam H., Yu X., Mesker W.E., ten Dojke P., Zhou F. y Zhang L. 2016. C-Myb enhances breast cancer invasion and metastasis through the Wnt/ $\beta$ -catenin/Axin2 pathway. *Cancer Research*; 76(11): 3364-3375.
- LinktoLife. 2014. What is cancer. [Consultado el 16 de febrero de 2017]. Disponible en: <http://www.linktolife.mu/cancer-info/cancer-definition>.
- Lipworth L. y Bailey L.R. 2000. History of breast-feeding in relation to breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature. *Journal of the National Cancer Institute*; 92, 302-312.
- Liu X., He M., Hou Y., Liang B., Zhao L., Ma S. y Yu Y. 2013. Expression profiles of microRNAs and their target genes in papillary thyroid carcinoma. *Oncology Reports*; 29(4): 1415–1420.
- Liu H., Mastriani E., Yan Z.Q., Yin S.Y., Zeng Z., Wang H., Li Q.H., Liu H.Y., Wang X., Bao H.X., Zhou Y.J., Kou J.J., Li D., Li T., Liu J., Liu Y., Yin L., Qiu L., Gong L. y Liu S.L.

2016. SOX7 co-regulates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling with Axin2: both expressed at low levels in breast cancer. *Scientific Reports*; 6.
- Logan C.Y. y Nusse R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology*; 20:781–810.
- Loh Y.N., Hedditch E.L., Baker L.A., Jary E., Ward R.L. y Ford C.E. 2013. The Wnt signaling pathway is upregulated in an in vitro model of acquired tamoxifen resistant breast cancer. *BMC Cancer*; 13: 174.
- Longo F. 2017. Nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas en los tumores de origen desconocido. [Consultado el 15 de junio de 2017]. Disponible en: [http://basesbiologicasancer.com/wp-content/uploads/2017/03/6\\_Federico-Longo\\_bases\\_2017.pdf](http://basesbiologicasancer.com/wp-content/uploads/2017/03/6_Federico-Longo_bases_2017.pdf)
- Lu S., Gough A.W., Babrowski W.F. y Stewart B.H. 1996. Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 85: 270-273.
- Lustig B., Jerchow B., Sachs M., Weiler S., Pietsch T., Karsten U., van de Wetering M., Clevers H., Schlag P.M., Birchmeier W. y Behrens J. 2002. Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorectal and liver tumors. *Molecular and Cellular Biology*; 22(4): 1184-1193.
- Luu H.H., Zhang R., Haydon R.C., Rayburn E., Kang Q. y Si W. 2004. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway as Novel Cancer Drug Targets. *Current Cancer Drug Targets*; 4 (8): 653-671.
- MacDonald B.T., Tamai K. y He X. 2009. Wnt/  $\beta$ -catenin signaling: components, mechanisms and diseases. *Developmental Cell*; 17(1): 9-26.
- Mansour S.N., Yazdani Y., Alizadeh-Navaei R., Azadeh H. y Farazmandfar T. 2014. Promoter methylation analysis of WNT/  $\beta$ -catenin pathway regulator and its association with expression of *DNMT1* enzyme in colorectal cancer. *Journal of Biomedical Science*; 21: 73.
- Mao J., Wu W., Li Y., Hoppe D., Stannek P., Glinka A y Niehrs C. 2001. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*; 411: 321–325.
- Mao B., Wu W., Davidson G., Marhold J., Li M., Mechler B.M., Delius H., Hoppe D., Stannek P., Walter C., Glinka A. y Niehrs C. 2002. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Nature*; 417: 664–667.



- Mao B. y Niehrs C. 2003. Kremen2 modulates Dickkopf2 activity during Wnt/LRP6 signalling. *Gene*; 302: 179–183.
- Maunakea A.L., Chepelev I., Cui K. y Zhao K. 2013. Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Research*; 23: 1256-1269.
- McTiernan A., Gralow J. y Talbott L. 2000. Breast Fitness. An optimal exercise and health plan for reducing your risk of breast cancer. *St. Martin`s Press*: 16-17.
- Meng L., Maskarinec G. y Wilkens L. 1997. Ethnic differences and factors related to breast cancer survival in Hawaii. *International Journal of Epidemiology*; 26: 1151-1158.
- Mikheev A.M., Mikheeva S.A., Maxwell J.P., Rivo J.V., Rostomily R., Swisshelm K. y Zarbl H. 2008. Dickkopf-1 mediated tumor suppression in human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Research Treatment*; 112: 263–73.
- Mohar A., Reynoso N., Villarreal-Garza C., Bargalló-Rocha J.E., Arce-Salinas C. y Lara-Medina. Cáncer de mama en el Instituto Nacional de Cancerología. Experiencia del Seguro Popular. *Revista Mexicana de Mastología*; 5(1): 6-11.
- Morin P.J., Sparks A.B., Korinek V., Barker N., Clevers H., Vogelstein B. y Kinzler K.W. 1997. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*; 275: 1787–1790.
- Muradiye A., Tülin C., Hatice T. y Hasan A. 2012. Analisis of promoter methylation of *Dickkopf1* (DKK1) gene in breast cancer. *Turkish Journal of Medical Sciences*; 42: 1379-1387.
- National Institutes of Health. 2017. Metastatic cancer. [Consultado el 15 de febrero de 2017]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/types/metastatic-cancer>.
- National Institutes of Health. 2015. What is cancer? [Consultado el 16 de enero de 2017]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
- Negrini S., Gorgoulis V.G., y Halazonetis T.D. 2010. Genomic instability—an evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* ; 11: 220–228.
- Nelson R. AACR FCPR. 2008. Family History Increases Breast Cancer Risk. *Medscape Medical News*. Consultado 9 de enero de 2017. Disponible en: <http://www.medscape.com/viewarticle/584292>.



- Niida A., Hiroko T., Kasai M., Furukawa Y., Nakamura Y., Suzuki Y., Sugano S. y Akiyama T. 2004. DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the  $\beta$ -catenin/TCF pathway. *Oncogene*; 23: 8520-8526.
- Nishisho I., Nakamura Y., Miyoshi Y., Miki Y., Ando H., Horii A., Koyama K., Utsunomiya J., Baba S. y Hedge P. 1991. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*; 253: 665–669.
- Nusse R y Varmus H.E. 1982. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*; 31: 99-109.
- Nusse R. y Varmus H.E. 1992. Wnt Genes. *Cell*; 69: 1073-1087.
- Ogino S., Nosho K., Kirkner G.J., Kawasaki T., Chan A.T. y Schernhammer E.S. 2008. A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute*; 100:1734-8.
- Okano M., Bell D.W., Haber D.A. y Li E. 1999. DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are essential for the novo methylation and mammalian development. *Cell*; 99: 247-257.
- Olivotto I.A., Truong P.T., Speers C.H., Bernstein V., Allan S.J., Kelly S.J., Lesperance M.L. 2004. Time to stop progesterone receptor testing in breast cancer management. *Journal of Clinical Oncology*; 22(9): 1769-1770.
- Organización Mundial de la Salud, 2016. [Consultado el 21 de agosto de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
- Organización Mundial de la Salud, 2016. [Consultado el 9 de enero de 2017]. Disponible en: [http://www.who.int/cancer/breast\\_cancer\\_awareness/en/](http://www.who.int/cancer/breast_cancer_awareness/en/)
- Palacio-Mejía L.S., Lazcano E., Allen B. y Hernández M. 2009. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Pública de México*. 51(supl.2): S208-S218.
- Paluszczak J., Sarbak J., Kostrzewska-Poczekaj M., Kiwerska K., Jarmuz-Szymczak M., Grenman R., Mielcarek-Kuchta D. y Baer-Dubowska W. 2015. The negative regulators of Wnt pathway-*DACH1*, *DKK1* and *WIF1* are methylated in oral and oropharyngeal cancer and *WIF1* methylation predicts shorter survival. *Tumour Biology*; 36(4): 2855-2861.

- Park S.Y., Kwon H.J., Lee H.E., Ryu H.S., Kim S.W., Kim J.H., Kim I.A., Jung N., Cho N.Y. y Kang G.H. 2011. Promoter CpG island hypermethylation during breast cancer progression. *Virchows Archiv*; 458:73-84.
- Pattamadilok J., Huapai N., Rattanatanyong P., Vasurattana A., Triratanachat S. y Tresukosol D. 2008. LINE-1 hypomethylation level as a potential prognostic factor for epithelial ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*; 18:711-7.
- Paz M.F., Fraga M.F., Avila S., Guo M., Pollan M., Herman J.G. y Esteller. 2003. A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines. *Cancer Research*; 63(5): 1114-1121.
- Persson I. 2000. Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers-evidence and hypothesis from epidemiological findings. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; 74(5): 357-64.
- Phesse T.J., Parry L., Reed K.R., Ewan K.B., Dale T.C., Sansom O.J. y Clarke A.R. 2008. Deficiency of Mbd2 attenuates Wnt signaling. *Molecular and Cell Biology*; 28: 6094–6103.
- Polakis P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Development*; 14: 1837-1851.
- Polakis P. 2007. The many ways of Wnt in cancer. *Current opinion in genetics & development*; 17:45–51.
- Polakis P. 2012. Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*; 4(5): a008052.
- Qian L., Mahaffey J.P., Alcorn H.L. y Anderson K.V. 2011. Tissue-specific roles of Axin2 in the inhibition and activation of Wnt signaling in the mouse embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 108(21): 8692-8697.
- Qiao L., Xu Z.L., Zhao T.J., Ye L.H. y Zhang X.D. 2008. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Letters*; 269: 67–77.
- Ravdin P.M., Green S., Dorr T.M., McGuire W.L., Fabian C., Pugh R.P., Carter R.D., Rivkin S.E., Borst J.R. y Belt R.J. 1992. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated

- with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*; 10(8): 1284-1291.
- Rice J.C., Massey-Brown K.S. y Futscher B.W. 1998. Aberrant methylation of the *BRCA1* CpG island promoter is associated with decreased *BRCA1* mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene*; 17:1807-1812.
- Rice J.C., Ozcelik H., Maxeines P., Andrulis I. y Futscher B.W. 2000. Methylation of the *BRCA1* promoter is associated with decreased *BRCA1* mRNA levels in clinical breast cancer specimens. *Carcinogenesis*; 21 (9): 1761-1765.
- Robertson K.D. 2005. DNA methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*; 6: 597-610.
- Robson M.E. 2002. Clinical considerations in the management of individuals at risk for hereditary breast and ovarian cancer. *Cancer control*. 9:457-465.
- Rodriguez-Paredes M. y Esteller M. 2011. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature Medicine*; 17: 330–339.
- Romieu I. y Lajous M. 2009. The role of obesity, physical activity and dietary factors on the risk for breast cancer: Mexican experience. *Salud Pública Mex*; 51 SUPPL 2:S172-S180.
- Rosales-Reynoso M.A., Arredondo Valdéz A.R., Wence-Chávez L.I., Barros-Nuñez P., Gallegos-Arreola M.P., Flores-Martínez S.E. y Sánchez-Corona J. 2016. *AXIN2* polymorphisms and its association with colorectal cancer in Mexican patients. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*; 20(8): 438-444.
- Ryo A., Nakamura M., Wulf G., Liou Y.C. y Lu K.P. 2001. Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nature Cell Biology*; 3(9): 793-801.
- Sadakierska-Chudy A., Kostrzewa R.M. y Filip M. 2015. A comprehensive view of the epigenetic landscape part I: DNA methylation, passive and active DNA demethylation pathways and histone variants. *Neurotoxicity Research*; 27: 84-97
- Salahshor S. y Woodgett J.R. 2005. The links between axin and carcinogenesis. *Journal of Clinical Pathology*; 58: 225–236.
- Salozhin S.V., Prokhorchuk E.B. y Georgiev G.P. 2005. Methylation of DNA of the major epigenetic markers. *Biochemistry*; 70: 525-532.

- Sarrio D., Moreno Bueno G., Hardisson D., Sanchez-Estevez C., Guo M., Herman J.G., Gamallo C., Esteller M. y Palacios J. 2003. Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. *International Journal of Cancer*; 106: 208-15.
- Saxonov S., Berg P. y Brutlag D.L. 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 103: 1412– 1417.
- Schulz W. 2005. Qualified Promised: DNA methylation assays for the detection and classification of human cancers. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; 3:227-229.
- Schulz W.A., Steinhoff C. y Florl A.R. 2006. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Current Topics in Microbiology and Immunology*; 310: 211–250.
- Schwartz S., Meshorer E. y Ast G. 2009. Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nature Structural & Molecular Biology*; 16 (9): 990-995.
- Semënov M.V., Zhang X. y He X. 2008. DKK1 Antagonizes Wnt Signaling without Promotion of LRP6 Internalization and Degradation. *The Journal of Biological Chemistry*; 283(31): 21427-21432.
- Shukla S., Kavak E., Gregory M., Imashimizu M., Shutinoski B., Kashlev M., Oberdoerffer P., Sandberg R. y Oberdoerffer S. 2011. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature*; 479: 74–79.
- Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Thorsen T., Quiste H., Matese J.C., Brown P.O., Botstein D., Lonning P.E. y Borresen-Dale A.L. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS*; 98(19): 10869-10874.
- Stendahl M., Rydén L., Nordenskjöld B., Jönson P.E., Landberg G. y Jirström K. 2006. High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*; 12(15): 4614-4618.

- Stephenson G. y Rose D. 2003. Breast cancer and obesity: an update. *Nutrition and Cancer*; 45(1): 2-17.
- Suzuki H., Gabrielson E., Chen W., Anbazhagan R., van Engeland M., Weijnenberg M.P., Herman J.G. y Baylin S.B. 2002. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nature Genetics*; 31: 141–149.
- Suzuki H., Toyota M., Carraway H., Gabrielson E., Ohmura T., Fujikane T., Nishikawa N., Sogabe Y., Nojima M. y Sonoda T. 2008. Frequent epigenetic inactivation of Wnt antagonist genes in breast cancer. *British Journal of Cancer*; 98: 1147–1156.
- Takagi H., Sasaki S., Suzuki H., Toyota M., Maruyama R., Nojima M., Yamamoto H., Omata M., Tokino T. e Imai K. 2008. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes in hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology*; 43: 378–389.
- Tamai K., Zeng X., Liu C., Zhang X., Harada Y., Chang Z. y He X. 2004. A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Molecular cell*; 13:149–156.
- Thompson M.E., Jensen R.A., Obermiller P.S., Page D.L. y Holt J.T. 1995. *Nature Genetic*; 9, 444-450.
- Tian E., Zhan F., Walker R., Rasmussen E., Ma Y., Barlogie B. y Shaughnessy J.D. 2003. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*; 349: 2483–94.
- Tseng R.C., Lin R.K., Wen C.K., Tseng C., Hsu H.S., Hsu W.H. y Wang Y.C. 2008. Epigenetic silencing of AXIN2/betaTrCP and deregulation of p53-mediated control lead to wild-type beta-catenin nuclear accumulation in lung tumorigenesis. *Oncogene*; 27 (32): 4488-4496.
- Valencia M.A.B. 2010. Estudio de la regulación epigenética de la vía Wnt por metilación aberrante de sus genes represores en la leucemia mieloblástica aguda. [Consultado el 17 de marzo de 2017]. Disponible en: <https://www.slideserve.com/bary/estudio-de-la-regulaci-n-epigen-tica-de-la-v-a-wnt-por-metilaci-n-aberrante-de-sus-genes-represores-en-la-leucemia-mielo>.
- Veeck J., Niederacher D., An H., Klopocki E., Wiesmann F., Betz B., Galm O., Camara O., Durst M., Kristiansen G., Huszka C., Knuchel R. y Dahl E. 2006. Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene*; 25: 3479-88.

- Viale G. 2012. The current state of breast cancer classification. *Annals of Oncology*; 23:207-210.
- Vincent A., Omura N., Hong S.M., Jaffe A., Eshleman J. y Goggins M. 2011. Genome-wide analysis of promoter methylation associated with gene expression profile in pancreatic adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*; 17: 4341–4354.
- Virmani A.K., Rathi A., Sathyanarayana U.G., Padar A., Huang C.X., Cunnigham H.T., Farinas A.J., Milchgrub S., Euhus D.M., Gilcrease M., Herman J., Minna J.D. y Gazdar A.F. 2001. Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas. *Clinical Cancer Research*; 7:1998-2004.
- Vlad A., Rohrs S., Klein-Hitpass L. y Muller O. 2008. The first five years of the Wnt targetome. *Cellular signalling*; 20:795–802.
- Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E., Zhou S., Diaz L.A. Jr y Kinzler K.W. 2013. Cancer genome landscapes. *Science*; 339(6127): 1546-1558.
- Wallingford J.B. y Habas R. 2005. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development*; 132:4421–4436.
- Walsh C.P., Chaillet J.R. y Bestor T.H. 1998. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nature Genetics*; 20: 116–117.
- Wang X., Xu C., Hua Y., Cheng K., Zhang Y., Liu J., Han Y., Liu S., Zhang G., Xu S. y Yang Z. 2018. Psoralen induced cell cycle arrest by modulating Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in breast cancer cells. *Scientific Reports*; 8: 14001.
- Weber M., Hellmann I., Stadler M.B., Ramos L., Pääbo S., Rebhan M. y Schübeler D. 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*; 39 (4): 457-466.
- Widschwendter M. y Jones P.A. 2002. DNA methylation and breast carcinogénesis. *Oncogene*; 21(35): 5462-5482.
- Willert K., Brown J.D., Danenberg E., Duncan A.W., Weissman I.L., Reya T., Yates J.R. 3<sup>rd</sup> y Nusse R. 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*; 423: 448–452.
- Willert K. y Jones K.A. 2006. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Development*; 20: 1394-1404.

- Willert K. y Nusse R. 2012. Wnt Proteins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*; 4: a007864.
- Wirhth O., Waha A., Weggen S., Schirmacher P., Kuhne T., Goodyer C.G., Albrecht S., Von Schweinitz D. y Pietsch T. 2003. Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wingless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors. *Laboratory Investigation*; 83: 429–434.
- Wissmann C., Wild P.J., Kaiser S., Roepcke S., Stoehr R., Woenckhaus M., Kristiansen G., Hsieh J.C., Hofstaedter F., Hartmann A., Knuechel R., Rosenthal A. y Pilarsky C. 2003. WIF1, a component of the Wnt pathway, is downregulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *The Journal of Pathology*; 201: 204-212.
- Wolff A.C., Hammond M.E., Shwartz J.N., Hagerty K.L., Allred D.C., Cote R.J., Dowsett M., Fitzgibbons P.L., Hanna W.M., Langer A., McShane L.M., Paik S., Pegram M.D., Perez E.A., Press M.F., Rhodes A. Sturgeon C. Taube S.E., Tubbs R., Vance G.H., van de Vijver M., Wheeler T.M. y Hayes D.F. 2007. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*; 25(1). 118-145.
- Wu Z.Q., Brabletz T., Fearon E., Willis A.L., Hu C.Y., Li X-Y. y Weiss S.J. 2012. Canonical Wnt suppressor, Axin2, promotes colon carcinoma oncogenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 109(28): 11312-11317.
- Yamabuki T., Takano A., Hayama S., Ishikawa N., Kato T., Miyamoto M., Ito T., Ito H., Miyagi Y., Nakayama H., Fujita M. y Hosokawa M. 2007. Dickkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Research*; 67: 2517–2525.
- Yamamoto H., Kishida S., Uochi T., Ikeda S., Koyama S., Asashima M. 1998. Axil, a member of the Axin family, interacts with both glycogen synthase kinase 3 beta and beta-catenin and inhibits axis formation of *Xenopus* embryos. *Molecular and Cellular Biology*; 18: 2867-2875.
- Yan D., Wiesmann M., Rohan M., Chan V., Jefferson A.B., Guo L., Sakamoto D., Caothien R.H., Fuller J.H., Reinhard C., Garcia P.D. Randazzo F.M., Escobedo J., Fantl W.J. y Williams L.T. 2001. Elevated expression of axin2 and hnk2 mRNA provides



- evidence that Wnt/beta-catenin signaling is activated in human colon tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 98 (26): 14973-14978.
- Yang S.Z., Kohno N., Yokoyama A., Kondo K., Hamada H. y Hiwada K. 2001. Decreased E-cadherin augments beta-catenin nuclear localization: studies in breast cancer cell lines. *International Journal of Oncology*; 18: 541-548.
- Yarden R. y Papa M. 2006. BRCA1 at the crossroad of multiple cellular pathways: approaches for therapeutic interventions. *Molecular Cancer Therapeutics*; 5:1396-1404.
- Ying Y. y Tao Q. 2009. Epigenetic disruption of the WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway in human cancers. *Epigenetics*; 4 (5): 307-312.
- Yook J.I., Li X.Y., Ota I., Hu C., Kim H.S., Kim N.H., Cha S.Y., Ryu J.K., Choi Y.J., Kim J., Fearon E.R. y Weiss S.J. 2006. A Wnt-Axin2-GSK3beta cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nature Cell Biology* ; 8: 1398–1406.
- Zorn A.M.. 2001. Wnt signalling: antagonistic Dickkopfs. *Current Biology*; 11: 592–595.